

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> DON**

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo  
di Deossinivalenolo

Art. No.: R5906

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Prodotto da:

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

Per informazioni:

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Ordini (0 61 51) 81 02-20  
[orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl  
Via dell'Artigianato 19  
20070 Cerro al Lambro MI  
Telefono 02 9823 3330

[info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it) – [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

RIDA® e RIDASCREEN®  
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG  
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001.

# RIDASCREEN® DON

## Introduzione

RIDASCREEN® DON (Cod. R5906) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di deossinivalenolo in cereali, malto, mangimi, birra e mosto di malto.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio - inclusi gli standard - sono contenuti nel kit. Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard). Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Sebbene per l'uso del kit RIDASCREEN® DON non sia necessario un addestramento specifico, se necessario è disponibile su richiesta un supporto gratuito da parte del distributore locale.

Preparazione campioni: cereali, malto, mangimi: estrazione, filtrazione  
birra: rimozione della CO<sub>2</sub>  
mosto di malto: senza preparazione del campione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni)  
cereali, malto, mangimi ..... ca. 10 min  
birra ..... ca. 5 min  
mosto di malto ..... nessuno  
esecuzione del test (tempo d'incubazione) ..... 45 min

Limite di rilevabilità: cereali, malto, mangimi ..... 18.5 ppb  
birra ..... 3.7 ppb  
mosto di malto ..... 3.7 ppb

Valori di recupero: cereali, malto, mangimi, birra: ..... 85-110 %

Cross-reattività: la specificità del test RIDASCREEN® DON è stata stabilita analizzando le cross reattività alle micotossine corrispondenti.

Deossinivalenolo ..... 100 %  
3-Acetildeossinivalenolo ..... > 100 %  
15-Acetildeossinivalenolo ..... ca. 19 %  
Nivalenolo ..... ca. 4 %  
Fusarenone X ..... < 1 %  
Tossina T-2 ..... < 1 %

## 1. Scopo

RIDASCREEN® DON è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di residui di DON in cereali, malto, mangimi, birra e mosto di malto.

## 2. Generale

Il deossinivalenolo appartiene al gruppo di micotossine dei tricoteceni ed è prodotto da funghi del genere *Fusarium*. Il deossinivalenolo è spesso presente nei vegetali, in particolar modo nei cereali. Delle 150 micotossine dei tricoteceni esistenti, il deossinivalenolo, il 3-acetil e il 15-acetil-deossinivalenolo sono le più frequenti in Europa e Nord America. Le concentrazioni di tossine rilevate nel frumento, nel mais e nel riso sono spesso dell'ordine dei ppm. Per le loro elevate proprietà citotossiche e immunosoppressive queste tossine rappresentano un rischio per la salute umana e degli animali.

## 3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono coattati con anticorpi di cattura diretti contro anticorpi anti-deossinivalenolo. Vi si aggiungono gli standard o i campioni, il deossinivalenolo coniugato con enzima e gli anticorpi anti-deossinivalenolo. Il DON libero e quello coniugato competono per i siti di legame degli anticorpi (immunodosaggio enzimatico competitivo). Contemporaneamente gli anticorpi anti-DON vengono immobilizzati dagli anticorpi di cattura. L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato/cromogeno nei pozzetti, l'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta dello stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di deossinivalenolo nel campione.

#### 4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 analisi (inclusi gli standard). Ogni kit contiene:

- 1 x Micropiastra da 96 pozzetti (12 strip da 8 pozzetti estraibili ciascuna)  
coattata con anticorpi di cattura
- 5 x Soluzioni standard (1,3 ml ognuna)  
0 ppb (zero standard), 3.7 ppb, 11.1 ppb, 33.3 ppb, 100 ppb  
DON in acqua  
pronte all'uso
- 1 x Coniugato (6 ml)..... tappo rosso  
deossinivalenolo coniugato con perossidasi  
pronto all'uso
- 1 x Anticorpi anti-deossinivalenolo (6 ml)..... tappo nero  
monoclonali  
pronti all'uso
- 1 x Substrato/Cromogeno (10 ml) ..... tappo marrone  
marcato rosso  
contiene tetrametilbenzidina
- 1 x Soluzione di stop (14 ml)..... tappo giallo  
contiene acido solforico 1N
- 1 x Soluzione di lavaggio (sale)  
per la preparazione di tampone fosfato 10 mM (pH 7,4)  
contiene Tween 20 0,05%

#### 5. Materiale richiesto ma non fornito

##### 5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- cilindro graduato: 100 ml, 1l; in plastica o vetro,
- vetreria per la preparazione degli estratti: imbuto e contenitore da 50 ml
- macinino
- opzionale: shaker
- carta da filtro: Whatman 1 o equivalente
- micropipette da 20 µl – 200 µl e da 200-1000 µl a volume variabile

##### 5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata

## 6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Le soluzioni standard contengono deossinivalenolo: evitare il contatto del reagente con la cute. Utilizzare i guanti.

Decontaminare la vetreria e le soluzioni contenenti deossinivalenolo immergendole per una notte in una soluzione al 10% v/v di ipoclorito di sodio (candeggina) – portare il pH a 7 con acido cloridrico.

La soluzione di stop contiene acido solforico 1 N (R36/38, S2-26).

## 7. Conservazione

Conservare il kit a 2°-8°C (35°-46°F). Non congelare alcun componente del kit.

I pozzetti non utilizzati vanno tenuti con l'agente essiccante nel sacchetto ben chiuso con la zip e conservati a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile, di conseguenza evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità del prodotto non si applica oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno, normalmente di colore rosso, prima dell'esecuzione del test
- un valore di assorbanza relativo allo zero standard inferiore a 0,6 ( $A_{450\text{ nm}} < 0,6$ )

## 9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in luogo fresco, al riparo dalla luce.

Triturare un campione rappresentativo (in accordo con le procedure di campionamento comunemente adottate) e miscelarlo con cura prima di procedere con la procedura di estrazione.

### 9.1. Cereali, malto e mangimi

- in un contenitore adeguato pesare 5 grammi di campione tritato e aggiungere 25 ml di acqua distillata \*)

- agitare energicamente per 3 minuti (manualmente o con uno shaker)
- filtrare l'estratto con carta da filtro Whatman 1
- nel saggio utilizzare 50 µl di filtrato per ogni pozzetto

\*) se necessario, la quantità di campione può essere aumentata, aumentando proporzionalmente la quantità di acqua aggiunta, es. 25 g in 125 ml di acqua distillata oppure 50 g in 250 ml di acqua distillata.

## 9.2. Birra

- utilizzare un volume adeguato di birra e rimuovere l'eccesso di CO<sub>2</sub> fino a che non si osservi più la formazione di bolle (mediante agitazione o filtrazione)
- nel saggio utilizzare 50 µl di campione privo di CO<sub>2</sub> per ogni pozzetto

**In caso di estratti torbidi si consiglia la filtrazione sterile dei campioni dopo l'eliminazione della CO<sub>2</sub> e prima della loro utilizzazione nel test.**

## 9.3. Mosto di malto

- nel saggio utilizzare 50 µl di campione non diluito per ogni pozzetto

**In caso di estratti torbidi si consiglia la filtrazione sterile del campione prima della sua utilizzazione nel test!**

## 10. Esecuzione del test

### 10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) prima dell'uso.

Come **soluzione di lavaggio** è necessario un tampone PBS: utilizzare i sali contenuti nella bustina inclusa nel kit (vedi cap. 4.). Sciogliere il contenuto in un litro di acqua distillata. La soluzione di lavaggio pronta all'uso scade dopo circa 4-6 settimane se conservata a 2-8°C (35-46°F).

In alternativa: Sciogliere il contenuto della bustina in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10X. Questa soluzione scade dopo circa 8-12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F). Utilizzare 1 parte di soluzione concentrata e miscelarla con 9 parti di acqua distillata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta all'uso.

## 10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e campioni da eseguire. Registrare le posizioni assegnate agli standard e ai campioni.
2. Pipettare 50 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti, utilizzando un nuovo puntale per ogni campione o standard.
3. Pipettare 50 µl di enzima coniugato (flacone con tappo rosso) in ogni pozzetto.
4. Pipettare 50 µl di anticorpo anti-deossinivalenolo (flacone con tappo nero) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
5. Svuotare in un lavabo i pozzetti del liquido in essi contenuto e picchiettare la piastra dopo averla capovolta su carta assorbente pulita in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Ripetere per tre volte. Con una pipetta multicanale riempire i pozzetti con 250 µl di soluzione di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare poi il liquido come descritto sopra. Ripetere altre due volte.
6. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di substrato/cromogeno (flacone con tappo marrone). Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop (flacone con tappo giallo). Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

## 11. Risultati

Per la valutazione dei test immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA® SOFT Win (Cod. Z9999).

Per determinazioni singole si raccomanda una valutazione su scala logit/log, mentre per determinazioni doppie o multiple si consiglia l'uso del cubic spline.

Il profilo della curva standard è illustrato nel Certificato di Assicurazione di Qualità (Quality Assurance Certificate) allegato.

Nota per il calcolo eseguito senza l'apposito software:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o campione)}}{\text{Assorbanza standard 0}} \times 100 = \% \text{ assorbimento}$$

Lo standard zero risulta pertanto essere il 100% e i valori di assorbanza sono quotati in percentuale. I valori calcolati per gli standard vanno inseriti in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro la concentrazione di deossinivalenolo espressa in µg/kg.

Per ottenere la concentrazione in µg/kg effettivamente contenuta nel campione, la concentrazione calcolata dalla curva standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione corrispondente. Operando secondo le procedure descritte, i fattori di diluizione da applicare sono i seguenti:

cereali, malto, mangimi .....	5
birra .....	1
mosto di malto .....	1

RR-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.