

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST T-2 Toxin**

Saggio immunoenzimatico per l'analisi quantitativa  
della tossina T-2

Cod. R5302

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 Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Telefono 02 9823 3330

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

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

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001.

# RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST T-2 Toxin

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST T-2 Toxin (Cod. R5302) è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa della tossina T-2 Toxin in campioni di cereali e di mangimi.

Tutti i reagenti necessari per l'esecuzione del saggio immunoenzimatico – inclusi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 48 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è necessario un lettore per micropiastre.

Per l'esecuzione di RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST T-2 Toxin non è necessario un corso specialistico, tuttavia su richiesta è possibile avere un supporto gratuito da parte dei distributori del prodotto.

Il test è stato validato con matrici di mais, semenzali di mais e miscele di mangimi per l'allevamento dei polli e l'ingrassamento dei suini.

Preparazione dei campioni: estrazione, filtrazione e diluizione

|                  |   |
|------------------|---|
| Tempo richiesto: | preparazione dei campioni (10 campioni)<br>cereali e mangimi .....ca. 10 min.<br>esecuzione del test (tempo di incubazione).....15 min. |
|------------------|---|

Limite di rilevabilità: < 20 µg/kg (ppb)

(corrispondente alla sostanza  
standard)

Limite di quantificazione: 50 µg/kg (ppb)

(corrispondente alla sostanza  
standard)

## 1. Scopo

RIDASCREEN®FAST T-2 Toxin è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa della tossina T-2 toxin in campioni di cereali e di mangimi.

## 2. Generale

La tossina T-2 toxin appartiene al gruppo dei tricoteceni prodotti dal genere *Fusarium*. La tossina T-2 è spesso presente nei prodotti agricoli, sebbene la sua incidenza e concentrazione mostri un'ampia variabilità regionale. La sua capacità citotossica e immunosoppressiva è un rischio sia per la salute umana che animale.

## 3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi di cattura specifici per anticorpi anti-tossina T-2. Nei pozzetti si aggiungono gli standard di tossina T-2 o le soluzioni campione, la tossina T-2 coniugata con enzima e anticorpi anti-tossina T-2. La tossina T-2 libera e quella coniugata all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo anti-tossina T-2 (analisi immunoenzimatica competitiva). In contemporanea gli anticorpi anti-tossina T-2 vengono immobilizzati dagli anticorpi di cattura coattati nei pozzetti. Il coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunta la soluzione di substrato/cromogeno e il coniugato enzimatico legato trasforma il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca un viraggio del colore da blu a giallo. La determinazione quantitativa viene eseguita fotometricamente a 450 nm. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di tossina T-2 nel campione.

## 4. Reagenti forniti

Ciascun kit contiene materiale sufficiente per 43 analisi (oltre a 5 analisi standard). Ogni kit contiene:

- 1 x Micropiastra con 48 pozzetti (6 strip da 8 pozzetti ciascuna)  
rivestita con anticorpi di cattura
- 5 x Soluzioni standard di tossina T-2\*), 1.3 ml ciascuno  
0 ppb (standard zero), 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb  
di tossina T-2 in una soluzione di metanolo/acqua, pronte all'uso
- 1 x Coniugato (3 ml) ..... tappo rosso  
tossina T-2 coniugata con perossidasi  
pronto all'uso
- 1 x Anticorpo anti-tossina-T-2 (3 ml) .....tappo nero  
monoclonale, pronto all'uso
- 1 x Soluzione substrato/cromogeno (10 ml) .....tappo marrone  
colore rosso
- 1 x Soluzione di stop (14 ml) ..... tappo giallo  
contiene acido solforico 1 N

\*) Per i campioni è già stato considerato un fattore di diluizione 10, pertanto le concentrazioni di tossina T-2 possono essere lette direttamente sulla curva standard.

## 5. Reagenti richiesti ma non forniti

### 5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- misurino graduato in plastica o vetro da 100 ml
- vetreria per la preparazione dell'estratto del campione: imbuto filtrante e beuta da 50 ml
- tritratore
- agitatore (opzionale)
- carta da filtro Whatman No. 1 o equivalente
- micropipette da 50 µl, 100 µl e 1000 µl

### 5.2. Reagenti:

- metanolo
- soluzione al 70 % di metanolo: preparare una soluzione al 70 % di metanolo miscelando 70 ml di metanolo puro con 30 ml di acqua distillata o deionizzata
- acqua distillata o deionizzata

## **6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori**

Il test deve essere eseguito solo da personale specializzato e qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Gli standard contengono la tossina T-2: prestare particolare attenzione nel maneggiarli. Evitare il contatto del reagente con la cute (usare i guanti).

Per decontaminare in maniera ottimale la vetreria e le soluzioni di tossina T-2 utilizzare una soluzione di ipoclorito di sodio (10 % (v/v)) per una notte, regolandola a pH 7 con HCl.

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

## **7. Istruzioni per la conservazione**

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

Riporre i pozzetti inutilizzati nella loro busta originale, richiuderli insieme all'essiccante fornito e conservare a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La soluzione rossastra del substrato/cromogeno è fotosensibile, evitare pertanto di esporla a luce diretta.

La garanzia di qualità decade alla data di scadenza riportata in etichetta.

Il kit può essere utilizzato regolarmente almeno fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto, se conservato in maniera corretta.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con diverso numero di lotto.

## **8. Indicazione di instabilità e deterioramento dei reagenti**

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione di substrato/cromogeno normalmente rossastra, prima dell'esecuzione del test
- un valore inferiore a 0.6 unità di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) per lo standard zero

## 9. Preparazione dei campioni

Conservare i campioni in luogo fresco e al riparo dalla luce.

Triturare un campione rappresentativo (prelevato secondo le consuete tecniche di campionamento) e miscelarlo accuratamente prima di procedere alla procedura di estrazione.

- pesare 5 g di campione tritato e addizionarlo in un idoneo contenitore insieme a 25 ml di metanolo (70 %) \*)
- agitare energicamente per 3 min. manualmente o mediante agitatore
- filtrare l'estratto con un filtro Whatman N° 1
- diluire 1 ml del filtrato ottenuto con 1 ml di acqua distillata o deionizzata
- per il test utilizzare 50 µl del filtrato per ogni pozzetto

\*) il quantitativo del campione può essere aumentato ove necessario, aumentando proporzionalmente il volume della soluzione di metanolo e acqua.

## 10. Esecuzione del test

### 10.1. Indicazioni preliminari

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) prima dell'uso.
2. La reazione vera e propria inizia al momento dell'aggiunta dell'anticorpo specifico. Tuttavia, non utilizzare più di tre strip per il test per ogni singola pipetta. Con pipette multicanale è possibile utilizzare fino a 6 strip.
3. Riportare tutti i reagenti a 2 - 8 °C (36 - 46 °F) subito dopo l'uso.

Gli **standard di tossina T-2** sono forniti pronti all'uso. In etichetta è stato considerato un fattore di diluizione pari a 10, pertanto i valori di concentrazione della tossina T-2 possono essere letti direttamente sulla curva standard.

## 10.2. Procedura del test

È molto importante eseguire un'accurata procedura di lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino completamente tra i vari passaggi del test. La riproducibilità dei test EIA dipende in larga misura dal corretto lavaggio dei pozzetti: seguire pertanto scrupolosamente le istruzioni di lavaggio riportate nella procedura del saggio EIA.

Durante le incubazioni evitare di esporre i pozzetti alla luce diretta. Si raccomanda di coprire la micropiastra.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da analizzare. Registrarne le rispettive posizioni.
2. Pipettare nei diversi pozzetti 50 µl di standard o di campione preparato, utilizzando un puntale integro per ogni standard o campione.
3. Aggiungere sul fondo di ciascun pozzetto 50 µl di enzima coniugato (tappo rosso).
4. Aggiungere in ciascun pozzetto 50 µl della soluzione di anticorpo anti-Tossina-T-2 (tappo nero). Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 min. (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Svuotare i pozzetti in un lavandino. Rovesciare il supporto della micropiastra su un foglio di carta (per tre volte) per eliminare dai pozzetti tutto il liquido eventualmente rimasto. Con un flacone per il lavaggio o una pipetta multicanale riempire i pozzetti con acqua distillata o deionizzata (250 µl per pozzetto). Svuotare nuovamente i pozzetti ed eliminare tutto il liquido rimasto. Ripetere l'intera procedura altre due volte.
6. Aggiungere in ciascun pozzetto 100 µl di soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone). Miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 5 minuti (+/- 0.5) a temperatura ambiente (20 - 25 °C; 68 - 77 °F) e al buio.
7. Aggiungere in ciascun pozzetto 100 µl di soluzione di stop (tappo giallo). Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere i risultati entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.



## 11. Risultati

Per la valutazione dei saggi immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win/ RIDA®SOFT Win.net (Art. No. R9996).

Per determinazioni in singolo si raccomanda l'elaborazione logit-log, per una determinazione in doppio oppure multiplo va utilizzata invece un'elaborazione cubic spline.

Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione di Qualità incluso nel kit.

Nota per il calcolo in assenza del software:

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

Lo standard zero è così uguale al 100% e i valori di assorbanza sono calcolati in percentuale. Inserire i valori calcolati per gli standard in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro le concentrazioni di tossina T-2 espresse in µg/kg.

Le concentrazioni di tossina T-2 in µg/kg corrispondenti all'estinzione di ciascun campione possono essere lette sulla curva di calibrazione.

## 12. Sensibilità

### 12.1. Limite di rilevabilità

Il limite di rilevabilità (LOD) è stato analizzato con campioni di cereali e miscele di mangimi mediante misurazioni ripetute della matrice zero. Il LOD è stato definito come la concentrazione che corrisponde alla media delle assorbanze della misurazione–3 volte la deviazione standard, ed è stata calcolata per estrapolazione dalla curva standard. Tutti risultati sono rientrati tra 10 e 20 ppb.

### 12.2. Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (LOQ) è stato analizzato mediante ripetuti esperimenti di arricchimento al margine inferiore della curva standard; il LOQ è risultato pari a 50 µg/kg (ppb), una concentrazione che si trova ben al di sopra del LOD, e i valori di recupero corrispondenti sono risultati compresi tra il 70 and il 110 %, con valori di CV inferiori al 20 %.

R-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.