

r-biopharm®



RIDASCREEN® FAST DON

Art. R5901 (96 pozzetti)

Art. R5902 (48 pozzetti)

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo di deossinivalenolo



Federal Grain Inspection Services
CERTIFICATE NO. FGIS 2002 - 105

Test in vitro
Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
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

Marketing (0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330

info@r-biopharm.it – 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®FAST DON

Introduzione

RIDASCREEN® FAST DON (Art. R5901 kit 96 pozzetti; R5902 kit 48 pozzetti) è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio del deossinivalenolo in cereali, malto e mangimi.

Il test su frumento, orzo, malto d'orzo, avena e mais è stato approvato dall'Istituto di Ricerca dell'AOAC in accordo con il Performance Tested Method Program e il FGIS (Federal Grain Inspection Services) Program del Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration del Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti (USDA/GIPSA).

Tutti i reagenti necessari per l'esecuzione dell'analisi immunoenzimatica, compresi gli standard, sono contenuti nel kit.

Ogni kit contiene il necessario (compresi gli standard) per eseguire 96 o 48 determinazioni.

Per eseguire l'analisi quantitativa è necessario un lettore per micropiastre.

Preparazione campioni: estrazione e filtrazione

Tempo richiesto:: preparazione dei campioni (10 campioni) ca. 10 min
esecuzione del test (tempo d'incubazione).....8 min

Limite di rilevabilità: < 0.2 mg/kg (ppm)

Limite di quantificazione: 0,2 mg/kg (ppm) / avena: 0,36 mg/kg (ppm)

Al fine di aumentare la qualità della valutazione durante l'esecuzione di metodi ELISA, è disponibile la nostra guida Good ELISA Practice (GEP) che elenca gli standard minimi e le procedure concernenti le condizioni generali di utilizzo dei kit per analisi di R-Biopharm AG e di esecuzione dei test ELISA. Il manuale può essere recuperato, stampato e scaricato dal sito web <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Prodotti correlati

RIDASCREEN® FAST DON SC (R5905)

RIDASCREEN® DON (R5906)

RIDA® QUICK DON (R5604)

TRILOGY® Liquid Standard DON (TSL-317)

TRILOGY® Dried Standard DON (TS-310, TS-317)

1. Scopo

RIDASCREEN® FAST DON è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio del deossinivalenolo in cereali, malto e mangimi.

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. Tra le micotossine dei tricoteceni 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 proprietà citotossiche e immunosoppressive queste tossine rappresentano un rischio per la salute umana e degli animali.

3. Principio del test

La base del test è una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi di cattura specifici per gli anticorpi anti-deossinivalenolo.

Nei pozzetti si aggiungono gli anticorpi anti-deossinivalenolo, l'enzima coniugato al deossinivalenolo e gli standard di deossinivalenolo o le soluzioni campione. Il deossinivalenolo libero e quello coniugato all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (analisi immunoenzimatica competitiva). Allo stesso tempo gli anticorpi anti-deossinivalenolo sono anche legati agli anticorpi di cattura immobilizzati. Il coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. La soluzione di substrato/cromogeno viene aggiunta nei pozzetti, e il coniugato 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 con un lettore di micropiastre a 450 nm. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di deossinivalenolo nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene il materiale necessario per 91 (R5901) o 43 (R5902) determinazioni, più 5 determinazioni per gli standard, in particolare:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra M	-	Pronto all'uso		96 pozzetti (R5901) 48 pozzetti (R5902)
Standard 1*	Bianco	Pronto all'uso	0 mg/l	1.3 ml
Standard 2*	Bianco	Pronto all'uso	0.222 mg/l	1.3 ml
Standard 3*	Bianco	Pronto all'uso	0.666 mg/l	1.3 ml
Standard 4*	Bianco	Pronto all'uso	2 mg/l	1.3 ml
Standard 5*	Bianco	Pronto all'uso	6 mg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		6 ml (R5901) 3 ml (R5902)
Antibody	Nero	Pronto all'uso		6 ml (R5901) 3 ml (R5902)
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Il fattore di diluizione 20 per il campione è già stato considerato. Di conseguenza la concentrazione del deossinivalenolo nei campioni si può ricavare direttamente dalla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore per micropiastre (450 nm)
- cilindro graduato da 100 ml in plastica o vetro (1 litro)
- vetreria per l'estrazione del campione: imbuto e matraccio da 50 ml
- tritratore (macinino)
- Ultra-Turrax o equivalente
- Agitatore: facoltativo
- carta da filtro: Whatman No. 1 o equivalente
- micropipette da 20-200 µl e 200-1000 µl a volume variabile

5.2. Reagenti:

– acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test dovrebbe essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Gli standard contengono DON: maneggiarli con attenzione. Evitare il contatto dei reagenti con la pelle (indossare i guanti).

La decontaminazione della vetreria e delle soluzioni contenenti la tossina deve essere eseguita con una soluzione di ipoclorito di sodio (10% v/v) per una notte (portare il pH della soluzione a 7 con l'aggiunta di HCl.).

Il kit può contenere sostanze pericolose. Per ulteriori informazioni sulla sostanze contenute, far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) scaricabile direttamente online al sito www.r-biopharm.com

7. Conservazione

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

Riporre i pozzetti non utilizzati nella custodia originale, richiudere con il dissecante in dotazione e conservare a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno, di colore rosso, è fotosensibile: evitare di esporla a luce diretta.

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

Il kit può essere utilizzato almeno fino alla data di scadenza indicata sulla confezione, se conservato correttamente.

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 0,8 ($A_{450\text{ nm}} < 0,8$)

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in un luogo fresco e protetto dalla luce. Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-25°C/ 98-77°F) prima dell'uso.

Si consiglia di prelevare un campione rappresentativo (secondo le comuni tecniche di campionamento), macinarlo e miscelarlo accuratamente, prima di procedere all'estrazione.

- pesare 5 g di campione macinato e introdurlo in un adeguato contenitore con 100 ml di acqua distillata *)
- miscelare il campione con ultra-turrax (o equivalente) per due minuti oppure agitare energicamente per 3 minuti manualmente o con l'agitatore
- filtrare l'estratto con un filtro di carta Whatman N. 1 o equivalente
- utilizzare 50 µl del filtrato per ogni pozzetto

*) Si può aumentare la quantità di campione, se necessario: in tal caso aggiustare il volume di acqua distillata, ad es. 25 g in 500 ml di acqua distillata o 50 g in 1000 ml di acqua distillata

Metodo di estrazione USDA/GIPSA

- pesare 50 g del campione macinato e addizionarlo in un opportuno contenitore a 250 ml di acqua distillata
- miscelare per due minuti in Ultra-Turrax (o equivalente) o agitare bene per tre minuti, manualmente o mediante agitatore
- filtrare l'estratto con un filtro Whatman No. 1 (o equivalente)
- diluire il filtrato ottenuto 1:4 (1+3) con acqua distillata (ad es. 1 ml di estratto con 3 ml di acqua distillata)
- utilizzare 50 µl del filtrato diluito per ogni pozzetto

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 ha inizio con l'aggiunta degli anticorpi specifici. Non utilizzare nel test più di tre strip se si usa una pipetta monocanale. È possibile usarne fino a 6 qualora si impieghi una pipetta multicanale.
3. Riportare tutti i reagenti a 2-8°C (35-46°F) immediatamente dopo il loro utilizzo.

Gli **standard di deossinivalenolo** sono forniti già pronti per l'uso. Nella concentrazione dichiarata in etichetta il fattore di diluizione 20 per il campione è già stato considerato, di conseguenza la concentrazione di deossinivalenolo nei campioni si può ricavare direttamente sulla curva standard.

Il kit contiene una confezione di bustine di **sale per il lavaggio**. Sciogliere una bustina del tampone PBS incluso nel kit (vedi cap. 4.) in 1 litro di acqua distillata. La soluzione così preparata scade dopo circa 4-6 settimane se conservata a 2-8°C (35-46°F).

In alternativa: Disciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10 volte. Utilizzare 1 parte di questa soluzione concentrata e scioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta all'uso.

La soluzione concentrata scade dopo ca. 8-12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

È molto importante lavare accuratamente i pozzetti ed evitare che si asciughino completamente. Evitare intervalli protratti tra un passaggio e l'altro del test. La riproducibilità dei saggi immunoenzimatici è strettamente dipendente dall'accuratezza dei lavaggi dei pozzetti, pertanto eseguire la procedura di lavaggio scrupolosamente, come indicato nelle relative istruzioni.

Evitare di esporre la micropiastra a luce diretta durante tutte le incubazioni. A tal fine si raccomanda di coprire la micropiastra.

1. Inserire nel supporto un numero di pozzetti sufficiente per l'analisi sia degli standard che dei campioni e registrare le rispettive posizioni.
2. Pipettare 50 µl di soluzione standard o di campione in ogni pozzetto utilizzando un nuovo puntale per ogni soluzione standard e per ogni campione.
3. Aggiungere 50 µl di enzima coniugato in ogni pozzetto.
4. Aggiungere 50 µl di anticorpo in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 5 minuti (+/-1) a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare. Capovolgere la piastra capovolta su carta assorbente e picchiettarla per eliminare ogni residuo di liquido. Ripetere l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti (250 µl per ciascun pozzetto) con acqua distillata o deionizzata (tampone di lavaggio per campioni di frumento, vedi par. 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio altre due volte.
6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 3 minuti (+/-0,5) a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. 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 delle analisi eseguite con i kit RIDASCREEN® ELISA è possibile utilizzare un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win (Art.No Z9999).

Per singole determinazioni si raccomanda l'utilizzo della valutazione logit/log, per doppie o multiple determinazioni l'impiego della cubic spline.

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

Nota per il calcolo eseguito senza l'utilizzo dell'apposito 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 deossinivalenolo espresse in mg/kg.

Leggere quindi la concentrazione di deossinivalenolo in mg/kg corrispondente all'estinzione di ogni campione sulla curva di calibrazione.

12. Limite di rilevazione e limite di quantificazione

Il limite di rilevazione (LOD) in vari campioni è stato misurato varie volte (n=10) su campioni bianchi di vari prodotti.

LOD = media delle concentrazioni + 2 x deviazione standard dei valore misurato

Il limite di quantificazione corrispondente (LOQ) è stato calcolato come LOQ = media delle concentrazioni + 10 x deviazione standard dei valore misurato.

valori (ppb), n = 10	frumento	orzo	malto d'orzo	avena	mais
media	26.3	4.6	30.7	78.0	27.6
deviazione standard	14.1	3.8	15.9	28.2	11.5
LOD	54	12	62	134	51
LOQ	167	42	190	360	143

Tutti i valori LOD sono risultati nettamente inferiori a 0,2 ppm. Il LOQ può essere considerato circa 0,2 ppm (standard 2), a parte il caso dell'avena (0,36 ppm).

13. Specificità

1. tempo necessario per il test (tempo di incubazione): 8 minuti
2. ambito di misurazione: 0,2 – 6,0 ppm
3. matrici approvate: frumento, orzo, malto d'orzo, avena, mais
4. altre matrici validate: farina di frumento, farinetta di frumento, crusca di frumento, sorgo, fiocchi di soia, prodotti a base di soia, mangimi animali misti
5. specificità: il test non è in grado di differenziare il DON dal 3-acetilDON (cross-reattività del 213%), mentre mostra cross-reattività molto bassa o assente nei confronti di altre molecole correlate, come nivalenolo, 15-acetilDON, triacetilDON, triacetilnivalenolo, tetraacetilDON e fusarenone X

Accuratezza e precisione su campioni di frumento contaminati artificialmente (n = 90, per ogni livello)

Contaminazione (ppm)	0.5	1.0	2.5	5.0
media (ppm)	0.53	1.0	2.4	4.1
deviazione standard (ppm)	0.1	0.22	0.24	0.44

Test comparativo su campioni di frumento rispetto a HPLC (metodo di riferimento)

ELISA	media	0.84	4.02	2.30
(n = 30)	deviazione standard	0.16	0.33	0.15
HPLC	media	0.6	3.88	2.28
(n = 5)	deviazione standard	0.12	0.50	0.16

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.