

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST Zearalenon**

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo di  
Zearaleone

Art. No.: R5502

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<sup>®</sup>FAST Zearalenon

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Zearalenon (Cod. R5502) è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio quantitativo dello zearalenone nei cereali e nei mangimi.

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 48 determinazioni.

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

Tecnici con esperienza non necessitano di un addestramento particolare per eseguire l'analisi con il kit RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Zearalenon, tuttavia a richiesta è fornito gratuitamente tutto il supporto necessario.

Il test è stato validato con matrici diverse di cereali e alimenti composti.

Preparazione campioni: estrazione, filtrazione e diluizione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni)  
cereali e mangimi .....ca. 10 min.  
esecuzione del test (tempo d'incubazione) .....15 min.

Limite di rilevabilità: 17-41 µg/kg (ppb)

Limite di quantificazione: 50 µg/kg (ppb)

## 1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Zearalenon è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio quantitativo di zearalenone nei cereali e nei mangimi.

## 2. Generale

Lo zearalenone è una micotossina prodotta dai funghi del genere *Fusarium*.

Lo zearalenone è un fitormone che, oltre ad avere proprietà anaboliche, mostra principalmente effetti estrogenici. Proprio per quest'ultima caratteristica, lo zearalenone può causare disturbi della fertilità negli animali con segni clinici di iperestrogenismo – un aspetto di una malattia che, benché riferita soprattutto nei suini, viene descritta anche in altre specie, quali bovini, cavalli e ovini.

Il rischio potenziale per la salute umana indotto da questa micotossina, che può essere ingerita con alimenti di origine sia vegetale che animale, è stato ampiamente documentato.

## 3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi di cattura specifici diretti contro gli anticorpi anti-zearalenone. Nei pozzetti si aggiungono anticorpi specifici per zearalenone, l'enzima coniugato a zearalenone e gli standard di zearalenone o le soluzioni di campioni. Lo zearalenone libero e quello coniugato all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (saggio immunoenzimatico competitivo). Allo stesso tempo gli anticorpi anti-zearalenone sono anche legati agli anticorpi di cattura immobilizzati. Il coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. La soluzione di substrato/cromogeno è aggiunta nei pozzetti, e il coniugato legato trasforma il cromogeno rosso 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 zearalenone del campione.

## 4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene il materiale necessario per 43 analisi (a cui si aggiungono le 5 analisi degli standard). In particolare:

- 1X Micropiastra da 48 pozzetti (6 strip con 8 pozzetti utilizzabili singolarmente) rivestiti con anticorpi di cattura
- 5X soluzioni standard di zearalenone \*), 1,3 ml ognuna  
0 ppb (standard zero), 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb  
in metanolo/acqua, pronte all'uso
- 1X coniugato (3 ml) ..... tappo rosso  
zearalenone coniugato con perossidasi, pronto all'uso
- 1X anticorpi antizearalenone (3 ml) .....tappo nero  
monoclonali, pronti all'uso
- 1X substrato/cromogeno (10 ml) .....tappo marrone  
soluzione rossastra
- 1X soluzione di stop (14 ml) ..... tappo giallo  
contiene acido solforico 1N

\*) Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato. Pertanto la concentrazione dello zearalenone 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
- vetreria per l'estrazione del campione: imbuto e matraccio da 50 ml
- tritratore (macinino)
- agitatore, facoltativo
- carta da filtro: Whatman No. 1 o equivalente
- micropipette da 50 µl, 100 µl e 1000 µl

### 5.2. Reagenti:

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

## 6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Gli standard contengono zearalenone: evitare il contatto dei reagenti con la cute (utilizzare i guanti).

La decontaminazione della vetreria e delle soluzioni contenenti zearalenone 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).

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

## 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 insieme al dissecante in dotazione e conservare a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione rossastra substrato/cromogeno è fotosensibile: evitare di esporla alla luce diretta.

Non si applica alcuna garanzia di qualità dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

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

Non scambiare i singoli reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno, normalmente rossastra, 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 un luogo fresco e protetto dalla luce. Macinare un campione rappresentativo (ottenuto secondo le comuni tecniche di campionamento) e mescolarlo accuratamente prima di procedere all'estrazione.

- pesare 5 g del campione macinato ed addizionarlo in un opportuno contenitore a 25 ml di metanolo 70% \*)
- agitare bene per tre minuti, manualmente o mediante agitatore
- filtrare l'estratto con un filtro Whatman No. 1
- diluire 1 ml del filtrato ottenuto con 1 ml di acqua distillata o deionizzata utilizzare 50 µl del filtrato per ogni pozzetto

\*) La quantità di campione può essere aumentata se necessario, ma deve essere aumentato corrispondentemente anche il volume di metanolo/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 ha inizio con l'aggiunta degli anticorpi specifici. Non utilizzare nel test più di tre strip per volta se si usa una pipetta monocanale. Nel caso si impieghi una pipetta multicanale è possibile utilizzare fino a 6 strip.
3. Riportare tutti i reagenti a 2-8°C (35-46°F) immediatamente dopo il loro utilizzo.

Gli **standard di zearalenone** sono forniti pronti all'uso. Il fattore di diluizione 10 è già stato considerato in etichetta, pertanto la concentrazione di zearalenone dei campioni può essere letta direttamente sulla curva standard.

### 10.2. Procedura per l'esecuzione del test

È molto importante lavare accuratamente i pozzetti ed evitare che si asciugano 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 (flacone con tappo rosso) sul fondo di ciascun pozzetto.
4. Aggiungere 50 µl di anticorpo specifico per zearalenone (flacone con tappo nero) in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti ( $\pm 1$ ) a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti picchiando la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido. Ripetere per tre volte. Riempire i pozzetti con acqua distillata o deionizzata utilizzando una spruzzetta o una pipetta multicanale (250 µl per pozzetto) ed eliminare nuovamente il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio altre due volte.
6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno (flacone con tappo marrone) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 5 minuti ( $\pm 0,5$ ) a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop (flacone con tappo giallo) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra 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 (Cod. 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 zearalenone espresse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

La concentrazione di zearalenone in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  corrispondente all'assorbanza di ciascun campione può essere ricavata direttamente dalla curva di calibrazione.

## 12. Sensibilità

### 12.1. Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LOD) è stato analizzato in campioni di cereali e mangimi misti mediante ripetute misurazioni della matrice zero. Il LOD è stato definito come la concentrazione corrispondente alla somma tra il valore medio misurato dell'assorbanza e il triplo del valore della deviazione standard, e determinato per interpolazione dalla curva standard. Tutti i risultati sono risultati compresi tra 17 e 41  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb).

### 12.2. Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (LOQ) è stato studiato in numerosi esperimenti di spiking al limite inferiore della curva standard; detto limite è stato individuato a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb), una concentrazione ben superiore al limite di rilevazione (LOD), mentre le percentuali di recupero corrispondenti sono state individuate in un intervallo compreso tra 64 e 97%, con valori 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