

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

Saggio immunoenzimatico per l'analisi quantitativa  
dello zearalenone

Cod. R5505

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 Zearalenon SC

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Zearalenon SC (Cod. R5505) è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dello zearalenone in campioni di cereali.

Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – 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.

Non è necessario alcun corso specialistico per l'esecuzione del test RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Zearalenon SC, tuttavia su richiesta è possibile avere un supporto gratuito da parte dei distributori del prodotto.

Preparazione del campione: estrazione, filtrazione, diluizione

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

Limite di rilevabilità: (corrispondente alla sostanza standard)	5 µg/kg (ppb)  Il limite di rilevabilità (LOD) è stato studiato con misurazioni ripetute (n=10) di bianco campioni di mais (concentrazione media + 2 volte la deviazione standard: 2.4 + 2 x 1.4).
--	--

Limite di quantificazione: (corrispondente alla sostanza standard)	16 µg/kg (ppb)  Il limite di quantificazione (LOQ) è stato studiato con misurazioni ripetute (n=10) dei bianco campioni di mais (concentrazione media + 10 volte la deviazione standard: 2.4 + 10 x 1.4).
---	---

## 1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Zearalenon SC è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dello zearalenone in campioni di cereali.

## 2. Generale

Lo zearalenone è una micotossina prodotta da muffe del genere *Fusarium*.

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

Alla base del test vi è una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi di cattura diretti contro gli anticorpi anti-zearalenone.

Vengono aggiunti lo standard zero o le soluzioni campione, lo zearalenone coniugato all'enzima e gli anticorpi anti-zearalenone. Lo zearalenone libero e quello coniugato all'enzima competono per legarsi ai siti di legame degli anticorpi anti-zearalenone (analisi immunoenzimatica competitiva). Al tempo stesso, gli anticorpi anti-zearalenone si legano anche agli anticorpi di cattura immobilizzati. L'enzima coniugato non legato è eliminato con un lavaggio. Nei pozzetti viene quindi aggiunta la soluzione substrato/cromogeno, e l'enzima coniugato legato converte 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 zearalenone nel campione.

## 4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 47 analisi (più 1 analisi dello standard).  
Ciascun kit contiene:

- 1 x Micropiastra con 48 pozzetti (6 strip da 8 pozzetti ciascuna)  
rivestiti con anticorpi di cattura contro gli anticorpi anti-zearalenone
- 1 x Standard di zearalenone <sup>\*</sup>), 1.3 ml  
0 ppb (standard zero)  
in soluzione di metanolo/acqua, pronto all'uso
- 1 x Coniugato (3 ml)..... tappo rosso  
zearalenone coniugato con perossidasi  
pronto all'uso
- 1 x Anticorpo anti-zearalenone (3 ml) .....tappo nero  
monoclonale, pronto all'uso
- 1 x Substrato/cromogeno (10 ml).....tappo marrone  
colore rosso
- 1 x Soluzione di stop (14 ml)..... tappo giallo  
contiene acido solforico 1 N

\*) Nel kit è incluso solamente lo standard 1 (standard zero). La curva standard (B/B<sub>0</sub>) è fornita col certificato del kit. Per il calcolo dei risultati vedi 11. Risultati.

## 5. Materiale richiesto ma non fornito

### 5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- misurino graduato da 100 ml, in plastica o vetro
- vetreria per la preparazione dell'estratto del campione: imbuto filtrante e beuta da 50 ml
- macinino
- miscelatore (opzionale)
- carta da filtro Whatman N° 1 o equivalente
- micropipette da 50 µl, 100 µl e 1000 µl

### per metodo di estrazione USDA/GIPSA

- ultra-turrax (o equivalente)
- filtro siringa (JM 1000 o equivalente)

## 5.2. Reagenti:

- metanolo
- soluzione di metanolo al 70%: miscelare 70 ml di metanolo al 100% con 30 ml di acqua distillata
- acqua distillata o deionizzata

## 6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test deve essere eseguito da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere lette scrupolosamente.

Decontaminare la vetreria e le soluzioni di zearalenone immergendole in una soluzione di ipoclorito di sodio al 10 % (v/v) per una notte (regolare la soluzione 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 conservarli a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La soluzione 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.

Prelevare un campione rappresentativo secondo le tecniche di campionamento normalmente accettate, macinarlo e miscelarlo accuratamente prima di procedere alla procedura di estrazione.

- pesare 5 g di campione macinato e addizionarlo in un idoneo contenitore contenente 25 ml di metanolo al 70% \*)
- agitare energicamente per 3 minuti manualmente o con miscelatore si raccomanda di eseguire l'estrazione con un miscelatore o un frullatore
- filtrare l'estratto con un filtro Whatman N°1 o equivalente
- diluire 1 ml del filtrato ottenuto con 1 ml di acqua distillata o deionizzata
- nel saggio utilizzare 50 µl di filtrato per ogni pozzetto

\*) è possibile aumentare il quantitativo di campione da analizzare incrementando proporzionalmente il volume della soluzione metanolo/acqua (es. 10 g in 50 ml di metanolo al 70%)

### metodo di estrazione USDA/GIPSA:

- introdurre 50 g di campione macinato in un idoneo contenitore e aggiungervi 250 ml di metanolo al 70%
- miscelare il campione con ultra-turrax (o equivalente) per due minuti oppure agitare energicamente per tre minuti manualmente o con un miscelatore
- filtrare l'estratto con un filtro siringa (JM 1000 o equivalente): versare l'estratto del campione nella siringa fino a 1 cm dall'imboccatura; con lo stantuffo spingere ca. 1.5 ml dell'estratto attraverso il filtro
- raccogliere l'estratto filtrato in una provetta pulita
- diluire 1 ml del filtrato così ottenuto con 1 ml di acqua distillata o deionizzata
- nel saggio utilizzare 50 µl del filtrato diluito per ogni pozzetto

### **Nota:**

**I campioni che risultano esterni all'intervallo, >1000 µg/kg (ppb) devono essere diluiti – ad esempio 1:3 (1+2) con metanolo/acqua (35/65) – per poter ottenere risultati corretti. Il fattore di diluizione 3 che ne risulta deve essere tenuto in considerazione nel calcolo dei risultati (ovvero, i risultati devono essere moltiplicati per 3).**

## 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 con l'aggiunta dell'anticorpo specifico. È bene tuttavia non impiegare nel test più di tre strip per ogni pipetta monocanale. È invece possibile impiegare fino a 6 strip se si utilizza una pipetta multicanale.
3. Riporre tutti i reagenti a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) subito dopo l'uso.

Lo **standard 1 di zearalenone (0 ppb)** è fornito pronto all'uso. I valori di B/B<sub>0</sub> degli standard di diluizione da 2 a 7 (25, 50, 100, 200, 400 e 1000 ppb) sono riportati nel certificato del test. La curva standard è calcolata con l'utilizzo di RIDA<sup>®</sup>SOFT Win (vedi capitolo 11.) sulla base di questi valori. Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato per il calcolo.

### 10.2. Procedura del test

È molto importante eseguire un'accurata procedura di lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino completamente ed evitare intervalli protratti tra le varie fasi del test. La riproducibilità dei test EIA dipende in larga misura dall'accuratezza con cui vengono lavati i pozzetti. Seguire attentamente la sequenza dei lavaggi descritta nella procedura del saggio.

Durante le incubazioni evitare di esporre la micropiastra a luce diretta. Si consiglia di coprirla.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per lo standard e i campioni da analizzare. Registrare le posizioni dello standard e dei campioni.
2. Pipettare separatamente nei pozzetti 50 µl di standard o di campione preparato, utilizzando un puntale nuovo per lo standard o per ciascun campione.
3. Aggiungere in ogni pozzetto 50 µl di enzima coniugato (tappo rosso).
4. Aggiungere 50 µl di soluzione di anticorpi anti-zearalenone (tappo nero). Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 10 min. (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti. Capovolgere la piastra su carta assorbente e picchiettarla per eliminare ogni residuo di liquido. Ripetere l'operazione per



tre volte. Con un flacone per il lavaggio o una pipetta multicanale riempire i pozzetti (250 µl per ciascun pozzetto) con acqua distillata o deionizzata. Svuotare nuovamente i pozzetti per eliminare il liquido rimasto. Ripetere la procedura di lavaggio altre due volte.

6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno (tappo marrone) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 5 minuti (+/-0.5) a temperatura ambiente (20-25 °C / 68-77 °F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop (tappo giallo) 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 il calcolo dei risultati è necessario inserire nel software RIDA<sup>®</sup>SOFT Win i valori di assorbanza misurati per lo standard 1 (0 ppb) e i valori di B/B<sub>0</sub> per gli standard da 2 a 7 (25, 50, 100, 200, 400 e 1000 ppb) forniti col certificato incluso nel kit. Il software calcola la curva standard e il contenuto di zearalenone nei campioni.

### Nota:

**Per la valutazione dei saggi ELISA RIDASCREEN<sup>®</sup> è disponibile un apposito software, sviluppato da R-Biopharm, che agevola il calcolo dei risultati.**

**RIDA<sup>®</sup>SOFT Win / RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net (Cod. Z9996) può essere ordinato al proprio distributore di zona oppure, se già in vostro possesso, è possibile richiedere l'aggiornamento gratuito.**

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.