

RIDASCREEN[®] Zearalenon

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo
di Zearalenone

Art. No.: R1401

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

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 Melegnani 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[®] Zearalenon

Introduzione

RIDASCREEN[®] Zearalenon (Cod. R1401) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dello zearalenone nei cereali, nei mangimi, nella birra, nel siero e nelle urine.

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.

Preparazione campioni: cereali e mangimi: estrazione, filtrazione e diluizione
birra: rimozione della CO₂ e diluizione
siero e urine: purificazione cromatografica con RIDA[®] C18 column (cod. R2002)

Tempo richiesto:: preparazione dei campioni (10 campioni)
cereali e mangimi ca. 20 min
birra..... ca. 10 min
siero e urine ca. 3.5 h
esecuzione del test (tempo d'incubazione).....2.5 h

Limite di rilevabilità: cereali e mangimi ca. 1750 ppt
(corrispondente alla birra..... ca. 250 ppt
sostanza standard) siero e urine ca. 50 ppt

Valori di recupero: campioni arricchiti di cereali e di mangimi ...ca. 80 %
(corrispondente alla (coefficiente di variazione medio =15%)
sostanza standard)

Specificità: La specificità del kit RIDASCREEN[®] Zearalenon è stata stabilita analizzando la cross reattività con le micotossine corrispondenti.

Zearalenone 100 %
 α -Zearalenolo..... ca. 41.6 %
Zeranolo (Zearalanolo) ca. 27.7 %
 β -Zearalenolo ca. 13.8 %

1. Scopo

RIDASCREEN® Zearalenon è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di residui di zearalenone nei cereali, nei mangimi, nella birra, nel siero e nelle urine.

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 coattati con anticorpi di cattura anti-zearalenone. Vi si aggiungono gli standard o i campioni e lo zearalenone coniugato con enzima. Lo zearalenone libero e quello coniugato competono per i siti di legame degli anticorpi coattati (immunodosaggio enzimatico competitivo). L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Successivamente vengono aggiunti ai pozzetti ed incubati il substrato enzimatico (urea-perossidasi) ed il cromogeno (tetrametilbenzidina). L'enzima coniugato legato converte il cromogeno incolore in un prodotto azzurro. 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 zearalenone nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 analisi (incluse le analisi degli standard). Ogni kit contiene:

- 1 x Micropiastra da 96 pozzetti (12 strip da 8 pozzetti ciascuna)
rivestiti con anticorpi anti-zearalenone
- 6 x Soluzioni standard (1.3 ml ognuna)
0 ppt (standard zero), 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt, 4050 ppt
di zearalenone in soluzione acquosa
- 1 x Coniugato (0.7 ml)..... tappo rosso
zearalenone coniugato con perossidasi, concentrato
- 1 x Substrato (7 ml) tappo verde
contiene perossido d'urea
- 1 x Cromogeno (7 ml) tappo blu
contiene tetrametilbenzidina
- 1 x Soluzione di stop (14 ml) tappo giallo
contiene acido solforico 1N
- 1 x tampone 1 (50 ml) tappo bianco
diluente del campione e del coniugato

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- macinino
- shaker
- vetreria per la preparazione degli estratti: imbuto e contenitore da 100 ml
- carta da filtro: Whatman 1 o equivalente
- centrifuga
- evaporatore rotante o strumentazione per l'evaporazione dei solventi
- pipette Pasteur
- pipette graduate
- micropipette da 20 µl – 200 µl e 200-1000 µl a volume variabile

5.2. Reagenti:

–metanolo p.a.

reagenti aggiuntivi per la preparazione dei campioni di siero/urine:

- Glucuronidasi/arilsolfatasi di Helix Pomatia (Merck, cod. 4114)
- tampone sodio acetato 50 mM, pH 4,8
- tampone Tris 20mM, pH 8,5 / metanolo (80/20)
- RIDA[®] C18 column (Cod.: R2002)

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio esperto, seguendo attentamente le istruzioni per l'uso fornite.

Le soluzioni standard contengono zearalenone. Prestare particolare cura nel maneggiarle. Evitare il contatto del reagente con la cute. Utilizzare i guanti.

Decontaminare la vetreria e le soluzioni contenenti le tossine con una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) (10% (v/v) per una notte – 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).

Lo zearalenone è fotosensibile, pertanto evitare di esporre le soluzioni alla luce diretta.

Il cromogeno incolore è fotosensibile, di conseguenza evitarne l'esposizione alla luce diretta.

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

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

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione della soluzione col cromogeno prima del test
- Valori inferiori a 0,6 unità di assorbanza ($A_{450nm} < 0,6$) per lo standard 0

9. Preparazione dei campioni

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

9.1. Cereali e mangimi

Triturare / macinare e miscelare una quantità rappresentativa di campione.

- in un contenitore adeguato pesare 5 g di campione tritato e aggiungere 25 ml di metanolo/acqua (70/30) *)
- agitare energicamente per 3 minuti (manualmente o con uno shaker)
- centrifugare l'estratto per 10 minuti a 3500 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) oppure filtrarlo con carta da filtro Whatman 1
- diluire in surnatante oppure il filtrato 1:7 (1+6) con il diluente dei campioni (tampone 1), ad es. miscelando 100 µl di surnatante o filtrato e 600 µl di tampone 1 **)
- nel saggio utilizzare 50 µl di surnatante o filtrato diluito per ogni pozzetto

*) se necessario, la quantità di campione può essere aumentata a condizione che venga aumentata proporzionalmente la quantità di metanolo/acqua aggiunta, es. 10 g in 50 ml di metanolo/acqua (70/30)

***) Gli estratti diluiti di campioni di frumento possono risultare torbidi portando così, talvolta, ad una riduzione dei valori di recupero. Si consiglia pertanto di centrifugare gli estratti diluiti ad alta velocità (3 min / 20000 g / temperatura ambiente (20 - 25 ° C / 68 -77 ° F)) ed utilizzare 50 µl del surnatante limpido nel test.

Nota:

L'estratto metanolico (surnatante o filtrato) può essere conservato a 2-8°C (35-46°F) per circa 2 settimane e a -20°C per circa 2 mesi. Conservare l'estratto ben sigillato in un contenitore di vetro (vetro ambrato) e al riparo dalla luce.

Se si sospettano alte concentrazioni di zearalenone, diluire ulteriormente i campioni nel tampone di diluizione del campione (tampone 1).

9.2. Birra

- utilizzare un volume adeguato di birra e rimuovere l'eccesso di CO₂ fino a che non si osserva più la formazione di bolle (mediante agitazione o filtrazione)
- diluire quindi il campione 1:5 (1+4) con il diluente dei campioni (tampone 1) (esempio 100 µl di campione + 400 µl di tampone 1)
- nel saggio utilizzare 50 µl per pozzetto

Nota:

In caso di estratti torbidi si consiglia la filtrazione in ambiente sterile dei campioni prima del loro utilizzo nel test!

9.3. Siero/urina

Preparazione delle urine:

- diluire 0,5 ml di urina con 3 ml di tampone acetato 50 mM, pH 4,8
- aggiungere 8 µl di glucuronidasi/arilsolfatasi di Helix Pomatia
- incubare la soluzione a 37°C (98°F) per 3 ore

Purificare 3,5 ml di urina idrolizzata oppure 0,5 ml di siero (senza alcuna preparazione) mediante le RIDA[®] C18 column (cod. R2002):

- flusso: 1 goccia /secondo
- lavare la colonna con 3 ml di metanolo (100%)
- equilibrare la colonna con 2 ml di tampone Tris 20 mM, pH 8,5 / metanolo (80/20)
- applicare 3,5 ml di urina idrolizzata oppure 0,5 ml di siero
- lavare la colonna con 2 ml di tampone Tris 20 mM, pH 8,5 / metanolo (80/20)
- lavare la colonna con 3 ml di metanolo (40%)
- asciugare la colonna per 1 minuto con flusso di aria o di azoto
- eluire il campione lentamente (15 gocce/minuto) con 1 ml di metanolo (80%)
- portare l'eluato a secco a una temperatura massima di 60°C (140°F) (possibilmente mediante un debole flusso di azoto e sotto cappa chimica)
- sciogliere il residuo secco con 50 µl di metanolo, aggiungere poi 450 µl di diluente del campione (tampone 1) e miscelare con cura
- nel saggio utilizzare 50 µl per pozzetto

Nota: Sono disponibili inoltre su richiesta i metodi di preparazione per campioni di latte e carne. Per maggiori informazioni contattare il proprio rivenditore locale.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

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

Lo **zearalenone coniugato con enzima** (flacone con il tappo rosso) è fornito concentrato. Poiché l'enzima coniugato ha una stabilità limitata, è bene ricostituire solo la quantità necessaria ad effettuare il dosaggio. Prima di pipettare l'enzima, agitarlo accuratamente. Ricostituire l'enzima coniugato diluendolo 1:11 (1+10) nel tampone 1 (flacone con tappo bianco, es. 200 µl di coniugato concentrato + 2 ml di tampone, sufficiente per 4 strip).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare il prosciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard e ai campioni.
2. Pipettare 50 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti da eseguire in duplicato.
3. Pipettare 50 µl di enzima coniugato diluito in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 2 ore a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) al buio.
4. Svuotare i pozzetti del liquido in essi contenuto, rovesciare la piastra su un foglio di carta assorbente e picchiettarla energicamente in modo da eliminare tutto il liquido. Ripetere l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti con 250 µl di acqua distillata ed eliminare poi nuovamente il liquido come descritto sopra. Ripetere la procedura di lavaggio per due volte.
5. In ogni pozzetto pipettare 50 µl di substrato e 50 µl di cromogeno. Agitare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
6. Pipettare 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 60 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 è consigliabile l'impiego di una valutazione logit/log, per determinazioni doppie o multiple l'utilizzo della funzione cubic spline.

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

Nota per il calcolo in assenza dell'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 un grafico semilogaritmico contro la concentrazione equivalente di zearalenone in ng/kg.

Dalla curva di calibrazione calcolare poi le concentrazioni di zearalenone in ng/kg corrispondenti alle assorbanze dei campioni..

Per ottenere la concentrazione in ng/kg di zearalenone 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 e mangimi	35
birra.....	5
siero e urine	1

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.