

RIDASCREEN[®] FAST Zearalenon

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Zearalenon

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
zearalenone

Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de
zearalenona

Art. No.: R5502

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Almacenar entre 2 - 8°C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

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

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®] and RIDASCREEN[®]
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDA[®] y RIDASCREEN[®]
son marcas registradas de la empresa R-Biopharm AG
Fabricante: R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG está certificada por el ISO 9001.

RIDASCREEN[®]FAST Zearalenon

Información breve

El RIDASCREEN[®]FAST Zearalenon (Art. No.: R5502) es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de zearalenona en cereales y piensos.

Todos los reactivos requeridos para el inmunoensayo enzimático - incluyendo los estándares - están contenidos en el kit.

Un kit alcanza para 48 determinaciones (incluyendo los estándares). Para cuantificar se requiere un espectrofotómetro de microplaca.

No se necesita una formación especializada para la ejecución del test RIDASCREEN[®]FAST Zearalenon. Sin embargo el distribuidor ofrece un soporte técnico gratuito.

La prueba ha sido validada con varios cereales y piensos.

Preparación de muestra: extracción, filtración y dilución

Tiempo requerido: preparación de muestra (para 10 muestras)
cereales y piensos..... aprox. 10 min
implementación del test
(tiempo de incubación) 15 min

Límite de detección: 17 - 41 µg/kg (ppb)

Límite de cuantificación: 50 µg/kg (ppb)

1. Fin del uso

El RIDASCREEN®FAST Zearalenon es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de zearalenona en cereales y piensos.

2. Generalidades

Zearalenona es una micotoxina producida por el hongo del género *Fusarium*. Zearalenona es también una fitohormona que presenta, además de sus propiedades anabólicas, principalmente efectos estrogénicos. Debido a sus propiedades estrogénicas, la zearalenona puede provocar desórdenes de fertilidad en animales con signos clínicos de hiperestrogenismo - enfermedad que aunque se reporta principalmente en cerdas, también se encuentra en otras especies como vacas, caballo y ovejas.

El riesgo potencial para el ser humano de ingerir esta micotoxina a través de alimentos de origen animal o vegetal se discute ampliamente.

3. Principio del ensayo

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-zearalenona. Se agregan los estándares de zearalenona y las soluciones de muestras, el conjugado zearalenona-enzima y los anticuerpos anti-zearalenona. La zearalenona libre y el conjugado zearalenona-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-zearalenona (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-zearalenona se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado. Se agrega substrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de zearalenona en la muestra.

4. Reactivos provistos

Con los reactivos de un kit se pueden realizar 43 determinaciones (+ determinación de los 5 estándares). Cada kit contiene:

- 1 x Placa con 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 pocillos separables) recubiertos con anticuerpos de captura
- 5 x Estándares ^{*}), 1.3 ml cada uno
0 ppb (estándar cero), 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb de zearalenona en metanol/agua, listo para su uso
- 1 x Conjugado (3 ml).....tapón rojo conjugado zearalenona-peroxidasa, listo para su uso
- 1 x Anticuerpo anti-zearalenona (3 ml)tapón negro monoclonal, listo para su uso
- 1 x Solución de substrato/cromógeno (10 ml)tapón marrón rojiza
- 1 x Solución stop (14 ml) tapón amarillo contiene una solución de ácido sulfúrico 1 N

^{*}) El factor de dilución 10 que se produce durante la preparación de las muestras ya fue tomado en cuenta en la indicación de las concentraciones. De esta forma se puede leer directamente la concentración de zearalenona de las muestras a partir de la curva de los estándares.

5. Reactivos requeridos pero no provistos

5.1. Equipamiento:

- espectrofotómetro para placas portapocillos(450 nm)
- probeta graduada de 100 ml de plástico o de vidrio
- para la preparación de las muestras: embudo de filtrado y un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml
- molino para desmenuzar las muestras
- opcional: agitador
- papel de filtro: Whatman No. 1 o equivalente
- micropipetas de 50 µl, 100 µl y 1000 µl

5.2. Reactivos:

- metanol
- Solución de metanol al 70 %: mezclar 70 ml de metanol (100 %) con 30 ml de agua destilada
- agua destilada

6. Precauciones

Los estándares contienen zearalenona, debe tenerse un cuidado particular. Evitar contacto de los reactivos con la piel (usar guantes).

La descontaminación del material de vidrio y de las soluciones que contienen zearalenona se realiza incubando éstas durante la noche en una solución de hipoclorito de sodio (10 % (v/v)), (regular el pH de la solución con HCl hasta pH = 7).

La solución stop contiene ácido sulfúrico 1 N (R36/38, S2-26).

7. Almacenaje de reactivos

Almacene los reactivos entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F), no los congele.

Guarde los pocillos no utilizados dentro del envase original, séllelo junto con el desecador provisto y continúe con el almacenamiento a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

La solución rojiza del substrato/cromógeno es sensible a la luz, evite por lo tanto su exposición directa.

Después del vencimiento de la fecha de caducidad (vea la etiqueta exterior del kit bajo "Exp.") no se asume más la garantía de calidad.

El test puede ser utilizado normalmente por lo menos hasta la fecha de caducidad (indicada sobre la caja del kit), si es almacenado correctamente.

No intercambie reactivos individuales entre ensayos de diferentes lotes.

8. Indicación de deterioro de los reactivos

- una coloración azulada del substrato/cromógeno rojizo anterior a su adición a los pocillos
- un valor de absorbancia menor a 0.6 unidades ($E_{450\text{ nm}} < 0.6$) para el estándar cero.

9. Preparación de las muestras

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz. Una muestra representativa (de acuerdo con la técnica de muestreo aceptada) debe ser molida y mezclada.

- pese 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 25 ml de metanol al 70 % *)
- agite vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador)
- filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman No. 1
- diluya 1 ml del filtrado con 1 ml de agua destilada
- utilice 50 µl del filtrado por micropozo para su análisis en el test

*) La cantidad de la muestra puede ser aumentada siempre y cuando el volumen del solvente (mezcla metanol/agua) se aumente respetando el factor de dilución dado.

10. Implementación del ensayo

10.1. Preparación del ensayo

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de su uso.
2. La reacción comienza con la adición del anticuerpo específico. Sin embargo, no se deberían utilizar más de tres tiras por test si se trabaja con una pipeta monocanal. Es posible analizar hasta 6 tiras al mismo tiempo utilizando una pipeta repetidora (multistep).
3. Devuelva todos los reactivos a una temperatura entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F) inmediatamente después de ser utilizados.

Los estándares de zearalenona se encuentran listos para su uso. El factor de dilución 10 de las muestras ya fue considerado durante el etiquetado de los estándares, por lo tanto la concentración de zearalenona en la muestra puede ser leída directamente de la curva de estándares.

10.2. Procedimiento del ensayo

Un lavado exhaustivo es muy importante. No permita que los pocillos se sequen completamente. Evite intervalos prolongados entre los pasos de trabajo. La reproducibilidad de los resultados depende en gran parte de un lavado uniforme de los pocillos. Siga cuidadosamente la secuencia de lavado descrita en el procedimiento.

Cubra los pocillos durante los períodos de incubación evitando así la exposición directa a la luz del sol.

1. Coloque suficientes pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
2. Agregue 50 μ l de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
3. Agregue 50 μ l del conjugado zearalenona-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Agregue 50 μ l de anticuerpo anti-zearalenona (tapón negro) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos (250 μ l por pocillo) con agua destilada utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más.
6. Agregue 100 μ l de substrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 5 minutos (+/- 0.5) en la oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
7. Agregue 100 μ l de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

11. Resultados

Para la evaluación y análisis de los resultados se puede obtener de R-Biopharm ó de su distribuidor local un software especial el RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999) para los RIDASCREEN[®] inmunoensayos enzimático.

Para determinaciones individuales recomendamos hacer el análisis usando Logit/log y para determinaciones duplicadas ó múltiples usar Cubic Spline.

El trazado de la curva de estándares se puede ver en el Certificado de Aseguramiento de la Calidad incluido en el ensayo.

Anotación para el cálculo sin el software:

$$\frac{\text{absorbancia estándar (ó muestra)}}{\text{absorbancia estándar cero}} \times 100 = \% \text{ absorbancia}$$

De esta forma, el estándar cero es igual a 100 % y los demás valores de absorción se indican en porcentaje. Los valores calculados para los estándares son aplicados a un sistema de coordenadas en papel semilogarítmico respecto a la concentración de zearalenona [$\mu\text{g}/\text{kg}$]. La concentración de zearalenona en $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondiente a la absorción de cada muestra puede ser leída directamente de la curva de calibrado.

12. Sensibilidad

12.1. Límite de detección

El límite de detección fue determinado en piensos y cereales a través de repetidas mediciones de la matriz cero. El límite de detección se define como la concentración correspondiente a la absorción media de la medición más 3 veces la variación de los estándares y se calcula extrapolando la curva de los estándares. Los resultados obtenidos en este caso se encuentran entre 17 y 41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb).

12.2. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se determina detectando fortificaciones en el extremo bajo de la curva. El mismo fue determinado en este test a 50 µg/kg (ppb), esta concentración de zearalenona está mucho arriba del límite de detección. Para esta concentración fueron encontradas recuperaciones entre 64 y 97 % con coeficientes de variación menores al 20 %.

R-Biopharm no garantiza, ni expresamente ni implícitamente, excepto que los materiales con los que están hechos sus productos son de calidad estándar. Si algún material está defectuoso, R-Biopharm le va a proveer un producto de reemplazo. No hay garantía de la comercialización de este producto, ó de la utilización del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no se hace responsable de cualquier daño, incluyendo daño especial ó por consecuencia, ó gasto generado directa ó indirectamente por el uso de este producto.