

r-biopharm®



RIDASCREEN® Aflatoxin Total

Art. R4701

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo di
aflatossina

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® Aflatoxin Total

Introduzione

RIDASCREEN® Aflatoxin Total (Art. R4701) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa delle aflatossine nei cereali e nei mangimi. 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 un lettore colorimetrico per micropiastre.

Preparazione campioni: macinazione, estrazione, filtrazione / centrifugazione e diluizione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni) . ca. 30 min
esecuzione del test (tempo d'incubazione)..... 45 min

Limite di rilevabilità: cereali e mangimi:..... ca. 1.75 ppb
(corrispondente alla sostanza standard)

Valori di recupero: ca. 85 %
(corrispondente alla sostanza standard) coefficiente di variazione: 15 %

Specificità:

Aflatossina B1	100 %
Aflatossina B ₂	ca. 48 %
Aflatossina G ₁	ca. 75 %
Aflatossina G ₂	ca. 18 %

La specificità del kit RIDASCREEN® Aflatoxin Total è stata determinata analizzando le cross-reattività delle sostanze corrispondenti in un sistema tampone. Nel campione la specificità può differire da quanto determinato nel sistema tampone a causa dell'effetto matrice. Prima di analizzare le sostanze cross-reattive, è necessario determinare il limite di rilevabilità e i valori di recupero per le sostanze nella rispettiva matrice. Il kit non è in grado di discriminare tra analita e sostanza cross-reattiva.

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>.

1. Scopo

RIDASCREEN® Aflatoxin Total è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dei residui di aflatossina nei cereali e nei mangimi.

2. Generale

Le Aflatossine sono metaboliti secondari delle specie fungine *Aspergillus flavus*, *parasiticus* e *nomius*. Queste muffe si formano in aree tropicali umide e la contaminazione degli alimenti vegetali avviene nelle regioni coltivate. Le aflatossine fanno parte del gruppo delle sostanze naturali cancerogene più pericolose.

L'Aflatossina B₁, che è generalmente presente insieme con l'Aflatossina B₂, G₁, e G₂, è quella con maggiore tossicità. Può trovarsi soprattutto nel mais, nelle arachidi, nelle noccioline brasiliane, nei semi di cotone e nei pistacchi.

A causa della tossicità di queste micotossine, nei paesi dell'Unione Europea si applicano livelli massimi di aflatossina B₁ e di aflatossine totali per gli alimenti e i mangimi.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi di cattura diretti contro anticorpi anti-aflatossine. Vi si aggiungono gli standard o i campioni, l'aflatossina coniugata con enzima e gli anticorpi anti-aflatossina. L'aflatossina libera e quella coniugata competono per i siti di legame (immunodosaggio enzimatico competitivo). Contemporaneamente gli anticorpi anti-aflatossina vengono legati dagli anticorpi di cattura immobilizzati sulla micropiastra. 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 450nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatossina nel campione.

4. Reagenti forniti

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

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra M	-	Pronto all'uso		96 pozzetti
Standard 1*	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2*	Bianco	Pronto all'uso	0.05 µg/l	1.3 ml
Standard 3*	Bianco	Pronto all'uso	0.15 µg/l	1.3 ml
Standard 4*	Bianco	Pronto all'uso	0.45 µg/l	1.3 ml
Standard 5*	Bianco	Pronto all'uso	1.35 µg/l	1.3 ml
Standard 6*	Bianco	Pronto all'uso	4.05 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		6 ml
Antibody	Nero	Pronto all'uso		6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- macinino
- cilindro graduato (in plastica o vetro) da 100 ml
- pipette graduate
- imbuto e contenitore da 50 ml
- carta da filtro: Whatman 1 oppure equivalenti
- micropipette da 20–200 µl e 200-1000 µl
- lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- facoltativo: shaker, centrifuga

5.2. Reagenti:

- soluzione di metanolo al 70 %: miscelare 70 ml di metanolo puro (100%) con 30 ml di acqua distillata
- acqua distillata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test deve essere eseguito solo da dipendenti di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere rispettate rigorosamente.

Le soluzioni standard contengono aflatossina B₁. 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 (10% (v/v) – portare il pH a 7 con HCl) per una notte.

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.**

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa e conservata a 2-8°C (35-46°F).

Le aflatossine sono fotosensibili: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

Il cromogeno incolore è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

Non si accettano garanzie di qualità oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a confezioni con numeri di lotto differenti.

8. Indicazioni di instabilità e deterioramento dei reagenti

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

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in luogo fresco, al riparo dalla luce. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C /68-77°F) prima dell'uso ed eseguire la preparazione del campione a temperatura ambiente.

Triturare e miscelare accuratamente una quantità rappresentativa di campione prima di procedere con la procedura di estrazione.

- in un idoneo contenitore, pesare 2 grammi di campione macinato ed omogeneizzato ed aggiungere 10 ml di metanolo al 70% *)
- agitare per 10 minuti a temperatura ambiente con un agitatore
- filtrare l'estratto con un foglio di carta da filtro Whatman 1 (oppure equivalente). In alternativa centrifugare (10 min/ 35000g/ temperatura ambiente)
- diluire 100 µl di filtrato con 600 µl di acqua distillata
- nel saggio utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

*) se necessario, è possibile aumentare la quantità di campione adattando di conseguenza il volume di metanolo / acqua. Ad esempio: 10 g in 50 ml di metanolo al 70%.

Note:

Se si ritiene che la concentrazione di aflatossine superi i 120 ppb, diluire ulteriormente i campioni in acqua distillata contenente il 10% di metanolo (es. 9 ml di acqua distillata + 1 ml di metanolo 100%). Qualsiasi campione utilizzato nel saggio deve essere in una soluzione di acqua distillata con metanolo al 10%.

Per campioni di nocciole, erbe, spezie e foglie di tè, utilizzare colonne ad immunoaffinità per la preparazione del campione. Richiedere la metodica delle RIDA® Aflatoxin column (cod. R5001/R5002).

Su richiesta è inoltre disponibile la nota applicativa per il caffè verde in associazione alle RIDA® Aflatoxin column (cod. R5001/R5002).

Si prega di notare che per la preparazione del campione con RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) i rispettivi eluati devono essere diluiti 1:10 con acqua distillata (vedi paragrafo 9.1 della metodica del kit RIDA® Aflatoxin column (R5001/R5002)). Per ulteriori diluizioni è necessario utilizzare acqua distillata con il 10% di metanolo.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

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

Riporre i reagenti a 2-8°C (35-46 °F) subito dopo l'uso.

10.2 Tampone di lavaggio

Come **tampone di lavaggio** è necessario un tampone PBS Tween. Utilizzare la soluzione di lavaggio (sale in busta) contenuta nel kit, indicata al paragrafo 4. Disciogliere tutto il sale di lavaggio in un litro di acqua distillata. La soluzione così preparata è pronta all'uso e scade dopo circa 4 – 6 settimane se conservata a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

In alternativa Disciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10X. Questa soluzione scade dopo circa 8 – 12 settimane e deve essere conservata a temperatura ambiente (20 -25 °C / 6 -77 °F).

Utilizzare 1 parte di questa soluzione concentrata e discioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta all'uso.

10.3. Procedura per l'esecuzione del test

Seguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test.

Evitare la luce diretta del sole durante tutte le fasi di incubazione ed incubare le piastre al buio.

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 ed ai campioni.
2. Aggiungere in duplicato 50 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti.
3. Aggiungere 50 µl di enzima coniugato in ogni pozzetto.
4. Aggiungere in ogni pozzetto 50 µl di soluzione di anticorpo. Mescolare bene facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) al buio.

5. Svuotare il liquido e rovesciare per tre volte di seguito la piastra su un foglio di carta assorbente picchiettandola in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Riempire i pozzetti con 250 µl di soluzione di lavaggio (vedi 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio per due volte.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm. Leggere entro 30 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.net (cod. Z9996).

Per l'analisi dei campioni, si consiglia di eseguire determinazioni in doppio o multiple. Utilizza la funzione spline cubica del RIDA®SOFT Win.net per l'interpretazione dei valori in doppio o multipli.

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

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 aflatoxina espresse in ng/kg.

Per ottenere la concentrazione di aflatoxina in ng/kg effettivamente contenuta nel campione, la concentrazione calcolata dalla curva standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione corrispondente. Operando secondo le procedure descritte, il fattore di diluizione da applicare è il seguente:

cereali e mangimi35

Per ulteriori informazioni e note applicative, contattare il distributore locale.

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.