

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo
di aflatossina

Art. No.: R5202

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 dell'Artigianato 19
20070 Cerro al Lambro 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[®]FAST Aflatoxin

Introduzione

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin (Art. No.: R5202) è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio quantitativo delle aflatossine in cereali e 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 hanno necessità di un addestramento specifico per eseguire l'analisi con il kit RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin, tuttavia a richiesta è fornito gratuitamente tutto il supporto necessario.

Preparazione campioni: estrazione, filtrazione, 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: < 1.7 µg/kg (ppb)

(corrispondente alla
sostanza standard)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio quantitativo delle aflatossine in cereali e mangimi.

2. Generale

Le aflatossine sono metaboliti cancerogeni e altamente tossici prodotti dalle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

L'aflatossina B₁, che generalmente è presente con le aflatossine B₂, G₁ e G₂, si rileva principalmente in cereali, mais, semi di cotone e alcune noci.

3. Principio del test

La base del test è una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi di cattura diretti contro gli anticorpi anti-aflatossine.

Nei pozzetti si aggiungono anticorpi specifici per l'aflatossina, l'enzima coniugato all'aflatossina e gli standard di aflatossina o le soluzioni campione. L'aflatossina libera e quella coniugata all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (saggio immunoenzimatico competitivo). Allo stesso tempo gli anticorpi anti-aflatossina 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 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 aflatossina nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per ben 43 analisi (più 5 analisi degli standard). Ogni kit contiene:

- 1 x Micropiastra con 48 pozzetti (6 strip da 8 pozzetti estraibili ciascuna)
coattata con anticorpi di cattura
- 5 x Soluzioni standard *), 1.3 ml ognuna
0 ppb (standard zero), 1.7 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 45 ppb
di aflatoxina in soluzione metanolo/acqua; pronte all'uso
- 1 x Coniugato (3 ml) tappo rosso
aflatoxina coniugata con perossidasi
pronto all'uso
- 1 x Anticorpi anti-aflatoxina (3 ml) tappo nero
pronti all'uso
- 1 x Substrato/cromogeno (10 ml) tappo marrone
colore rosso
- 1 x Soluzione di stop (14 ml) tappo giallo
contiene acido solforico 1N
- 1 x Tampone di lavaggio (sale)
Per la preparazione di tampone fosfato 10mM, pH 7.4
contiene Tween 20 allo 0.05%

*) Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato. Pertanto le concentrazioni di aflatoxina nei campioni si possono leggere direttamente sulla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore per micropiastre (450 nm)
- cilindro graduato (in plastica o vetro), 100 ml
- vetreria per l'estrazione del campione: imbuto e matraccio da 50 mL
- 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 (100 %) con 30 ml di acqua distillata o deionizzata
- acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il kit deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Gli standard contengono aflatossina: maneggiarli con attenzione. Utilizzare i guanti per evitare il contatto dei reagenti con la cute.

La decontaminazione della vetreria e delle soluzioni contenenti aflatossina deve essere eseguita con una soluzione 10% v/v di ipoclorito di sodio (candeggina) per una notte (portare a 7 il pH della soluzione 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 con il dissecante in dotazione e conservare a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno, normalmente di colore rossastro, è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità del prodotto non si applica oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.

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

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

8. Indicazioni di instabilità e deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno, normalmente rossastra, prima dell'esecuzione del test
- Un valore di assorbanza (450 nm) relativo allo zero standard inferiore a 0,6

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in un luogo fresco e protetto dalla luce. Macinare un campione rappresentativo (raccolto secondo le comuni tecniche di campionamento) e miscelarlo grossolanamente prima di procedere all'estrazione.

- pesare 5 g del campione precedentemente macinato ed addizionarlo in un opportuno contenitore a 25 ml di metanolo 70%*)
- agitare bene per tre minuti (manualmente o con 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 per pozzetto

*) La quantità di campione può essere aumentata se necessario, ma deve essere aumentato in proporzione anche il volume di metanolo/acqua, ad es. 10 g in 50 ml di metanolo 70%

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. Come **tampone di lavaggio** è necessario un tampone PBS tween. Si prega di utilizzare il sale contenuto nel kit (vedi paragrafo 4). Sciogliere tutto il sale fornito in 1 litro di acqua distillata. La soluzione così preparata scade dopo circa 4-6 settimane se conservata a 2-8°C (35-46°F).

In alternativa: Sciogliere il contenuto della busta in 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10 volte. La soluzione 10X scade dopo circa 8-12 settimane. Utilizzare 1 parte di questa soluzione concentrata e diluirla in 9 parti di acqua distillata per avere la soluzione di lavaggio pronta all'uso.

3. La reazione ha inizio con l'aggiunta degli anticorpi specifici. Non utilizzare nel test più di tre strip se si usa una pipetta monocanale. Se si impiega una pipetta multicanale è possibile utilizzare fino a 6 strip.

4. Riportare tutti i reagenti a 2-8°C (35-46°F) immediatamente dopo il loro utilizzo.

Le **soluzioni standard di aflatossina** sono pronte per l'uso. Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato. Pertanto le concentrazioni di aflatossina nei campioni si possono leggere direttamente sulla curva standard.

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

E' molto importante eseguire un accurato lavaggio. Non lasciare asciugare i pozzetti durante i diversi passaggi dell'analisi. Evitare pause protratte tra un passaggio e l'altro. In ogni test immunoenzimatico la riproducibilità è strettamente legata alla qualità dei lavaggi. Seguire attentamente le indicazioni riportate per il lavaggio dei pozzetti.

Si raccomanda di coprire la micropiastra e di evitare l'esposizione alla luce diretta durante tutte le incubazioni.

1. Inserire nel supporto un numero di pozzetti sufficiente per l'analisi sia degli standard che dei campioni e registrarne 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 aflatossina (flacone con tappo nero) in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti (± 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti svuotandoli in un lavabo. Rovesciare la piastra su un foglio di carta assorbente e picchiettarla energicamente per eliminare ogni residuo di liquido, ripetendo l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti con il tampone di lavaggio (vedi paragrafo 10.1) (250 µl ciascuno) utilizzando una spruzzetta o una pipetta multicanale. Svuotare nuovamente i pozzetti ed eliminare ogni traccia di liquido. Ripetere l'intera procedura di lavaggio altre due volte.
6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno (tappo marrone) in ogni pozzetto. Agitare 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 arresto (tappo giallo) in ogni pozzetto. Agitare delicatamente e misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per la valutazione dei test immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA® SOFT Win (Cod. Z9999).

Per determinazioni singole si raccomanda una valutazione su scala logit/log, mentre per determinazioni doppie o multiple si consiglia l'uso del cubic spline.

Il profilo della curva standard è illustrato nel Certificato di Assicurazione di Qualità (Quality Assurance Certificate) allegato.

Nota per il calcolo eseguito senza l'apposito soft:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o campione)}}{\text{Assorbanza standard 0}} \times 100 = \% \text{ assorbimento}$$

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 scala semilogaritmica contro la concentrazione equivalente di aflatoxina espresse in µg/kg.

Leggere quindi sulla curva di calibrazione la concentrazione di aflatoxina in µg/kg (ppb) corrispondente all'estinzione di ogni campione.

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.