

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁
Test immuno enzymatique pour l'analyse d'Aflatoxine M1

Art. No.: R5812

Test in vitro

A conserver 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

Adresse :

R-Biopharm AG

An der neuen Bergstraße 17

D-64297 Darmstadt

www.r-biopharm.com

Pour tout complément d'information nécessaire nous vous invitons à nous contacter au 04 78 64 32 00

RIDA[®] et RIDASCREEN[®]

sont des marques déposées de R-Biopharm AG

Fabricant : R-Biopharm AG, Darmstadt, Allemagne

R-Biopharm AG est certifié ISO 9001

2. Généralités

Les Aflatoxines sont des métabolites secondaires de l'*Aspergillus flavus* d'espèces de champignons, *parasiticus* et du *nomius*, qui sont carcinogènes et hautement toxiques.

L'Aflatoxine M1 est produite comme métabolite de l'aflatoxine B1. Il est sécrété dans le lait après que les vaches laitières aient été nourries avec des aliments pour animaux contenant l'aflatoxine B1.

Comme l'aflatoxine M1 est relativement stable pendant le processus de pasteurisation, non seulement un contrôle courant complet des matières premières à traiter est exigé, mais également des produits finis.

Depuis le 1er Janvier 1999 Il existe des limites de présence de résidu dans les produits pour des aflatoxines .

Pour l'aflatoxine M1 la limite a été fixée à 0,05 µg/l (ppt 50).

3. Principe du test

Le test est basé sur une réaction antigène-anticorps.

Les puits de microtitrage sont enduits d'anticorps de capture dirigés contre les anticorps anti-aflatoxine M1.

Les étalons aflatoxine M1 (ou les échantillons), le conjugué enzymatique aflatoxine M1 et les anticorps anti-aflatoxine M1 sont ajoutés. L'aflatoxine M1 libre et le conjugué enzymatique aflatoxine M1 entrent en compétition pour les sites de liaisons de l'anticorps aflatoxine M1 (dosage immuno-enzymatique par compétition). Dans le même temps, les anticorps anti-aflatoxine M1 sont également liés par les anticorps de capture immobilisés. Tout conjugué enzymatique non lié est éliminé par une étape de lavage. Le substrat/chromogène est ajouté aux puits, le conjugué enzymatique lié transforme le chromogène en un produit bleu. L'ajout de la solution d'arrêt provoque un changement de couleur de bleu à jaune. Les mesures sont photométriques, à 450 nm. L'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration d'aflatoxine M1 dans l'échantillon.

4. Composition du kit

Chaque kit contient le matériel nécessaire pour 42 déterminations (plus 6 standards inclus).

Chaque kit contient:

1 x Plaque de microtitration de 48 puits (6 barrettes avec 8 puits sécables chacune) recouverts d'anticorps (capturés).

6 x Solutions standards chacune 1.3 ml
0 ppt (étalon zéro), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt
aflatoxin M1 dans le tampon de lait prêt à l'emploi

1 x Conjugué (3 ml).....bouchon rouge
Aflatoxine de peroxydase conjugué
prêt à l'emploi

1 x Anti-aflatoxine M1 anticorps (3 ml)bouchon noir
prêt à l'emploi

1 x Red Chromogen Pro (10 ml) bouchon marron
La solution de substrat/chromogène colorée en rouge contient du
tétraméthylbenzidine.

1 x Solution stop (14 ml).....bouchon jaune
contient de l'acide sulfurique 1 N

1 x tampon de lavage (sel) pour préparer 10 mM de tampon de
phosphate (pH 7,4) contenant 0,05 % de Tween 20

5. Matériels nécessaires non fournis

5.1. Equipement:

- Spectrophotomètre de plaques de microtitration (450 nm)
- Centrifugeuse
- Pipettes graduées
- Micropipettes à volume variable de 20 à 200 µl et de 200 à 1 000 µl

6. Précautions d'emploi

Cette analyse ne doit être effectuée que par un personnel de laboratoire qualifié. Le mode d'emploi doit être suivi à la lettre.

Les étalons contiennent de l'aflatoxine M1, ils sont à manipuler avec précaution. Éviter tout contact du réactif avec la peau (porter des gants). La décontamination de la verrerie et des solutions d'aflatoxine s'effectue de préférence à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (javel) à 10 % (v/v) pendant toute une nuit (ajustez la solution avec du HCl pour obtenir un pH 7)

La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 1N (R36/38, S2-26).

7. Conservation

Conserver le kit entre 2 et 8°C. NE PAS CONGELER.

Remettre les puits non utilisés dans leur sachet d'origine contenant le dessiccant et le refermer. Placer le sachet à 2 - 8 °C.

La solution substrat/chromogène est photosensible, conserver cette solution à l'abri de la lumière.

Le kit peut être utilisé régulièrement jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé correctement. Ne pas utiliser après la date de péremption du kit indiqué sur la boîte.

Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.

8. Signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

- Toute coloration bleutée de la solution rouge du substrat/chromogène avant la réalisation du test
- Une valeur de densité optique inférieure à 0,6 pour l'étalon 0 (A450 nm < 0,6)

9. Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais à l'abri de la lumière

9.1. Lait

- centrifuger les échantillons de lait pour les dégraisser : 10 min / 3 500 g / 10 °C (50 °F)
(si une centrifugeuse réfrigérée n'est pas disponible, refroidir les échantillons à 10 °C (50 °F) avant la centrifugation)
- après la centrifugation, retirer toute la couche de crème en l'aspirant avec une pipette Pasteur.
- utiliser du lait écrémé (liquide surnageant dégraissé) directement au cours l'analyse (50 µl par puits)

9.2. Lait en poudre

- peser 10 g de lait en poudre dans un flacon et remplir-le jusqu'à 100 ml avec de l'eau désionisée*)

- dissoudre en remuant pendant 5 min
- reprendre la préparation du lait telle que décrite dans la partie 9.1*) la taille de l'échantillon peut être augmentée si nécessaire, le volume d'eau doit alors être adapté en conséquence.

10. Réalisation du test

10.1. Préparation du test

1. Amener les réactifs à température ambiante (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) avant de les utiliser.
2. La réaction spécifique ne commence que lors de l'ajout de l'anticorps spécifique.
Néanmoins, il ne faut pas utiliser plus de trois bandelettes lors de l'analyse lorsqu'une seule pipette est utilisée. Plus de bandelettes (jusqu'à 6) peuvent être utilisées quand une pipette automatique est utilisée.
3. Refroidir les réactifs à 2 - 8 °C (35 - 46 °F) dès la fin de l'utilisation.

En plus du **tampon de lavage**, un tampon PBS Tween est également nécessaire. Veuillez vous servir des sels pour tampon de lavage contenus dans le kit (voir 4.) Dissolvez tout le sel de lavage dans un litre d'eau distillée. Le tampon de lavage prêt à l'emploi se périmé après environ 4 à 6 semaines conservé à 2 à 8 °C (36 - 46 °F).

Méthode alternative : Dissoudre le contenu du sachet dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage dix fois plus concentré. Utiliser 1 volume du concentré et dissoudre dans 9 volumes d'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

Ce concentré se périmé après environ 8 à 12 semaines conservé à température ambiante (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

10.2. Réalisation du test

Bien suivre la procédure de lavage. Ne pas laisser les puits sécher entre chaque étape d'incubation.

La reproductibilité de toute analyse immuno-enzymatique (AIE) dépend de la régularité avec laquelle les micropuits sont nettoyés.

Suivez soigneusement les différentes étapes du lavage exposées dans la procédure d'analyse AIE.

Évitez toute exposition directe au soleil au cours des incubations. Il est donc recommandé de couvrir les plaques de microtitrage.

1. Insérer un nombre suffisant de puits dans le support pour que tous les standards soient exécutés. Noter les positions des standards et des échantillons.

2. Prélever dans la pipette 50 µl de produit standard ou échantillon dans des puits différents, utiliser un nouveau cône pour chaque standard ou échantillon.

3. Ajouter 50 µl de conjugué enzymatique (bouchon rouge) dans chacun des puits.

4. Ajouter 50 µl de la solution anticorps d'anti-aflatoxine M1 (bouchon noir) dans chacun des puits.

Mélanger doucement en effectuant un mouvement circulaire de la plaque et incuber pendant 10 minutes (+/- 1) à température ambiante (20 - 25 °C).

5. Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 250 µl de tampon de lavage (voir 10.1.).

Vider les puits de nouveau selon le même protocole. Répéter l'opération deux fois.

6. Ajouter 100 µl de substrat/chromogène (bouchon marron) dans chacun des puits. Mélanger doucement et laisser incuber 5 minutes (+/- 30 secondes) à température ambiante (20 - 25 °C) à l'abri de la lumière.

7. Ajouter 100 µl de solution stop dans chaque puits. Agiter doucement en effectuant un mouvement circulaire de la plaque et mesurer la D.O. à 450 nm.

Lire les résultats dans un délai de 10 mn.

11. Résultats

Pour l'évaluation du test ELISA un logiciel développé spécialement pour les tests RIDASCREEN®, le RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999), est disponible chez R-Biopharm.

Nous recommandons une évaluation logit/log pour les déterminations simples et une courbe de type « cubic spline » pour les déterminations doubles ou multiples.

L'allure de la courbe d'étalonnage est représentée dans le Certificat d'assurance qualité joint au kit d'analyse.

Remarques au sujet des calculs sans logiciels :

absorbance de l'étalon (ou de l'échantillon)

absorbance de l'étalon zéro x 100 = % d'absorbance

L'étalon zéro est donc égal à 100 % et les valeurs d'absorbance sont données en pourcentage. Les valeurs calculées pour les différents étalons sont entrées dans un système de coordonnées représentées sur papier graphique semi-logarithmique en fonction de la concentration en aflatoxine M1 [ng/l].

Afin d'obtenir la concentration en aflatoxine M1 en ng/l (ppt) réellement contenue dans un échantillon, la concentration relevée sur la courbe de calibration doit être multipliée par le facteur de dilution. Lors des analyses conformes à la réglementation citée, les facteurs de dilution sont les suivants :

Lait.....	1
Lait en poudre (lait reconstitué)	1
Lait en poudre (poids en grammes)	10

Les informations contenues dans cette notice sont basées sur nos connaissances actuelles et sont destinées à fournir des précisions quant à l'utilisation de ce kit. Cependant, elles ne constituent en aucun cas une garantie de bons résultats en cas d'applications particulières. R-Biopharm s'engage uniquement sur la qualité des matériaux utilisés pour la production des kits. Dans le cas de matériel défectueux, R-Biopharm fournira un produit de rechange. R-Biopharm ne sera pas tenu responsable de dommages ou de dépenses résultant directement ou indirectement de l'utilisation des kits utilisés.