

RIDASCREEN[®] FAST Aflatoxin M₁

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin M₁

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
aflatoxin M₁

Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de
aflatoxina M₁

Art. No.: R5812

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.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ (Art. Nr.: R5812) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays – inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Für die Durchführung des Tests ist keine spezielle über die eines Laboranten / Technikers hinausgehende Ausbildung erforderlich. Falls erforderlich, wird jedoch auf Anfrage eine kostenlose Einarbeitung angeboten.

Probenvorbereitung: zentrifugieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Milch und Milchpulverca. 15 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)15 min

Nachweisgrenze: Milch< 125 ppt
(bezogen auf die Milchpulver (bezogen auf rekonstituierte Milch)< 125 ppt
Standardsubstanz)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*, die karzinogen und hochtoxisch sind.

Aflatoxin M₁, das sog. Milch-Aflatoxin, entsteht als Metabolit des Aflatoxins B₁. Es wird nach Verfütterung Aflatoxin B₁-haltiger Futtermittel an laktierende Kühe mit der Milch ausgeschieden.

Da Aflatoxin M₁ relativ stabil gegenüber dem Pasteurisierungsprozess ist, ist nicht nur eine routinemäßige umfangreiche Kontrolle der zu verarbeitenden Rohstoffe nötig, sondern auch die Kontrolle der Endprodukte.

Seit dem 1. Januar 1999 gelten EU-weite einheitliche Höchstgehalte für Aflatoxine. Für Aflatoxin M₁ wurde als Höchstwert 0,05 µg/l (50 ppt) festgelegt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin M₁-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin M₁-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ konkurrieren um die Aflatoxin M₁-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin M₁-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Hinzugegeben wird Substrat/Chromogen, gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin M₁ Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können bis zu 42 Bestimmungen durchgeführt werden (plus 6 Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Kavitäten, teilbar),
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 6 x Standardlösungen, je 1,3 ml
0 ppt (Nullstandard), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt
Aflatoxin M₁ in Milchpuffer
gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (3 ml)..... roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes Aflatoxin
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Aflatoxin M₁-Antikörper (3 ml) schwarzer Verschluss
gebrauchsfertig
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml)..... brauner Verschluss
Substrat-/Chromogenlösung, rötlich gefärbt
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml)..... gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Waschpuffer (Salz)
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH 7,4)
enthält 0,05 % Tween 20

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl- und 200 - 1000 µl-Mikropipetten

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Die Standards enthalten Aflatoxin M₁. Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

Die Dekontamination der Glasgeräte und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die rötlich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Test kann bei entsprechender Lagerung mindestens bis zum Verfallsdatum (angegeben auf der Kitpackung) für eine ordnungsgemäße Analyse eingesetzt werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlichen Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Milch

- Milchproben zur Entfettung zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C (ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, muss die Milch vor dem Zentrifugieren auf 10 °C abgekühlt werden)
- nach dem Zentrifugieren die obere Sahneschicht vollständig entfernen, z. B. durch absaugen mit einer Pasteurpipette
- fettarme Milch (= entfetteter Überstand) wird direkt im Test eingesetzt (50 µl pro Kavität)

9.2. Milchpulver

- 10 g Milchpulver in ein Becherglas einwiegen und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen *)
- unter Rühren das Milchpulver 5 min homogenisieren
- anschließend wie für die Aufarbeitung von Milch (unter 9.1. beschrieben) weiterverfahren

*) das Probenvolumen kann vergrößert werden, dazu muss das Volumen des Wassers entsprechend angepasst werden

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
2. Die spezifische Reaktion startet erst mit der Zugabe des spezifischen Antikörpers. Wenn eine einfache Pipette eingesetzt wird, sollten trotzdem nicht mehr als drei Streifen pro Testansatz eingesetzt werden. Bis zu 6 Streifen können bei Verwendung von Multistep-Pipetten eingesetzt werden.
3. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Das 10fach Konzentrat ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Kavitäten ab. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 50 µl der anti-Aflatoxin M₁-Antikörperlösung (schwarzer Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 10 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit Hilfe einer Waschflasche oder Multikanal-Pipette (250 µl pro Kavität) mit Waschpuffer (s. 10.1.) waschen, die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Waschvorgang noch zweimal wiederholen.

6. Je 100 µl Substrat/Chromogenlösung (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 5 min (+/- 0,5) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Wir empfehlen für Einzelbestimmungen die Auswertung mit Logit/log und für Doppel- oder Mehrfachbestimmungen sollte Cubic Spline verwendet werden.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Aflatoxin M₁-Konzentration [ng/l] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Aflatoxin M₁-Konzentration in ng/l zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Milch	1
Milchpulver (bezogen auf rekonstituierte Milch).....	1
Milchpulver (bezogen auf g-Einwaage).....	10

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁

Brief information

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ (Art. No.: R5812) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk and milk powder. All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Technicians need no specialized training to perform the RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ test, however, free support is offered by the distributor on request, if necessary.

Sample preparation: centrifugation

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
milk and milk powder approx. 15 min
test implementation (incubation time) 15 min

Limit of detection: milk: < 125 ppt
(corresponding to the milk powder (referring to reconstituted milk): < 125 ppt
standard substance)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk and milk powder.

2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* and *nomius*, which are carcinogenic and highly toxic.

Aflatoxin M₁ is produced as a metabolite of aflatoxin B₁. It is secreted with the milk after the feeding of aflatoxin B₁ content feedstuffs to lactating cows.

As aflatoxin M₁ is relatively stable towards the pasteurizing process, not only a comprehensive routine check of the raw materials to be processed is required, but also of the final products.

Since the first of January 1999 EU-wide uniform residue limits for aflatoxins exist. For aflatoxin M₁ the limit has been fixed at 0.05 µg/l (50 ppt).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin M₁ antibodies.

Aflatoxin M₁ standards or sample solutions, aflatoxin M₁ enzyme conjugate and anti-aflatoxin M₁ antibodies are added. Free aflatoxin M₁ and aflatoxin M₁ enzyme conjugate compete for the aflatoxin M₁ antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin M₁ antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the aflatoxin M₁ concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for as many as 42 analyses (plus 6 standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)
coated with capture antibodies
- 6 x Standard solutions, 1.3 ml each
0 ppt (zero standard), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt
aflatoxin M₁ in milk buffer
ready to use
- 1 x Conjugate (3 ml)red cap
peroxidase conjugated aflatoxin
ready to use
- 1 x Anti-aflatoxin M₁ antibody (3 ml).....black cap
ready to use
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brown cap
Substrate/chromogen solution, stained red
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml)..... yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Washing Buffer (Salt)
for preparation of a 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)
contains 0.05 % Tween 20

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge
- graduated pipettes
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

The standards contain aflatoxin M₁, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and aflatoxin solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

The test kit can be regularly used at least up to the expiry date (indicated on the kit package), if stored correctly.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light.

9.1. Milk

- centrifuge milk samples for degreasing: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F) (if a refrigerated centrifuge is not available, cool sample to 10 °C (50 °F) prior to centrifugation)
- after centrifugation, remove upper cream layer completely by aspirating through a Pasteur pipette
- use the skimmed milk (= defatted supernatant) directly in the test (50 µl per well)

9.2. Milk powder

- weigh 10 g of milk powder in a flask and fill up to 100 ml with deionized water *)
- dissolve by stirring for 5 min
- continue with the preparation of milk as described in 9.1.

*) sample size may be increased if required, but the volume of water must be adapted accordingly

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. The specific reaction starts with the addition of the specific antibody. Nevertheless, not more than three strips should be applied to the test, when a single step pipette is used. More strips (up to 6) could be applied, when a multistep pipette is used.
3. Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

As **washing buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the washing buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.
This 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

10.2. Test procedure

Accurate washing is very important. Do not allow microwells to dry up totally and avoid prolonged intervals between the working steps. Reproducibility in any EIA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the EIA test procedure.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore covering the microtiter plates is recommended.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to each well.
4. Add 50 µl of anti-aflatoxin M₁ antibody solution (black cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Using a wash bottle or multichannel pipette, fill the wells (250 µl per well) with washing buffer (see 10.1.). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.

6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 min (+/- 0.5) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes.

11. Results

A special software, the RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

For single determinations we recommend logit/log evaluation and for double or multiple determinations cubic spline should be used.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the aflatoxin M₁ concentration [ng/l].

In order to obtain the aflatoxin M₁ concentration in ng/l (ppt) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

Milk.....	1
Milk powder (referring to reconstituted milk)	1
Milk powder (referring to g-weight)	10

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin M₁

Información breve

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin M₁ (Art. No.: R5812) es un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina M₁ en leche y en leche en polvo.

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

Un kit alcanza para realizar 48 determinaciones (incluyendo estándares).

Para cuantificar se requiere un espectrofotometro (lector de ELISA).

No se necesita una formación especializada para la ejecución del test RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin M₁. Sin embargo el distribuidor ofrece un soporte técnico gratuito.

Preparación de muestra: centrifugación

Tiempo requerido: preparación de muestra (para 10 muestras)
leche y leche en polvoaprox. 15 min
implementación del test
(tiempo de incubación)15 min

Límite de detección: Leche. < 125 ppt
(respecto a la Leche en polvo (en relación a la leche
sustancia estándar) reconstituida)..... < 125 ppt

1. Fin del uso

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin M₁ es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina M₁ en leche y en leche en polvo.

2. Generalidades

Las aflatoxinas son productos metabólicos cancerígenos y altamente tóxicos de los hongos del género *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. La aflatoxina M₁ es un producto metabólico producido a partir de la aflatoxina B₁. Aflatoxina M₁ es segregada por vacas lactoproductoras luego de haber consumido alimentos que contengan aflatoxina B₁.

La aflatoxina M₁ es relativamente estable ante el proceso de pasteurizado por lo tanto no sólo un extenso control de las materias primas es necesario sino también del producto terminado.

Desde el 1 de Enero de 1999 están en vigor unitariamente para toda la CE las cantidades máximas de aflatoxinas. En el caso de la aflatoxina M₁ la cantidad máxima se fijó en 0,05 µg/l (50 ppt).

3. Fundamento del test

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-aflatoxina M₁. Se agregan estándares de aflatoxina M₁ o la solución de las muestras, conjugado aflatoxina M₁-enzima y anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. El aflatoxina M₁ libre y el conjugado aflatoxina M₁-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina M₁ (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina M₁ se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina M₁-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El substrato/cromógeno es agregado a los pocillos e incubado. El conjugado aflatoxina M₁-enzima unido a los pocillos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una substancia azul. La adición de la solución stop provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina M₁ en la muestra.

4. Contenido del kit

Con los reactivos de un kit se pueden realizar 42 determinaciones (+ determinación de los 6 estándares). Cada kit contiene:

- 1 x Placa con 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 pocillos separables)
recubiertos con anticuerpos de captura
- 6 x Soluciones de estándares, 1,3 ml cada uno
0 ppt (estándar cero), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt
aflatoxina M₁ en tampón de leche
listo para su uso
- 1 x Conjugado (3 ml)..... tapón rojo
conjugado aflatoxina M₁-peroxidasa
listo para su uso

- 1 x Anticuerpo anti-aflatoxina M₁ (3 ml).....tapón negro
listo para su uso
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml)tapón marrón
Solución rojiza de substrato/cromógeno
Contiene Tetrametilbencidina
- 1 x Solución stop (14 ml) tapón amarillo
Contiene una solución de ácido sulfúrico 1 N
- 1 x tampón de lavado (sal de tamponado)
Para preparar un tampón 10 mM de fosfato (pH 7,4)
Contiene 0,05% Tween 20

5. Reactivos adicionales y accesorios requeridos

5.1. Equipo:

- espectrofotometro para placas portapocillos (450 nm)
- centrifuga
- pipetas
- micropipetas variables de 20 - 200 µl y 200 - 1000 µl

6. Precauciones

Este análisis debe ser llevado a cabo únicamente por personal entrenado de laboratorio. Las instrucciones para la realización del ensayo deben ser seguidas estrictamente.

Los estándares contienen aflatoxina M₁, tenga particularmente cuidado con su manejo. Evite contacto cutáneo (utilice guantes).

La descontaminación del material de vidrio y de las soluciones que contienen aflatoxina M₁ 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.

9.1. Leche

- centrifugar las muestras lácteas para descremarlas: 10 min. / 3500 g / 10 °C (en caso de no disponer de una centrifugadora refrigerada, enfríe las muestras lácteas a 10 °C antes de centrifugar)
- después del centrifugado separar la capa superior de crema aspirando la misma con una pipeta de Pasteur
- utilice 50 µl de la leche descremada por pocillo para su análisis en el test

9.2. Leche en polvo

- pesar 10 g de leche en polvo en un vaso de precipitados y agregar 100 ml de agua destilada *)
- homogeneizar la mezcla revolviendo durante 5 min
- a continuación proceder de la forma explicada bajo el punto 9.1.

*) la cantidad de la muestra puede ser aumentada siempre y cuando el volumen del agua se aumente respetando el factor de dilución dado

10. Procedimiento

10.1. Preparativos

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de ser utilizados.
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 inmediatamente después de ser utilizados.

Como **tampón de lavado** se necesita un tampón PBS-Tween. Para ello utilice por favor la sal de tampón incluida en el test (vea 4.). Para preparar el tampón se disuelve el contenido completo del sobre en un litro de agua destilada. El tampón de lavado disuelto puede ser conservado entre 4 y 6 semanas a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Alternativa: Disolver el contenido del sobre en 100 ml de agua destilada (10 veces concentrado). Para obtener la disolución de trabajo se mezcla una parte del concentrado con 9 partes de agua.

El tampón concentrado puede ser conservado entre 8 y 12 semanas a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

10.2. Procedimiento

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 marco portapocillos para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
2. Agregue 50 µl 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 µl del conjugado aflatoxina M₁-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Agregue 50 µl de anticuerpo anti-aflatoxina M1 (tapón negro) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
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 µl por pocillo) con tampón de lavado (vea 10.1.) 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 µl de Red Chromogen Pro (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).
7. Agregue 100 µl 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 Control de Calidad incluido en el ensayo.

Indicaciones 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 aflatoxina M₁ [ng/l].

Para obtener la concentración real de aflatoxina M₁ en ng/l de cada muestra debe ser multiplicada la concentración leída en la curva por el factor de dilución correspondiente. Trabajando de acuerdo a estas instrucciones se tienen los siguientes factores de dilución:

Leche.....	1
Leche en polvo (en relación a la leche reconstituida).....	1
Leche en polvo (en relación a los gramos pesados).....	10

R-Biopharm no brinda garantía de ningún tipo, expresa o implícita, excepto que los materiales de los cuales sus productos son hechos corresponden a las normas estándares de calidad. Si algún material es defectuoso, R-Biopharm va a proceder al reemplazo del mismo. Quedan expresamente fuera de esta garantía la comerciabilidad de este producto, los daños directos o indirectos producidos por su uso indebido o por ser usados para propósitos no previstos en su diseño, los deterioros producidos por defectos de almacenaje, así como también los daños producidos como consecuencia de su utilización para otros fines.