



RIDASCREEN[®] Aflatoxin B1 30/15

Art. Nr. R1211

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo
di aflatossina B1

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 B₁ 30/15

Introduzione

RIDASCREEN[®] Aflatoxin B₁ 30/15 (Art. R1211) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dell' Aflatossina B₁ nei cereali e nei mangimi. Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – compresi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione campioni: macinazione, estrazione, filtrazione e diluizione

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

Limite di rilevabilità: Cereali..... 1 µg/kg (ppb)
(corrispondente alla Soia.....1,7 µg/kg
sostanza standard) mangimi (campione rappresentativo, ad esempio
bovino /maiale/pollame/cavallo/coniglio).....4 µg/kg
cibo per gatti secco.....2 µg/kg

Recupero: ca. 93% valore di recupero medio per materiale di
(corrispondente alla riferimento (mais) naturalmente contaminato
sostanza standard)

Cross-reattività: Aflatossina B₁.....100 %
Aflatossina B₂.....ca. 13 %
Aflatossina G₁ca. 29 %
Aflatossina G₂ca. 3.2 %
Aflatossina M₁ca. 1.5 %

La specificità del kit RIDASCREEN[®] Aflatoxin B₁ 30/15 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 B₁ 30/15 è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dell'aflatossina B₁ nei cereali e nei mangimi.

2. Generale

Le aflatossine sono metaboliti secondari di funghi appartenenti alle specie *Aspergillus flavus*, *parasiticus* e *nomius*. Questi funghi, tipici delle aree tropicali umide, sono responsabili della contaminazione dei vegetali prodotti nelle coltivazioni. Le aflatossine sono tra le sostanze a più elevato grado di cancerogenicità esistenti in natura. L'aflatossina B₁ è l'analita a maggiore tossicità ed è quasi sempre presente, unitamente alle aflatossine B₂, G₁ e G₂. Si trova nel mais, nelle arachidi, nelle noci brasiliane, nei semi di cotone e nei pistacchi.

A causa della tossicità di queste micotossine, i Paesi dell'Unione Europea hanno stabilito livelli massimi consentiti per l'aflatossina B₁ e le aflatossine totali in alimenti e mangimi.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi di cattura diretti contro gli anticorpi anti-aflatossina. Nei pozzetti si aggiungono gli standard per l'aflatossina o le soluzioni campione, il coniugato enzima-aflatossina e gli anticorpi anti-aflatossina. L'aflatossina libera e quella coniugata all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo anti-aflatossina (analisi immunoenzimatica competitiva). Contemporaneamente, gli anticorpi anti-aflatossina si legano anche agli anticorpi di cattura immobilizzati. Il coniugato all'enzima non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunta e incubata la soluzione di substrato e cromogeno, il coniugato enzimatico legato trasforma il cromogeno rosso in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca un viraggio del colore da blu a giallo. La determinazione quantitativa viene eseguita

fotometricamente a 450 nm. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatoxina 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 K	-	Pronto all'uso		96 pozzetti
Standard 1*	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2*	Bianco	Pronto all'uso	1 µg/l	1.3 ml
Standard 3*	Bianco	Pronto all'uso	5 µg/l	1.3 ml
Standard 4*	Bianco	Pronto all'uso	10 µg/l	1.3 ml
Standard 5*	Bianco	Pronto all'uso	20 µg/l	1.3 ml
Standard 6*	Bianco	Pronto all'uso	50 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

*) Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato. Pertanto, le concentrazioni di aflatoxina B₁ nei campioni si possono leggere direttamente sulla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- tritatore (macinino)
- cilindro graduato da 100 ml in plastica o vetro
- pipette graduate
- imbuto e matraccio della capacità di 50 mL
- carta da filtro Whatman No. 1 o equivalente
- micropipette da 50 µl, 100 µl e 1000 µl
- spettrofotometro 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 o deionizzata.
- Acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test dovrebbe essere eseguito da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Le soluzioni standard contengono aflatossina B₁, prestare particolare attenzione. Evitare il contatto del reagente con la cute (indossare i guanti)

E' consigliabile eseguire la decontaminazione della vetreria e delle soluzioni contenenti aflatossina B₁ con una soluzione (10 % (v/v)) di ipoclorito di sodio (candeggina) per una notte (regolare il pH della soluzione portandolo a 7 con l'aggiunta di HCl).

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).

L'aflatoossina B₁ è fotosensibile: evitare l'esposizione degli standard contenenti aflatoossina B₁ alla luce diretta.

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

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

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

8. Indicazione di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastro della soluzione substrato/cromogeno normalmente rossa, 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 e al riparo dalla luce.

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

Macinare un campione rappresentativo (preparato secondo le tecniche di campionamento comunemente adottate) e miscelarlo accuratamente prima di iniziare la procedura di estrazione.

- pesare 5 g di campione macinato e omogeneizzato, introdurlo in un contenitore idoneo e aggiungere 25 ml di soluzione di metanolo al 70% *)
- agitare energicamente per tre minuti (manualmente o con agitatore)
- filtrare l'estratto con filtro Whatman No. 1 (o equivalente) oppure centrifugare (10 min/3500g/temperatura ambiente)
- diluire 1 ml del filtrato così ottenuto oppure il surnatante limpido con 1 ml di acqua distillata o deionizzata
- utilizzare 50 µl del filtrato diluito per pozzetto

*) se richiesto, è possibile incrementare il quantitativo del campione, ma in tal caso è necessario adeguare il volume della soluzione metanolo/acqua (es. 10 g in 50 ml di metanolo al 70%)

Nota:

Qualora ci si attenda una concentrazione di aflatoxina più elevata, si deve procedere a ulteriori diluizioni del campione. Si noti che i campioni da pipettare nei pozzetti devono essere in una soluzione metanolo/acqua (35/65).

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

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

Gli standard di aflatossina B₁ sono forniti pronti all'uso. In etichetta è già stato considerato un fattore di diluizione 10 per il campione, pertanto le concentrazioni di aflatossina B₁ nei campioni si possono leggere direttamente sulla curva standard.

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

10.2 Tampone di lavaggio

Come **soluzione di lavaggio** è necessario un tampone PBS Tween. Utilizzare la soluzione di lavaggio (sale in busta) contenuta nel kit. 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 va conservata a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 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

Un'accurata procedura di lavaggio è di estrema importanza. La riproducibilità in un test immunoenzimatico è altamente influenzata da come la micropiastra viene lavata. Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata, evitando l'asciugamento dei pozzetti tra una fase e l'altra del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni ad essi assegnate.
2. Pipettare 50 µl di soluzione standard o di campione preparato ai pozzetti corrispondenti, utilizzando un puntale diverso per ogni standard o per ogni campione.
3. Introdurre 50 µl di coniugato al fondo di ogni pozzetto.
4. Aggiungere in ogni pozzetto 50 µl di soluzione di anticorpo. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 minuti (+/-1) a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
5. Svotare i pozzetti in un lavabo e rovesciare il supporto della micropiastra su un foglio di carta pulita picchiettandolo energicamente per eliminare ogni traccia del liquido contenuto nei pozzetti. Ripetere per almeno tre volte. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di soluzione di lavaggio (vedi 10.2.). Svotare nuovamente i pozzetti ed eliminare tutto il liquido residuo. Ripetere la procedura di lavaggio altre due volte.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione substrato/cromogeno a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti (+/-1) a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm contro aria, entro 15 minuti dall'aggiunta dello stop.

11. Risultati

Per la valutazione dei test ELISA RIDASCREEN[®], è disponibile un apposito software, denominato RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996).

Per l'analisi dei campioni, si raccomandano determinazioni doppie o multiple. Utilizzare l'uso del cubic spline con il RIDA[®]SOFT Win.net.

Il profilo della curva standard è illustrato nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato al kit.

Nota per il calcolo eseguito senza l'apposito software:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o del campione)}}{\text{Assorbanza standard zero}} \times 100 = \% \text{ assorbanza}$$

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 B₁ espresse in [µg/kg].

Leggere quindi sulla curva di calibrazione la concentrazione di aflatoxina B₁ in µg/kg corrispondente all'estinzione di ogni campione.

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.