



BIO-SHIELD M1 FAST

B2548 / B2596

Il test ELISA per la determinazione quantitativa di aflatoxina
M1 nel latte e latte in polvere

Analisi in vitro
Stoccaggio a 2-8°C

www.prognosis-biotech.com

Il kit ELISA è un prodotto della ProGnosis Biotech S.A. ed è in conformità alla norma EN ISO 14675:2003.

La Società ProGnosis Biotech S.A è certificata con EN ISO 9001:2015 dal prestigioso ente TÜV Hellas (TÜV NORD).

Da consultare la versione corrente del relativo manuale operativo contenuto nel kit.

Bio-Shield M1 FAST, B2548/B2596 è un saggio immunoenzimatico con cui si può determinare la quantità dell'aflatossina M1 nel latte e latte in polvere. Il presente kit ELISA contiene tutti i reagenti necessari per il metodo ed è sufficiente per 48/96 determinazioni (incluso lo standard zero (St1)). Per la misurazione della micropiastra ELISA è richiesto uno spettrofotometro.

- Preparazione del campione: latte: **nessuna** e latte in polvere: ricostituzione.
- Tempo totale di prova: 30min.
- Tempo di conservazione: 12 mesi
- Conservazione a 2-8°C.

SOMMARIO

1. Descrizione	4
2. Informazioni generali	4
3. Principio del metodo	4
4. Reagenti forniti	4
5. Materiali richiesti ma non forniti	5
6. Istruzioni per la conservazione	5
7. Sicurezza e precauzioni per l'uso	5
8. Indicazione di deterioramento dei reagenti	5
9. Preparazione dei campioni	5
10. Procedura di Metodo	6
11. Analisi dei Dati	7
12. Esempio di curva standard	8
13. Specifiche del Saggio	8
14. Riassunto del Metodo	9

1. Descrizione

Il Bio-Shield M1 FAST è un test ELISA per la determinazione dell'aflatossina M1 nel latte e latte in polvere.

2. Informazioni generali

Le aflatossine (Aflatoxins) sono metaboliti tossici di massimo interesse per l'industria lattiero-casearia, prodotte dai funghi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ed *A. nomius*. Possono esercitare effetti nocivi quali immunosoppressivi, mutageni, teratogeni o cancerogeni. Le aflatossine se ingerite tramite il foraggio contaminato da bestiami da latte sono biotrasformate in sede epatica in aflatossina M1 (AFM1). L'AFM1 in seguito viene secreta nel latte destinato al consumo umano diretto ma anche in tutti i prodotti lattiero-caseari. La presenza dell'AFM1 nel latte e nei suoi derivati è considerata di comportare determinati rischi per la sanità mettendo a rischio la salute del consumatore e di conseguenza il limite stabilito dall'UE è molto basso sui 0,05 µg/kg (50ppt).

3. Principio del metodo

I pozzetti che costituiscono la micropiastrea contengono anticorpi specifici per l'AFM1 adsorbiti sul fondo. Lo standard zero (St1) e i campioni vengono aggiunti ai pozzetti. L'AFM1 dei campioni, se presente, si lega agli anticorpi. Gli ingredienti non legati, vengono rimossi da un passaggio di lavaggio. Quando viene aggiunta una soluzione contenente molecole di AFM1 coniugata con un enzima (HRP-AFM1), queste ultime si legano agli anticorpi il cui sito di legame non è ancora stato occupato dall'AFM1 presente nei campioni. In seguito ad un passaggio di lavaggio tutto ciò che non si è legato sarà rimosso. Un substrato cromogeno viene aggiunto ad ogni pozzetto e si svilupperà una progressiva colorazione blu. L'aggiunta di una soluzione acida permetterà il viraggio al giallo della colorazione blu. La misurazione dell'intensità della colorazione gialla si effettua fotometricamente a 450nm e tale intensità sarà proporzionale alla concentrazione dell'AFM1 presente nei campioni.

4. Reagenti forniti

Il presente kit ELISA contiene tutti i reagenti necessari per il metodo ed è sufficiente per 48/96 determinazioni (incluso lo St1).

Reagenti (Stoccaggio a 2-8°C)	Quantità 48 pozzetti	Quantità 96 pozzetti	Stato	Colore del tappo
Micropiastrea	48 pozzetti	96 pozzetti	Pronta all'uso (pretrattata)	-
Standard zero (St1) (0ppt di AFM1)	1 fiala (contenenti ciascuna 3ml)	2 fiale (contenenti ciascuna 3ml)	Pronta all'uso	Nero
Detection Solution	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Verde
Wash Buffer 20X	1 fiala (50ml)	1 fiala (50ml)	Da diluire prima dell'uso	Bianco
TMB Substrate	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Marrone
Stop Solution	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Bianco

5. Materiali richiesti ma non forniti

- Vortex e fotometro per micropiastre con filtro da 450nm.
- Set di micropipette da laboratorio con puntali da 100 e 1000µl intercambiabili, (opzionale suggerita una micropipetta ripetitiva da 100µl per il dosaggio della Detection Solution, TMB e della Stop Solution).
- 50-300µl micropipetta multi-canale con punte e serbatoi monouso.
- Acqua distillata.

6. Istruzioni per la conservazione

Conservare i reagenti del kit a 2-8°C. Il kit non deve essere congelato. Riporre immediatamente i reagenti e i pozzetti non utilizzati nel relativo contenitore fornito **con la bustina essicante** e conservare a 2-8°C. Dopo l'uso, i rimanenti reagenti devono essere restituiti allo stoccaggio a freddo (2-8°C). La scadenza del kit e dei reagenti è indicata sulle etichette, rispettivamente. Nessuna garanzia di qualità è accettata dopo la data di scadenza. L'efficacia dei reagenti fino alla data di scadenza è garantita se vengono osservate le corrette condizioni di conservazione e se non avvengono accidentali contaminazioni. Data la sensibilità alla luce del substrato ed evitare l'esposizione a luci dirette. Non scambiare i singoli reattivi a kit di lotti differenti.

7. Sicurezza e precauzioni per l'uso

- Evitare il contatto della pelle con la Stop Solution (15% di H₃PO₄) e la soluzione Substrato (tossico). **Usare guanti. Nel caso di contatto con occhi o pelle si raccomanda di sciacquare abbondantemente con acqua.**
- Tutti i reagenti devono essere riscaldati a temperatura ambiente prima dell'uso e ricoperti quando non sono in uso. **Utilizzare una punta di pipetta di plastica monouso per ogni reagente, per evitare contaminazioni incrociate. Mentre si sta pipettando i reagenti, mantenere un ordine consistente di aggiunta da pozzetto a pozzetto. Ciò garantirà tempi di incubazione uniformi per tutti i pozzetti.**
- Usare contenitori di plastica puliti per preparare il Wash Buffer. Non inserire carta assorbente nei pozzetti per eliminare il Wash Buffer e non lasciare asciugare i pozzetti tra un lavaggio e il successivo. Dopo l'ultimo lavaggio, eliminare il liquido da ogni pozzetto e picchiettare la piastra con i pozzetti capovolti su uno strato di carta assorbente al fine di rimuovere tutto il liquido all'interno. Dopo l'aggiunta della Stop Solution leggere preferibilmente i pozzetti entro 60 minuti.

8. Indicazione di deterioramento dei reagenti

- Una colorazione bluastra del Substrato prima dell'uso.
- Un valore di assorbanza inferiore a 0.7 unità (a 450 nm) dello St1.

9. Preparazione dei campioni

9.1 Latte fresco

Impiegare 100 µl di ogni campione direttamente nel immunodosaggio. La centrifugazione (per 10 minuti a 3000xg) non è necessaria perché non c'è nessuna differenza significativa nel risultato finale.

9.2 Latte in Polvere

Ricostituire il latte in polvere secondo le istruzioni del produttore. Se non ci sono istruzioni disponibili, mescolare 1 g di latte in polvere con acqua distillata o deionizzata fino a 10 ml. Mescolare bene e successivamente segue la scrematura secondo la preparazione del campione di latte (vedere 9.1). Usi 100µl di ogni campione direttamente nell'immunodosaggio.

10. Procedura del Metodo

10.1 Progettazione del esperimento: Determinare il numero di pozzetti necessari per testare il numero desiderato di campioni e St1. Considerando che ogni campione e standard possono essere testati singolarmente o in doppio, creare un layout. **NOTA:** Si preferisce utilizzare non più di 48 pozzetti (Zero Standard inclusi) in ciascun dosaggio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St1											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Esempio schema della piastra

ATTENZIONE: Utilizzare la posizione di St1 come l'esempio layout della piastra. Prendere nota delle posizioni di campioni da tutti i restanti pozzi vuoti.

10.2 Portare i reagenti e gli estratti del campione a temperatura ambiente (19-24°C). Rimuovere il **Zero Standard** e il **numero appropriato di pozzetti** per gli standard ed i campioni da lavorare. Posizionare i pozzetti nel loro supporto e le strisce che non si usano vanno riposte nella busta assieme alla bustina di essiccazione, risigillando bene la busta stessa.

10.3 Il latte può essere usato direttamente nel saggio senza alcuna preparazione. I campioni devono essere conservati in un luogo fresco. Aggiungere **100 µl** per pozzetto di Zero Standard (**St1**) o campione (vedere il capitolo 9 in caso di polvere). Coprire i micropozzetti con la pellicola di tenuta, agitare manualmente la micropiastra per 30 secondi e incubare a temperatura ambiente per **20 minuti**. Durante questa fase, preparare il Wash Buffer 1X (vedere passo 10.4).

10.4 Diluire la soluzione 20X con acqua distillata per dare un Wash Buffer 1X.

Preparare il Wash Buffer 1X: nel caso durante la conservazione del Wash Buffer concentrata si fossero formati cristalli, è necessario scioglierli completamente riscaldando la bottiglietta tra le mani e mescolando gentilmente. Aggiungere l'intero contenuto del Wash Buffer concentrata (50ml) in cilindro graduato da 1000 ml pulito, sciacquare la bottiglietta con acqua deionizzata e svuotarla nel cilindro. Portare a volume finale di 1000ml. Mescolare delicatamente per evitare la formazione di schiuma e trasferire la soluzione così preparata in un contenitore o in una spruzzetta pulita. La **soluzione 1X** può essere lasciata a temperatura ambiente durante la procedura d'analisi ma alla fine dovrà essere riposta nel frigo a 2-8°C. IL Wash Buffer diluita può essere conservata in frigorifero per un mese (30 giorni).

10.5 Rimuovere la pellicola sigillante e lavare la piastra nel modo seguente: Aspirare il liquido da ciascun pozzetto (200 µl / pozzetto) nel lavandino e toccare con forza il supporto dei micropozzetti capovolto (quattro volte di seguito) su una carta assorbente per assicurare la rimozione completa di liquido dai pozzetti. Dispensare 300µl di **Wash Buffer 1X** (vedere il punto 5) in ciascun pozzetto con flacone di lavaggio o micropipetta multicanale utilizzando il serbatoio del reagente appropriato e scuotendo manualmente la piastra per alcuni secondi. Ripetere questo processo per ancora tre volte (**totale 4 volte**). **ATTENZIONE:** è importante che i micropozzetti non si asciughino tra le fasi di lavoro.

10.6 Aspirare il liquido come sopra descritto e aggiungere **100µl** di **Detection Solution** ad ogni pozzetto. Se il numero di pozzetti è superiore a 32 (quattro strisce), è necessaria una pipetta ripetitiva o una pipetta multicanale (versare 1 ml di Detection Solution in un serbatoio per 8 pozzetti). Coprire i micropozzetti con la pellicola sigillante, agitare manualmente la piastra per 30 secondi e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.

10.7 Rimuovere il film trasparente e ripetere i lavaggi come al punto **10.5**.

10.8 Aspirare il liquido da ciascun pozzetto e toccare con forza il supporto dei micropozzetti capovolto sulla carta assorbente come sopra descritto e aggiungere **100 µl** per pozzetto di **TMB Substrate** (versare 1 ml per 8 pozzetti in un serbatoio). Coprire i micropozzetti con la pellicola sigillante, agitando la piastra manualmente per alcuni secondi e incubare al buio a temperatura ambiente per **5 minuti**.

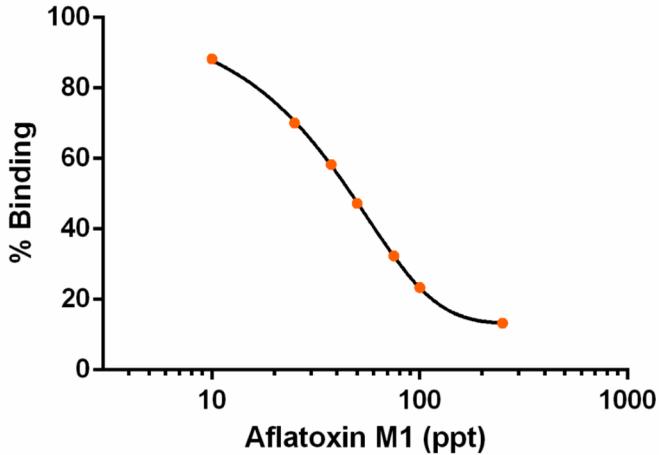
10.9 Rimuovere la pellicola sigillante e aggiungere **100 µl** per pozzetto della **Stop Solution** a ciascun pozzetto (versare 1 ml per 8 pozzetti in un serbatoio). Mescolare delicatamente agitando di nuovo la piastra manualmente.

10.10 Misurare l'assorbanza a **450 nm**. Leggere il valore di assorbanza di ciascun pozzetto (entro 60 minuti dopo il punto 10.9) su uno spettrofotometro usando 450 nm come lunghezza d'onda primaria e opzionalmente 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento (da 610 nm a 650 nm è accettabile).

11. Analisi dei Dati

Uno speciale software, **Prognosis-Data-Reader**, è disponibile per il download gratuito da www.prognosis-biotech.com per valutare il kit Bio-Shield M1 FAST ELISA. La valutazione viene effettuata da un semplice trasferimento di valori dopo la misura. I valori B/Bo(%) degli standard sono riportati nel Certificato di Qualità. Alternativamente, digitare il numero di lotto del kit, i valori B/Bo(%) vengono scaricati automaticamente.

12. Esempio di curva standard (0-250ppt)



13. Specifiche del Saggio

13.1 Specifiche Generali

- Coefficiente di Variazione (CV) del risultato a 50ppt = 8,25% (n = 16)

13.2 LOD - LOQ - Recupero

		Latte crudo e omogeneizzato	Latte intero in polvere
LOD		5ppt	50ppt
LOQ		10ppt	100ppt
Accuratezza (del risultato)	Recupero (concentrazione: fra 25 e 100ppt of AFM1)	99.4%	110%
	Intervallo soddisfa- cente	79-119%	85-135%

13.3 Specificità

La reazione incrociata dell'anticorpo anti-aflatoxina M1 con Aflatoxina M2 è <0,1%.

14. Riassunto del Metodo

Durata del procedimento totale (dopo la preparazione dei campioni e dei reattivi): **30 minuti**.

Aggiungere 100µl di Standard e Campioni nella micropiastra



Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100µl di Detection Solution



Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100µl di TMB Substrate



Lasciare che il colore si sviluppi per 5 minuti al buio a temperatura ambiente



Aggiungere 100µl di Stop Solution



Leggere l'assorbanza a 450nm entro 60 min

ProGnosis Biotech S.A, può garantire che i suoi prodotti possono soddisfare oppure superare le specifiche pubblicate sul relativo manuale operativo, quando vengono usati in condizioni normali di laboratorio. In più può garantire l'immediata sostituzione e spedizione di ogni kit difettoso naturalmente prima la sua scadenza.

ProGnosis Biotech S.A non fornisce nessuna garanzia esplicita o implicita oltre che i suoi prodotti sono di qualità standard. Non vi è alcuna garanzia di commerciabilità del prodotto, o l'idoneità del prodotto per qualsiasi scopo. ProGnosis Biotech S.A. non è responsabile di eventuali danni, inclusi quegli speciali o consequenziali, o costi derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo di questo prodotto. Questo kit costituisce un metodo di screening. In caso di campioni positivi si raccomanda di eseguire analisi con metodi di conferma prima di intraprendere qualsiasi azione legale. Questo prodotto è destinato esclusivamente per scopi di ricerca o l'industria e deve essere utilizzato da personale qualificato.



FOLLOW @PROGNOSIS_



JOIN US ON
FACEBOOK



PROGNOSIS

BIOTECH

ProGnosis Biotech S.A.

R&D, In vitro diagnostics, Biotechnology Marketplace

Iroon Polytechniou 71

Larissa, Greece, 41222

tel: 2410 623922 / 2310 952738

fax: 700 700 6262

WEB: WWW.PROGNOSIS-BIOTECH.COM