



BIO-SHIELD TOTAL ES

B2348 / B2396

ELISA test per la determinazione quantitativa Totale di
Aflatossina in grani, cereali, spezie ed alimentazione
animale

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 solamente la versione corrente del relativo manuale operativo contenuto nel kit.

Bio-Shield Total Extra Sensitive, B2348/B2396, è un saggio immunoenzimatico che determina l'aflatoxina totale nei cereali, nei cereali, nelle spezie e in altre materie prime, compresi i mangimi per animali. Il kit ELISA contiene tutti i reagenti necessari per il metodo. Il test ELISA è adeguato alle definizioni 48/96 (sono inclusi gli standard). Per la misurazione della micropiastra ELISA è richiesto uno spettrofotometro

Matrici:

- **Cereali:** Mais, Fiocchi di avena, Germogli di granturco, Farina di granturco, Grano, Orzo, DDGS, Silaggio, Soia, Riso, Segala, Avena, Fiocchi di avena, Branci di Brancia, Branci di Bran, Seme di Cotone, Sorgo, Girasole secco, Alfalfa
- **Dade Secchi:** Arachidi crudi, arachidi salati, burro di arachidi, mandorle, burro di mandorle, nocciole, burro di nocciole, noci
- **Frutta secca:** Fichi secchi, uva passa, Date secche
- **Spezie:** Paprika, pepe, zenzero, cardamomo
- **Altro:** Caffè verde, Alimenti per animali, Lolium, Prugna, ceci, ceci arrostiti

- Preparazione del campione : estrazione
- Tempo totale di prova (tempo di incubazione dopo la preparazione dei campioni e reagenti): 20min
- Intervallo standard della curva: 0 - 10ppb
- Durata media: 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. Indicazioni 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. Valutazione delle Prestazioni	9
15. Riassunto del Metodo	10

1. Descrizione

Bio-Shield Total ES è un test ELISA per la rilevazione di aflatoossine totali in grani, spezie, cereali e mangimi per animali.

2. informazioni generali

Le aflatoossine (Aflatoxins) sono metaboliti tossici di massimo interesse per l'industria alimentare, prodotte dai funghi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ed *A. nomius*. Possono esercitare effetti nocivi quali immunosoppressivi, mutageni, teratogeni o cancerogeni. Le aflatoossine (AF) possono essere presenti in cereali, spezie, cereali e altri prodotti associati all'alimentazione umana o all'alimentazione animale. Colture possono essere contaminate con aflatoossine. AFB1 è la forma più tossica e la più frequentemente rilevata. Gli altri tipi (B2, G1 and G2) presentano un pericolo significativo se la loro concentrazione è ad un livello alto. gli animali sono esposti alle aflatoossine dal consumo di mangimi che presentano ceppi fungini che producono aflatoossine durante la crescita, raccolta o stoccaggio. I sintomi della tossicità variano da morte a malattie croniche, interferenze riproduttive e soppressione immunitaria, diminuita produzione di latte e uova. La maggior parte delle agenzie governative di controllo in tutto il mondo hanno regolamenti in merito alla quantità di aflatoossine ammissibili nei prodotti alimentari umani ed animali. La determinazione accurata e rapida della presenza di aflatoossina nelle materie prime è di fondamentale importanza.

3. Principio del metodo

Il test quantitativo si basa sui principi di dosaggio dell'immunosorbente enzimatico. I pozzetti che costituiscono la micropietra sono rivestiti con anticorpi specifici di aflatoossine totali. Le tossine vengono estratte da un campione di terreno con 70% di metanolo. Gli standard o i campioni di aflatoossina e il coniugato Aflatoxin-HRP (Detection Solution) vengono aggiunti nei pozzetti rivestiti. Il coniugato di Aflatoxin-HRP si lega ai siti di legame di anticorpi rivestiti che non sono già occupati da Aflatoossina di campioni o standard. Qualsiasi coniugato Aflatoxin-HRP non legato di Detection Solution viene rimosso in un passo di lavaggio. Un substrato cromogeno viene aggiunto ai pozzetti con conseguente sviluppo progressivo di un complesso colorato blu con l'anticorpo di rilevazione. Lo sviluppo del colore viene quindi interrotto con l'aggiunta di acido trasformando il risultato prodotto finale giallo. La misurazione è fatta fotometricamente a 450 nm e l'intensità del complesso colorato prodotto è indirettamente proporzionale alla concentrazione di aflatoxina totale presente nei campioni e negli standard.

4. Reagenti forniti

Bio-Shield Total ES ELISA kit contiene reagenti e materiali sufficienti per 48/96 misurazioni (include prove standard).

Reagenti (Stoccaggio a 2-8°C)	Quantità 48 pozzetti	Quantità 96 pozzetti	Stato	Colore del tappo
Micropietra	48 pozzetti	96 pozzetti	Pronta all'uso (prerivestita)	-
Pozzetti di diluizione	48 pozzetti	96 pozzetti	Pronti al uso (colore verde)	-
Diluente Matrice	1 fiala di plastica (12ml)	2 fiale di plastica (ciascuna 12ml)	Pronto al uso	Rosso
Standard 1-5 (0, 0.2, 0.5, 1 e 2ppb di AFB1 in soluzione organica) (corrispondente a 0,1, 2.5, 5 e 10ppb)	5 fiale di vetro (ciascuna.5ml)	5 fiale di vetro (ciascuna 1.5ml)	Pronte al uso	Nero
Total ES Detection Solution	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	Pronta al uso	Verde
Wash Buffer	1 fiala di plastica (50ml)	1 fiala di plastica (50ml)	20X Concentrato (diluire in acqua distillata)	Bianco
TMB Substrate	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	Pronto al uso	Marrone
Stop Solution	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	Pronta al uso	Bianco

5. Materiali richiesti ma non forniti

- Una smerigliatrice sufficiente a rendere campione alla dimensione delle particelle di caffè istantaneo fine.
- Bilancia con capacità di misura 0-50g e cilindro graduato - 100mL.
- Metanolo (grado di reagente 70mL per campione) ed acqua distillata o deionizzata.
- Carta da filtro Whatman #1 o equivalente, Filtro Funnel e vari tubi (plastici o di vetro) di laboratorio 50-125ml.
- Miscelatore a vortice e lettore di micropiastra con filtro di 450 nm.
- 100, 200 e 1000 µl micropipette a singolo canale regolabili con punte monouso (una pipetta ripetitiva di 100µl è accettabile per i passaggi di TMB e Stop Solution).
- 50-300 µl micropipetta multi-canale con punte e serbatoi monouso.

6. Istruzioni di stoccaggio

Conservare i reagenti del kit tra 2 e 8°C (35-46°F). Non congelare i componenti forniti. Richiudere immediatamente le strisce non utilizzate della piastra del microtiter nella borsa insieme con la bustina desiccante fornita e conservare a 2-8°C. Dopo l'uso, i reagenti rimanenti devono essere restituiti allo stoccaggio a freddo (2-8 ° C). La scadenza del kit e dei reagenti viene riportata rispettivamente sulle etichette e non è accettata alcuna garanzia di qualità dopo la data di scadenza. La scadenza dei componenti del kit può essere garantita solo se i componenti sono immagazzinati correttamente e se il reagente non è contaminato dalla prima manipolazione., in caso di uso ripetuto di un componente. A causa della mancanza di colore del TMB Substrate (incolore) e della sensibilità alla luce dei standard, evitare l'esposizione alla luce diretta. Non scambiare singoli reagenti tra kit di diversi numeri di lotto.

7. Sicurezza e precauzioni per l'uso

- Evitare qualsiasi contatto cutaneo con gli standard (AFB1), Stop Solution (15% H₃PO₄) e TMB (tossico). **Usare guanti.** In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
- Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambientale prima dell'uso e ricoperti quando non vengono utilizzati. **Utilizzare una punta di pipetta di plastica monouso per ogni reagente, in modo di evitare contaminazioni incrociate. Durante l'aggiunta dei reagenti con la pipetta, mantenere un ordine consistente di aggiunta da pozzetto a pozzetto. Questo garantisce tempi di incubazione uniformi per tutti i pozzetti.**

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare il Wash Buffer e tutto il liquido di lavaggio residuo deve essere scaricato dai pozzetti con un'efficace aspirazione o mediante decantazione seguita toccando la piastra con forza sulla carta assorbente. Non inserire mai carta assorbente nel pozzetto. Leggere l'assorbanza entro 60 minuti dopo il completamento del dosaggio.

8. Indicazione della corruzione dei reagenti del kit

- La colorazione bluastra del substrato cromogeno prima della prova ELISA.
- Un valore inferiore a 0,7 unità di assorbanza (450nm) per lo standard 1 (St1).

9. Preparazione del campione

Preparare la soluzione di estrazione (70% di metanolo) aggiungendo 30 ml di acqua distillata o deionizzata a 70 ml di metanolo (grado di reagente) per ogni campione da testare

- Il campione deve essere raccolto secondo tecniche di campionamento stabilite. Macinare un campione rappresentativo alla dimensione delle particelle di caffè istantaneo fine (il 50% passa attraverso uno setaccio di 20 mesh).
- Pesare una porzione del campione di 20g e aggiungere 100mL del solvente di estrazione (70% metanolo) e mescolare in un frullatore per un minimo di 2 minuti. **Il rapporto del campione con il solvente di estrazione è di 1: 5 (p / v).**
- Lasciare che il particolato si depositi, e poi filtrare 5-10 ml dell'estratto mediante un filtro di carta Whatman # 1 (o equivalente) e raccogliere il filtrato. Usare 50µl di ogni filtro direttamente nell'immunodosaggio.

NOTA 1: Il campione estratto deve avere un valore pH di 6,2-7,5. Se il pH è inferiore a 6,2, come accade per esempio sui campioni di silaggio, il pH deve essere neutralizzato utilizzando NaOH.

NOTA 2: Nel caso in cui l'utente effettui una diluizione supplementare di 1: 1 di filtrato con 70% di metanolo, l'intervallo di quantificazione diventa 0-20ppb. Quindi, utilizzare anche 50 µl di ogni filtrato diluito direttamente nell'immunodosaggio e moltiplicare il risultato AFP1 finale ppb x 2

10. Metodo di Procedura

10.1 Disegno del dosaggio: Determinare il numero di micropozzetti necessari per verificare il numero desiderato di campioni più il numero appropriato di pozzetti necessari per gli standard. Considerando che ogni campione e standard devono essere testati in duplice copia, creare un schema.. **NOTA:** Non utilizzare più di 48 pozzetti (sei strisce) in un singolo esperimento.

ATTENZIONE: Utilizzare le posizioni dei standard in duplicato come allo schema di esempio riportato sotto e notare posizioni di campioni che possono essere impostati su tutti i pozzetti vuoti di layout in duplicato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St1	St1										
B	St2	St2										
C	St3	St3										
D	St4	St4										
E	St5	St5										
F												
G												
H												

Example plate layout (esempio per una curva standard a 5 punti)

10.2 Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (19-24 ° C) prima dell'uso. Rimuovere gli **standard** (Standard 1-5) e posizionare due Micropozzetti di Diluizione (rosso) in un supporto per ogni standard e campione da testare in duplice copia. Inserire un uguale numero di pozzetti di micropiastra rivestiti con anticorpi in un altro supporto per micropozzetti. Immediatamente richiudere le strisce non utilizzate nella borsa insieme alla bustina di essiccazione fornita. I campioni devono essere conservati in un luogo fresco

10.3 Aggiungere **200 µl di Matrix Diluent** ad ogni Pozzetto di Diluizione.

10.4 Utilizzando una nuova punta pipetta per ciascuno, aggiungere **50µl** di ciascun standard (**Standard 1-5**) e preparare il campione in duplicato (vedere il capitolo 9) a un pozzetto di diluizione appropriato contenente Matrix Diluent. Mescolare pipettando almeno 5 volte.

10.5 Usando una pipetta multicanale, trasferire **100 µl** di contenuto da ciascuno Micropozzetto di Diluizione ad una corrispondente Micropiastra rivestita con Anticorpi. Coprire i micropozzetti con la pellicola ed incubare a temperatura ambiente per **10 minuti**. **NOTA:** Durante questa fase, preparare il Wash Buffer 1X (vedere passo 10.6).

10.6 Diluire la concentrazione di soluzione 20X 20 volte con acqua distillata per dare una soluzione

Preparazione del Wash Buffer 1X: In caso di presenza di cristalli nel Wash Buffer, è necessario il riscaldamento mediante smorzamento delicato (utilizzando le mani) dei cristalli. Versare tutto il contenuto della soluzione di concentrato (50ml) in un cilindro pulito da 1000ml, sciacquare la fiala con acqua distillata o deionizzata e versare nuovamente il contenuto nel cilindro e riempire fino a un volume finale di 1000 ml con acqua distillata o deionizzata. Mescolare delicatamente per evitare schiuma, trasferendo la soluzione finale dal cilindro ad una bottiglia pulita e indietro due volte. La bottiglia pulita con Wash Buffer 1X può essere lasciata fuori dal frigorifero durante la procedura del metodo e successivamente conservata 2-8 ° C per un mese.

10.7 Rimuovere la pellicola di tenuta e lavare la piastra come segue: Aspirare il liquido da ogni pozzetto nel lavandino e toccare con forza (quattro volte in fila) il supporto dei micropozzetti capovolto, su una carta assorbente per assicurare la completa rimozione del liquido dai pozzetti. Dispensare **300µl di Wash Buffer 1X** (vedere 10.6) in ciascun pozzetto con una bottiglia di lavaggio o una micropipetta multicanale usando il serbatoio del reagente corretto e scuotendo la piastra manualmente per alcuni secondi. Ripetere questo processo ancora tre volte (**totale 4 volte**). **ATTENZIONE:** è importante non permettere che i microsetti si asciugino tra i punti di lavoro.

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

10.9 Rimuovere la pellicola di tenuta e lavare la piastra come passo di **lavaggio 10.7**.

10.10 Aspirare il liquido come sopra descritto e aggiungere **100µl** per pozzetto di **TMB Substrate** (versare 1ml per 8 pozzetti in un serbatoio). Coprire i micropozzetti con la pellicola di tenuta, scuotendo manualmente la piastra per alcuni secondi e incubare nel buio a temperatura ambiente per **5 minuti**

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

10.12 Misurare l'assorbanza a 450nm. Leggere il valore di assorbanza di ciascun pozzetto (entro 60 minuti dopo la fase 10.11) su uno spettrofotometro usando 450 nm come lunghezza d'onda primaria e facoltativamente 620nm come lunghezza d'onda di riferimento (da 610nm a 650nm è accettabile).

11. Analisi dei dati

- Automaticamente

Un software assegnato, il **Prognosis-Data-Reader**, è disponibile per il download gratuito da www.prognosis-biotech.com per valutare il kit Bio-Shield Total ES ELISA. La valutazione viene eseguita con un semplice trasferimento di valori di dati dopo la misurazione.

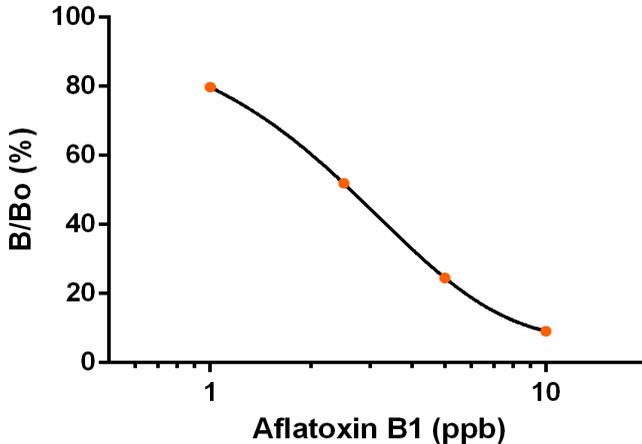
- Manualmente

Calcolare i valori medi di assorbanza per ogni serie di standard e campioni duplicati. Idealmente i duplicati dovrebbero essere entro il 10% della media. Utilizzare il seguente calcolo:

$$\frac{\text{Standard o assorbanza del campione}}{\text{Standard 1 assorbanza}} \times 100 = \% \text{ Binding}$$

Lo standard 1 è pari al 100% e i valori di assorbanza sono citati in percentuali. La concentrazione di Aflatossina Totale (ppb) in ciascun campione è determinata mediante l'estrapolazione di valori di OD contro le concentrazioni di Aflatossina Totale in soluzioni standard usando una curva standard di decadimento espanso a due fasi con asse X logaritmico.

12. Esempio di Curva Standard (0-10ppb)



13. Immunodosaggio Specificazione

13.1 Specifiche generali

- IC50 = 1.1 - 4.3 ppb
- Ciascun duplicato standard significa CV ≤ 6%
- Coefficiente di Variazione (CV) di risultato a 4ppb = 4.5% (n=16)
- Coefficiente di Variazione (CV) di risultato a 5ppb = 5.7% (n=16)

13.2 LOD - LOQ - Accuratezza

- Il LOD del metodo è 0.2ppb
- Il LOQ del metodo è 0.6ppb
- Il recupero delle matrici di estrazione spiked è stato del 98.1% (CV = 6.9%).
- **Matrici: Grani:** Mais, Fiocchi di granturco, Grano, Orzo, Silaggio, Fagioli di Soia, Riso, Avena, Focci di avena, Crusca di avena, Bastoni di Bran, Cotone, Sorgo, Girasole secco, Alfalfa. **Dade secche:** Arachidi crudi, arachidi salati, nocciole, mandorle **Frutta secca:** uva passa Altro: Caffè verde, Alimenti per animali da compagnia, ceci, ceci arrostiti.

13.3 Specificità

La reazione incrociata dell'anticorpo anti-aflatossina con Aflatossina B1, B2, G1 e G2 è rispettivamente di 100, 98, 97 and 86%.

14. Valutazione delle prestazioni

14.1 Proficiency Tests

Test	Valore Aseg-nato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Risultato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Z-score
BIPEA 31b 154 Mycotoxins - Cereals - Bran - 02-3631 - April 2017	28.0	21.5	-0.90

15. Sommario del metodo

Tempo totale di procedura (dopo preparazione dei reagenti e dei campioni): 20 min.

Mescolare 200 μ l del Matrix Diluent con 50 μ l di campioni e standard nei Micropozzetti di Diluizione



Trasferire 100 μ l da ciascun pozzetto dei Micropozzetti di Diluizione nei Micropozzetti rivestiti di anticorpi



Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100 μ l di Detection Solution



Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100 μ l di TMB Substrate



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



Aggiungere 100 μ l di Stop Solution



Leggere l'assorbanza a 450nm entro 60 minuti

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