



BIO-SHIELD

M1 ES

ELISA TEST | Analisi in vitro

per la determinazione quantitativa di Aflatossina M1 nel latte, latte in polvere, formaggio, burro e yogurt

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.

Questo kit ELISA è stato convalidato dall' Istituto per la ricerca agricola, della pesca e degli alimenti (ILVO) in Belgio.

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 ES, B2048/B2096/B20192 è un saggio immunoenzimatico con cui si può determinare la quantità dell'aflatossina M1 nel latte, latte in polvere, formaggio, burro e yogurt. Il presente kit ELISA contiene tutti i reagenti necessari per il metodo ed è sufficiente per 48/96/192 determinazioni (inclusi gli standard). Per la misurazione della micropiastra ELISA è richiesto uno spettrofotometro.

- Preparazione del campione: latte: nessuna, latte in polvere: ricostituzione, formaggio / burro: estrazione, evaporazione, ricostituzione, centrifugazione, dissoluzione e yogurt: dissoluzione.
- Tempo totale della prova (tempo di incubazione dopo la preparazione dei campioni e reagenti): 75min.
- Intervallo standard della curva: 0 - 250ppt.
- Durata media: 12 mesi.
- Conservazione a 2-8°C .

1. Descrizione

Il Bio-Shield M1 ES (Extra sensibile) è un test immunoenzimatico ELISA per la determinazione quantitativa dell'aflatossina M1 nel latte, latte in polvere, formaggio, burro e yogurt.

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 micropiastra contengono anticorpi specifici per l'AFM1 adsorbiti sul fondo. Le soluzioni standards e i campioni vengono aggiunti ai pozzetti. L'AFM1 degli standards e 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 negli standards e 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 negli standards e nei campioni.

4. Reagenti forniti

Il presente kit ELISA contiene tutti i reagenti necessari per il metodo ed è sufficiente per 48/96/192 determinazioni (inclusi gli standard).

Reagenti (Stoccaggio a 2-8°C)	Quantità 48 pozzetti	Quantità 96 pozzetti	Quantità 192 pozzetti	Stato	Colore del tappo
Micropiastra	48 pozzetti	96 pozzetti	2 Micropiastre (ciascuna 96 pozzetti)	Pronta all'uso (pretrattata)	-
Pellicola di tenuta	2 fogli	2 fogli	4 fogli	Pronta all'uso	-
Standard 1-7 (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250ppt di AFM1)	7 fiale di vetro (ciascuna 1.5ml)	7 fiale di vetro (ciascuna 1.5ml)	7 fiale di vetro (ciascuna 3.0ml)	Pronte all'uso	Nero
M1 Detection Solution	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	2 fiale di plastica (ciascuna 12ml)	Pronta all'uso	Verde
Wash Buffer	1 fiala di plastica (50ml)	1 fiala di plastica (50ml)	1 fiala di plastica (50ml)	20X Concentrato (Da diluire prima dell'uso)	Bianco
TMB Substrate	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	2 fiale di plastica (ciascuna 12ml)	Pronta all'uso	Marrone
Stop Solution	1 fiala di plastica (6ml)	1 fiala di plastica (12ml)	1 fiala di plastica (12ml)	Pronta all'uso	Bianco
AFM1-free milk	1 fiala di plastica (30ml)	1 fiala di plastica (30ml)	1 fiala di plastica (50ml)	Pronta all'uso	Bianco
Yogurt Buffer	1 fiala di plastica (15ml)	1 fiala di plastica (15ml)	2 fiale di plastica (ciascuna 15ml)	Pronta all'uso	Rosso

5. Materiali richiesti ma non forniti

- Centrifuga, Agitatore magnetico, 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).
- Micropipetta multicanale da 50 a 300µl con punte monouso.
- Acqua distillata, metanolo, diclorometano, esano e pepsina.

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 il sale 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 e delle soluzioni standard evitare l'esposizione a luci dirette. Non scambiare i singoli reattivi di kit di lotti differenti.

7. Sicurezza e precauzioni per l'uso

- Evitare il contatto della pelle con gli standard (AFM1), 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.**
- Prima dell'uso i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente. Usare sempre puntali puliti per dosare i differenti reagenti e i diversi campioni. Mantenere un ordine uniforme dei reagenti aggiunti, da pozzetto a pozzetto. Questo assicurerà tempi uguali per tutti i pozzetti di incubazione.
- 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 standard 1 (St1).

9. Preparazione dei campioni e reagenti

9.1 Preparazione dei reagenti

Diluire la soluzione 20X con acqua distillata per dare una soluzione di lavoro 1X.

Preparare il Wash Buffer 1X: nel caso durante la conservazione del Wash Buffer concentrato si fossero formati cristalli, è necessario discioglierli completamente riscaldando la bottiglietta tra le mani e mescolando gentilmente. Aggiungere l'intero contenuto del Wash Buffer concentrato (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 diluito può essere conservato in frigorifero per un mese (30 giorni).

9.2 Preparazione dei campioni

9.2.1 Latte fresco

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

Il fattore di diluizione è 1.

9.2.2 Latte in Polvere

Ricostituire il latte in polvere secondo le istruzioni del produttore. Se non ci sono istruzioni disponibili, mescolare 1g di latte in polvere con acqua deionizzata o distillata fino a 10 ml. Mescolare bene e successivamente utilizzare 100 µl di ciascun campione direttamente nella piastra.

Il fattore di diluizione è 1, quando si riferisce al latte ricostituito.

Il fattore di diluizione è 10, quando si riferisce al latte in polvere.

9.2.3 Formaggio / Burro

9.2.3.1 Metodo di Diclorometano (DCM) per il Formaggio e Burro

Pesare 2g di un campione rappresentativo (finemente grattugiato e non della crosta) in una fiala di vetro da centrifuga con tappo a vite e aggiungervi 8 ml di diclorometano. Estrarre mescolando/scuotendo la vial e incubare a temperatura ambiente (19 - 24°C) per 30 min. Centrifugare la sospensione per 10 min. a 3000 xg a temperatura ambiente. Trasferire 4 ml dell'estratto e evaporare a 60 °C sotto corrente di Azoto. Ridissolvere il residuo oleoso in 0.5ml di metanolo puro al 100%, 0.5ml di acqua distillata e aggiungere 2ml di esano per sgrassare. Mescolare bene e centrifugare ancora per 10 min. a 3000 xg. Prelevare con una pipetta Pasteur la parte inferiore con la fase metanolica-acquosa. Diluire una parte di essa 1:10 (1+9) con AFM1-free milk (es. diluire 50µl con 450µl di AFM1 free milk). Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit. **Il fattore di diluizione è 10.**

9.2.3.2 Metodo di Pepsina per il Formaggio

Pesare 2.5g di un campione rappresentativo del formaggio (finemente grattugiato e non della crosta) in un provettone da centrifuga da 50 ml ed aggiungere 25ml di una soluzione di pepsina allo 0.2% in 0.1N HCl. Incubare a temp. ambiente per 16 ore, sotto agitazione. Centrifugare a 4000xg a temperatura ambiente per 15 minuti. Filtrare il surnatante su filtro di carta in modo da eliminare il grasso. In 10 ml di filtrato aggiungere 0,2 ml di NaOH 5N e assicurarsi che il pH sia 7-7,5. Diluire 1: 1 (1 + 1) con AFM1-free milk (ad esempio diluire 0,5 ml con 0,5 ml di AFM1-free milk). Utilizzare 100 µl di ciascun campione direttamente nella piastra. **Il fattore di diluizione è 20.**

9.2.4 Campioni di Yogurt

9.2.4.1 Yogurt

In una provetta da 15 ml aggiungere 1 g di campione di yogurt, 0,5 ml di acqua deionizzata e 1,5 ml di yogurt buffer. Mescolare bene con il vortice (15 sec). Utilizzare 100 µl di ciascuna miscela campione direttamente nella piastra. **Il fattore di diluizione è 3.**

9.2.4.2 Bevanda di yogurt

In una provetta da 15 ml aggiungere 1 ml (o 1 g) di campione di bevanda yogurt e 1 ml di Yogurt Buffer. Mescolare bene con il vortice (15 sec). Utilizzare 100 µl di ciascuna miscela campione direttamente nella piastra. **Il fattore di diluizione è 2.**

10. Procedura del Metodo

10.1 Progettazione dell' esperimento: Determinare il numero di pozzetti necessari per il numero desiderato di campioni e standard. Considerando che ogni campione e standard possono essere testati singolarmente o in doppio, quindi creare un schema.

NOTA: Se il numero dei pozzetti è superiore a 32, una pipettrici ripetitiva o pipettrici multi-canale è necessaria nel caso della Detection Solution, TMB Substrate e Stop Solution.

ATTENZIONE: Utilizzare le posizioni degli Standard in duplicato come **da esempio layout della piastra**. Prendere nota delle posizioni dei campioni dai restanti pozzetti vuoti 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	St6	St6										
G	St7	St7										
H												

Esempio layout della piastra (esempio per una curva standard con 7 punti)

10.2 Portare i reagenti e gli estratti del campione a temperatura ambiente (19 - 24°C). Rimuovere gli **standard** e il **numero appropriato di pozzetti** per gli standard ed i campioni per lavorare in duplicato. Posizionare i pozzetti nella micropiastra e le strip che non si usano vanno riposte nella busta assieme all'essicatore risigillando bene la busta stessa.

10.3 I campioni devono essere conservati in un luogo fresco. Aggiungere **100 µl** per pozzetto per ciascuno standard (**standard 1 - 7**) o campione preparato (vedere il Capitolo 9) in duplicato. Se il numero di pozzetti è superiore a 64 (otto strisce), si consiglia di utilizzare i micropozzetti di diluizione e una pipettrici multicanale. Coprire i micropozzetti con la pellicola sigillante, agitare manualmente la micropiastra per 30 secondi e incubare a temperatura ambiente per **45 minuti**.

10.4 Rimuovere la pellicola sigillante e lavare la piastra come segue: Rimuovere il liquido da ciascun pozzetto nel lavandino e battere con forza il supporto dei micropozzetti capovolto (quattro volte di seguito) su una carta assorbente per assicurare la completa rimozione del liquido dai pozzetti. Dispensare **300µl di Wash Buffer 1X** (vedere 9.1) in ciascun pozzetto con un flacone di lavaggio o una micropipetta multicanale e scuotendo manualmente la piastra per alcuni secondi. Ripeti questo processo per altre tre volte (**totale 4 volte**). **ATTENZIONE:** è importante che i micropozzetti non si asciughino tra le fasi di lavoro.

10.5 *Rimuovere il liquido come sopra descritto* e aggiungere **100 µL di Detection Solution** ad ogni pozzetto. Se il numero dei pozzetti è maggiore di 32, utilizzare una pipetta a ripetizione o una pipettrici multicanale (versare 1 ml di Detection Solution in un reservoir). Coprire i pozzetti con il film trasparente e mescolare delicatamente l'intera piastra per 30 secondi. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.

10.6 Rimuovere il film trasparente e ripetere i lavaggi come al punto **10.4**.

10.7 *Rimuovere il liquido come sopra descritto* e aggiungere **100µl di TMB Substrate** (versare 1 ml per 8 pozzetti in un reservoir). Coprire i micropozzetti con la pellicola sigillante, agitando manualmente la piastra per alcuni secondi e incubare al buio a temperatura ambiente per **15 minuti**.

10.8 Rimuovere il film trasparente, **senza sciacquare** aggiungere **100 µl di Stop Solution** in ogni pozzetto (versare 1 ml per 8 pozzetti in un reservoir). Mescolare delicatamente agitando di nuovo la piastra manualmente.

10.9 Misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere il valore di assorbanza di ciascun pozzetto (entro 60 minuti) 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

• Automaticamente

Un software assegnato, il **Prognosis-Data-Reader**, è disponibile per il download gratuito (contatto: info@prognosis-biotech.com) per valutare il kit Bio-Shield M1 ES ELISA. La valutazione viene eseguita con un semplice trasferimento di valori di dati dopo la misurazione.

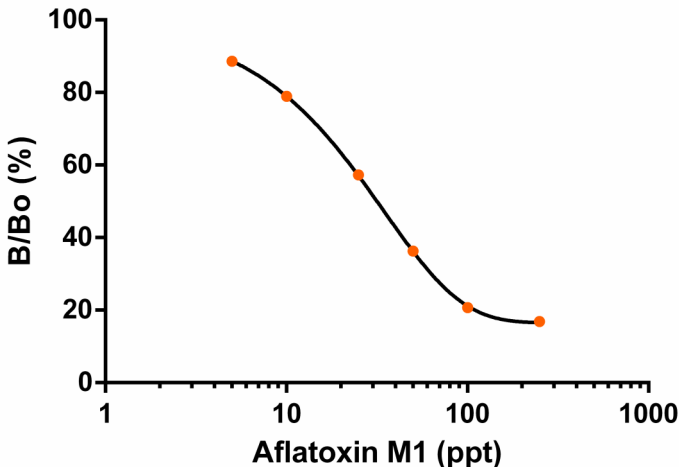
• Manualmente

Calcolare la media dei valori di assorbanza per ogni set di standards e campioni in doppio. Idealmente i duplicati dovrebbero avere un valore entro il 10% della media. Usare il seguente calcolo :

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o dei campioni)}}{\text{Assorbanza dello St1}} \times 100 = \% \text{ Legante}$$

Lo standard 1 è uguale al 100% e i valori di assorbanza sono quotati in percentuale. La concentrazione di AFM1 (in ppt) in ogni campione è determinata estrapolando i valori di assorbanza sulla concentrazione dell'AFM1 nelle soluzioni standard usando una curva standard a decadimento esponenziale a due fasi con l'asse logaritmica dell'asse X.

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



13. Specifiche del Saggio

13.1 Specifiche Generali

- Media di B0 (St1) (ABS 450nm) ≥ 0.7 .
- $IC_{50} = 22,5-50$ ppt.
- $CV \leq 6\%$ Per la media di ogni standard in duplicato
- Precisione (intervallo 0-250ppt): Intra-saggio $CV < 5\%$ e Inter-saggio $CV < 10\%$.

- Specificità: L'anticorpo anti-Aflatossina M1 non ha reazioni crociate con composti analoghi (Aflatossina M2), altre micotossine (Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo e Fumonisin B1) e altri composti non correlati, come antibiotici (Benzilpenicillina, Cefalonio, Ossitetraciclina, Eritromicina, Neomicina, Enrofloxacin, Sulfadiazina, Trimetoprim e Dapsone).

13.2 LOD - LOQ - Accuratezza

		Latte crudo e omogeneizzato	Latte intero in polvere	Formaggio / Burro	Formaggio	Campioni di Yogurt	
				Metodo DCM	Metodo Pepsina	Yogurt	Yogurt da bere
LOD		2ppt	2ppt*	2ppt*			
LOQ		5ppt	5ppt*	5ppt*			
Accuratezza (del risultato)	Recupero (concentrazione : fra 10 e 75ppt of AFM1)	100% ± 20%	110% ± 20%	100% ± 20%			

*latte ricostituito o diluito

14. Valutazione delle Prestazioni

14.1 Materiali di Riferimento

Diversi materiali di riferimento vengono utilizzati per la valutazione di ciascun prodotto di ProGnosis Biotech S.A. nel contesto del controllo di qualità effettuato dal dipartimento Controllo qualità. Per ricevere un Report di Validazione, contenuto i risultati, rivolgersi a info@prognosis-biotech.com.

14.2 Proficiency Tests

Tutti i prodotti partecipano frequentemente a Proficiency Tests. Per maggiori informazioni si prega di visitare la scheda di ciascun prodotto sul nostro sito: www.prognosis-biotech.com

15. Riassunto del Metodo

Durata del procedimento totale: **75 minuti**.

Aggiungere 100µl di ciascuno Standard e Campione nella micropiastra



Incubare per 45 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100µl di Detection Solution



Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente



Lavare quattro volte



Aggiungere 100µl di TMB Substrate



Lasciare che il colore si sviluppi per 15 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.



www.prognosis-biotech.com

e: info@prognosis-biotech.com

t: +30 2410 623922 | f: +30 700 700 6262