



BIO-SHIELD
M1 ES

B2048 / B2096

Il test ELISA per la determinazione quantitativa di aflatossina
M1 nel latte, latte in polvere, formaggio, burro e yogurt

Analisi in vitro
Stoccaggio a 2-8°C

www.prognosis-biotech.com

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

La Società Prognosis Biotech S.l.r è certificata con EN ISO 9001: 2008 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 è un saggio immunoenzimatico con cui si può determinare la quantità dell'aflatossina M1 nel latte e nei suoi derivati, 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 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 di 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 .

TABLE OF CONTENTS

1. Descrizione	4
2. Informazioni generali	4
3. Principio del metodo	4
4. Reagenti forniti	4
5. Materiali richiesti ma non forniti	4
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 (0-250ppt)	8
13. Specifiche del Saggio	8
14. Valutazione delle Prestazioni	9
15. Riassunto del Metodo	10

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 micropiastre 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 determinazioni (inclusi gli standard).

Reagenti (Stoccaggio a 2-8°C)	Reagents (Store at 2-8°C)	Quantità 48 pozzetti	Quantità 96 pozzetti	Stato	Colore del tappo
Micropiastre	Single-Break Strip Plate	48 pozzetti	96 pozzetti	Pronta all'uso (pretrattata)	-
Standard 1-7 (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250ppt di AFM1)	Standards 1-7 (0, 5, 10, 25, 50, 100 and 250ppt of AFM1)	7 fiale (contenenti ciascuna 1.5ml)	7 fiale (contenenti ciascuna 1.5ml)	Pronte all'uso	Nero
Soluzione di Rilevazione	M1 ES Detection Solution	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Verde
Soluzione di Lavaggio 20X	Wash Buffer 20X	1 fiala (50ml)	1 fiala (50ml)	Da diluire prima dell'uso	Bianco
Substrato TMB	TMB Substrate	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Marrone
Soluzione di Stop	Stop Solution	1 fiala (6ml)	1 fiala (12ml)	Pronta all'uso	Bianco
AFM1-free milk	AFM1-free milk	1 fiala (30ml)	1 fiala (30ml)	Pronta all'uso	Bianco
Yogurt Buffer	Yogurt Buffer	1 fiala (15ml)	1 fiala (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 Soluzione Coniugato, del Substrato e della Soluzione di Stop).

- Micropipetta multicanale da 50 a 300µl.
- Acqua deionizzata o 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 a kit di lotti differenti.

7. Sicurezza e precauzioni per l'uso

- Evitare il contatto della pelle con gli standard (AFM1), la soluzione di Stop (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 di reagente aggiunta da pozzetto a pozzetto. Questo assicurerà tempi uguali per tutti i pozzetti di incubazione.
- Usare contenitori di plastica puliti per preparare la soluzione di lavaggio. Non inserire carta assorbente nei pozzetti per eliminare la soluzione di lavaggio 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 Soluzione di Stop 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 (S1).

9. Preparazione dei campioni

9.1 Latte fresco

Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit. In caso di latte di pecora o capra si consiglia di centrifugare il campione per 10 minuti a 3000xg, quindi rimuovere il grasso con l'aiuto di una spatola.

9.2 Latte in Polvere

Pesare 1 gr di latte in polvere in un matraccio e portare a volume di 10ml con acqua distillata. Dissolvere la polvere completamente. Usare 100µl per pozzetto durante l'analisi.

9.3 Formaggio / Burro

9.3.1 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 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 il contenuto della vial AFM1-free milk (Tappo Bianco) (es. diluire 50µl con 450µl di buffer). Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit.

Il fattore di diluizione è 10.

Questa è una versione elettronica del manuale operativo, quindi assicuratevi di utilizzare sempre la versione più recente inclusa nel kit.

9.3.2 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 42°C 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. Prendere 10 ml di filtrato e neutralizzarli con 0.2ml di 5N NaOH. Verificare che il valore di pH sia tra 7 e 7.5. Diluire una parte di essa 1:1 (1+1) con il contenuto della vial AFM1-free milk (Tappo Bianco) (es. diluire 0.5ml con 0.5ml di buffer). Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit. **Il fattore di diluizione è 20.**

9.4 Campioni di Yogurt

9.4.1 Yogurt

Pesare 1 gr di yogurt in un provettone ed aggiungere 0.5ml di acqua distillata e 1.5ml di Yogurt Buffer. Agitare la miscela bene su vortex per 15 secondi. Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit. **Il fattore di diluizione è 3.**

9.4.2 Yogurt da Bere

Pesare 1 gr (1ml) di yogurt da bere in un provettone ed aggiungere 1ml di acqua distillata. Agitare la miscela bene su vortex per 15 secondi. Impiegare 100 µl per ogni campione direttamente nel kit. **Il fattore di diluizione è 2.**

10. Procedura di Metodo

10.1 Progettazione di esperimento: Determinare il numero di pozzetti necessari per testare il numero desiderato di campioni e standard. Considerando che i campioni devono essere caricati in duplicato, creare un layout. **NOTA:** Se il numero dei pozzetti è superiore a 32, una pipetta ripetitiva o pipetta multicanale è necessaria.

ATTENZIONE: Utilizzare le posizioni di standard in duplicato come l'esempio layout della piastra. Prendere nota delle posizioni di campioni da tutti i restanti pozzi 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 di 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 da lavorare in duplo. Posizionare i pozzetti nella micropiastra e le strip che non si usano vanno riposte nella busta assieme all'essiccatore risigillando bene la busta stessa.

10.3 Dispensare **100µl di ciascuno standard/campione** nell'appropriato pozzetto in duplicato. Assicurarsi di procedere per ogni passaggio con un puntale pulito. Coprire i pozzetti con il film trasparente fornito dal kit e mescolare delicatamente l'intera piastra per 30 secondi evitando di formare bolle d'aria. Incubare per **45 minuti** a temperatura ambiente. Durante questa fase, la soluzione di lavaggio 1X (punto 10.4).

10.4 Diluire la soluzione 20X con acqua distillata per dare una soluzione di Lavaggio **1X**.

Preparare la Soluzione di Lavaggio 1X: nel caso durante la conservazione della soluzione di lavaggio concentrata si fossero formati cristalli, è necessario scioglierli completamente riscaldando la bottiglietta tra le mani e mescolando gentilmente. Aggiungere l'intero contenuto della soluzione di lavaggio 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. La soluzione di lavaggio diluita può essere conservata in frigorifero per un mese (30 giorni).

10.5 Rimuovere il film trasparente e lavare i pozzetti come segue: aspirare o rovesciare in un lavandino 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. Riempire ciascun pozzetto con la **Soluzione di Lavaggio 1X (300µl in ogni pozzetto)** utilizzando una spruzzetta o una pipetta multicanale e agitare la piastra manualmente per pochi secondi. Ripetere il procedimento di lavaggio **per un totale di 4 volte**. **ATTENZIONE:** non lasciare asciugare i pozzetti tra un lavaggio e il successivo.

10.6 Aggiungere **100 µL di M1 ES Detection Solution** ad ogni pozzetto. Se il numero dei pozzetti è maggiore di 32, utilizzare una pipetta a ripetizione o una pipetta multicanale. Coprire i pozzetti con il film trasparente fornito dal kit e mescolare delicatamente l'intera piastra per 30 secondi evitando di formare bolle d'aria. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.

10.7 Rimuovere il film trasparente e ripetere i lavaggi come al punto 5.

10.8 Aggiungere **100µl di Substrato** ad ogni pozzetto e mescolare delicatamente l'intera piastra per 30 secondi evitando di formare bolle d'aria. Coprire i pozzetti con il film trasparente fornito e mescolare delicatamente manualmente per alcuni secondi. Quindi incubare al buio a temperatura ambiente per **15 minuti**.

10.9 Rimuovere il film trasparente senza sciacquare aggiungere **100 µl di Soluzione Stop** in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente l'intera piastra per 30 secondi evitando di formare bolle d'aria.

10.10 Leggere l'assorbimento dei pozzetti a **450nm** con uno spettrofotometro per micropozzetti (opzionale il filtro differenziale a 620nm, accettabile anche se compreso tra 610 e 650nm). La lettura può essere effettuata liberamente fino a 60 minuti dopo aver addizionato la Soluzione Stop.

11. Analisi dei Dati

- Automatica

Uno speciale software, **Prognosis-Data-Reader**, è disponibile per il download gratuito da www.prognosis-biotech.com per valutare il kit Bio-Shield M1 ES ELISA. La valutazione viene effettuata da un semplice trasferimento di valori dopo la misura.

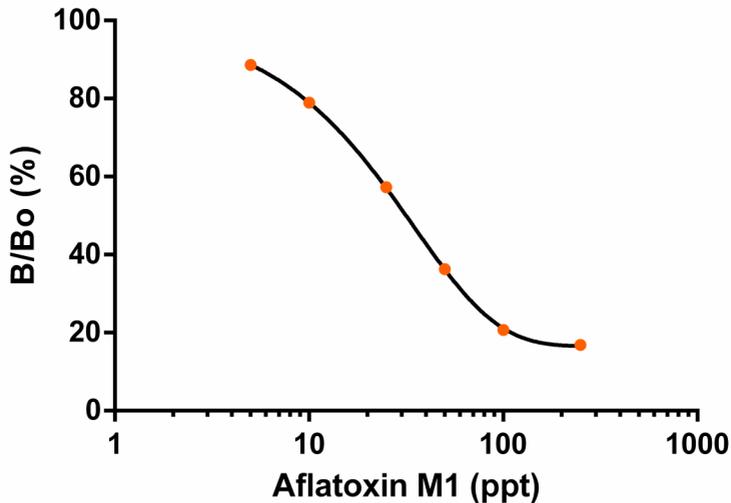
- Manuale

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.
- Media degli standard in doppio CV $\leq 6\%$.
- Precisione (intervallo 0-250ppt): Intra-saggio CV $< 5\%$ e Inter-saggio CV $< 10\%$.
- Specificità: La cross-reattività dell'anticorpo anti-Aflatossina M1 con la Aflatossina M2 è $< 0.1\%$.

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	20ppt	20ppt	40ppt	6ppt	4ppt
LOQ		5ppt	50ppt	50ppt	100ppt	15ppt	10ppt
Accuratezza (del risultato)	Recupero (concentrazione: fra 10 e 75ppt of AFM1)	99.4%	110%	96%	95.5%	98.3%	107%
	Intervallo soddisfacente	79-119%	85-135%	75-118%	76-114%	76-118%	86-130%

14. Valutazione delle Prestazioni

14.1 Proficiency Tests

Test	Numero del laboratorio	Valore Assegnato (ng/kg)	Risultato (ng/kg)	Z-score
FAPAS Proficiency Test 04217 Aflatoxin M1 in Milk Powder May-June 2013	38	115	114	0.0
FAPAS Proficiency Test 04259 Aflatoxin M1 in Milk Powder May-June 2015	23	102	93	-0.4
A.I.A. Proficiency Test Lotto RT M1 270916 Aflatossina M1 nel Latte September 2016	70	8.63	8.48	0.013
		20.27	19.31	
		33.10	32.79	
		50.25	51.66	
A.I.A. Ring Test Lotto RTF M1 251016 Aflatossina M1 nel Formaggio October 2016	14	331.13	321.9	-0.15
		36.26	40.02	0.14

14.2 Materiali di Riferimento

Materiale di riferimento	Lot number	Certified value (ng/kg)	Uncertainty (ng/kg)	Result (ng/kg)
Test Veritas MI1460-1/CM	Progetto Trieste 2014, Il round mycotoxin 2014	40.7	17.8	41.12
ERM [®] -BD284	N° 284	44.4	6.0	47.16
FAPAS Reference Material Milk Powder TET025RM	-	10.3	1.9	9.82
FAPAS QC Material Milk Powder T04300QC	-	10.1	4.5	10.03
A.I.A. Reference Material di Latte	MRM1 220316	6.1	2.23	6.54
		17.9	2.34	18.49
		36.5	4.47	37.96
		59.2	9.37	60.94

15. Riassunto del Metodo

Durata del procedimento totale (dopo la preparazione dei campioni e dei reattivi): **75 minuti**.

Aggiungere 100µl di Standard e Campioni nella micropiastra



Incubare per 45 minuti a temperatura ambiente



Lavare 4 volte



Aggiungere 100µl di Soluzione di Detection



Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente



Lavare 4 volte



Aggiungere 100µl di Substrato



Incubare per 15 minuti al buio a temperatura ambiente



Aggiungere 100µl di Stop Solution



Leggere l'assorbanza a 450nm

Prognosis Biotech Srl, 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 Srl 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.r.l. 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 Ltd

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

E-MAIL: INFO@PROGNOSIS-BIOTECH.COM