

RIDASCREEN[®] FAST Aflatoxin

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
aflatoxin

Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de
aflatoxina

Art. No.: R5202

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Almacenar entre 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®] and RIDASCREEN[®]
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDA[®] y RIDASCREEN[®]
son marcas registradas de la empresa R-Biopharm AG
Fabricante: R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG está certificada por el ISO 9001.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin (Art. Nr.: R5202) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin in Getreide und Futtermitteln.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays – inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Für die Durchführung des Tests ist keine spezielle über die eines Laboranten / Technikers hinausgehende Ausbildung erforderlich. Falls erforderlich, wird jedoch auf Anfrage eine kostenlose Einarbeitung angeboten.

Probenvorbereitung: extrahieren, filtrieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Getreide und Futtermittel ca. 10 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 15 min

Nachweisgrenze: < 1,7 µg/kg (ppb)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin in Getreide und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind karzinogene, hochtoxische Stoffwechselprodukte der Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*.

Aflatoxin B₁, das fast immer gemeinsam mit Aflatoxin B₂, G₁ und G₂ vorkommt, wird vor allem in Getreide, Mais, Baumwollsaamen und verschiedenen Nüssen gefunden.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Aflatoxin (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin konkurrieren um die Aflatoxin Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Hinzugegeben wird Substrat/Chromogen und gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können bis zu 43 Bestimmungen durchgeführt werden (plus 5 Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Kavitäten, teilbar),
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 5 x Aflatoxin Standardlösungen *), je 1,3 ml
0 ppb (Nullstandard), 1,7 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 45 ppb
Aflatoxin in Methanol/Wasser, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (3 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes Aflatoxin
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Aflatoxin-Antikörper (3 ml).....schwarzer Verschluss
gebrauchsfertig
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml).....brauner Verschluss
rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml)..... gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 10, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können Aflatoxin-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messzylinder (Plastik oder Glas), 100 ml
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (50 ml) aus Glas
- Labor- oder Getreidemühle
- optional: Schüttler
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- 50 µl, 100 µl und 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- Methanol
- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten Aflatoxin. Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

Die Dekontamination der Glasgeräte und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die rötlich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Test kann bei entsprechender Lagerung mindestens bis zum Verfallsdatum (angegeben auf der Kitpackung) für eine ordnungsgemäße Analyse eingesetzt werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlichen Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml Methanol (70 %) *) hinzufügen
- 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren
- 1 ml des Filtrats mit 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

*) die Probeneinwaage kann vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen von Methanol/Wasser entsprechend angepasst werden z. B. 10 g in 50 ml Methanol (70 %)

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
2. Die spezifische Reaktion startet erst mit der Zugabe des spezifischen Antikörpers. Wenn eine einfache Pipette eingesetzt wird, sollten trotzdem nicht mehr als drei Streifen pro Testansatz eingesetzt werden. Bis zu 6 Streifen können bei Verwendung von Multistep-Pipetten eingesetzt werden.
3. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

Die **Aflatoxin Standards** liegen gebrauchsfertig vor. Der Verdünnungsfaktor 10 für die Proben wurde beim Etikettieren der Standardfläschchen bereits berücksichtigt. Deshalb kann die Aflatoxin-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Kavitäten ab. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 50 µl der anti-Aflatoxin-Antikörperlösung (schwarzer Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 10 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit Hilfe einer Waschflasche oder Multikanal-Pipette (250 µl pro Kavität) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen, die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 5 min (+/- 0,5) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Wir empfehlen für Einzelbestimmungen die Auswertung mit Logit/log und für Doppel- oder Mehrfachbestimmungen sollte Cubic Spline verwendet werden.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Aflatoxin-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

Die Aflatoxin-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Eichkurve abgelesen werden.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin (Art. No.: R5202) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin in cereals and feed.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Technicians need no specialized training to perform the RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin test, however, free support is offered by the distributor on request, if necessary.

Sample preparation: extraction, filtration, dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
cereals and feedapprox. 10 min
test implementation (incubation time) 15 min

Limit of detection: < 1.7 µg/kg (ppb)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin assay is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin in cereals and feed.

2. General

Aflatoxins are carcinogenic, highly toxic metabolites of the mould fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*.

Aflatoxin B₁, generally present together with aflatoxin B₂, G₁ und G₂, is occurring mainly in cereals, corn, cotton-seed and some nuts.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies.

Aflatoxin standards or sample solutions, aflatoxin enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free aflatoxin and aflatoxin enzyme conjugate compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the aflatoxin concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for as many as 43 analyses (plus 5 standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)
coated with capture antibodies
- 5 x Aflatoxin standard solutions ^{*)}, 1.3 ml each
0 ppb (zero standard), 1.7 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 45 ppb
aflatoxin in methanol/water, ready to use
- 1 x Conjugate (3 ml)red cap
peroxidase conjugated aflatoxin
ready to use
- 1 x Anti-aflatoxin antibody (3 ml) black cap
ready to use
- 1 x Substrate/chromogen (10 ml) brown cap
stained red
- 1 x Stop solution (14 ml)yellow cap
contains 1 N sulfuric acid

*) The dilution factor 10 for the sample has already been considered. Therefore, the aflatoxin concentrations of samples can be read directly from the standard curve.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- graduated cylinder (plastic or glass), 100 ml
- glassware for preparing sample extract: filter funnel and 50 ml flask
- grinder (mill)
- optional: shaker
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- 50 µl, 100 µl and 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- methanol
- 70 % methanol solution: prepare 70 % methanol solution by mixing 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled or deionized water
- distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

The standards contain aflatoxin, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and aflatoxin solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

The test kit can be regularly used at least up to the expiry date (indicated on the kit package), if stored correctly.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light.

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

- weigh 5 g of ground sample into a suitable container and add 25 ml of methanol (70 %)*
- shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through Whatman No. 1 filter
- dilute 1 ml of the obtained filtrate with 1 ml of distilled or deionized water
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g. 10 g in 50 ml of methanol (70 %)

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. The specific reaction starts with the addition of the specific antibody. Nevertheless, not more than three strips should be applied to the test, when a single step pipette is used. More strips (up to 6) could be applied, when a multistep pipette is used.
3. Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

The **aflatoxin standards** are provided ready to use. The dilution factor 10 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the aflatoxin concentration of samples can be read directly from the standard curve.

10.2. Test procedure

Accurate washing is very important. Do not allow microwells to dry up totally and avoid prolonged intervals between the working steps. Reproducibility in any enzyme immunoassay is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the test procedure.

Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plates is recommended.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to each well.
4. Add 50 µl of anti-aflatoxin antibody solution (black cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Using a wash bottle or multichannel pipette, fill the wells (250 µl per well) with distilled or deionized water. Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 min (+/- 0.5) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

For single determinations we recommend logit/log evaluation and for double or multiple determinations cubic spline should be used.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the aflatoxin concentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

The aflatoxin concentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponding to the extinction of each sample can be read from the calibration curve.

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin

Información breve

El RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin (Art. No.: R5202) es un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina en cereales y piensos.

Todos los reactivos requeridos para el inmunoensayo enzimático - incluyendo los estándares - están contenidos en el kit.

Un kit alcanza para 48 determinaciones (incluyendo los estándares).

Para cuantificar se requiere un espectrofotómetro de microplaca.

No se necesita una formación especializada para la ejecución del test RIDASCREEN[®]FAST Aflatoxin. Sin embargo el distribuidor ofrece un soporte técnico gratuito.

Preparación de muestra: extracción, filtración, dilución

Tiempo requerido: preparación de muestra (para 10 muestras)
cereales y piensosaprox. 10 min
implementación del test
(tiempo de incubación)..... 15 min

Límite de detección: < 1,7 µg/kg (ppb)

1. Fin del uso

El RIDASCREEN®FAST Aflatoxin es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina en cereales y piensos.

2. Generalidades

Las aflatoxinas son productos metabólicos cancerígenos y altamente tóxicos de los hongos del género *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

La aflatoxina B₁ se encuentra en cereales, maíz, semillas de algodón, en diferentes nueces y casi siempre acompañada por las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂.

3. Principio del ensayo

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan los estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, el conjugado aflatoxina-enzima y los anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. El aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado. Se agrega substrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra.

4. Contenido del kit

Con los reactivos de un kit se pueden realizar 43 determinaciones (+ determinación de los 5 estándares). Cada kit contiene:

- 1 x Placa con 48 pocillos (6 tiras, cada una de 8 pocillos separables)
recubiertos con anticuerpos de captura
- 5 x Estándares ^{*}), 1,3 ml cada uno
0 ppb (estándar cero), 1,7 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 45 ppb
de aflatoxina en metanol/agua, listo para su uso
- 1 x Conjugado (3 ml).....tapón rojo
conjugado aflatoxina-peroxidasa
listo para su uso
- 1 x Anticuerpo anti-aflatoxina (3 ml)..... tapón negro
listo para su uso
- 1 x Solución de substrato/cromógeno (10 ml)..... tapón marrón
rojiza
- 1 x Solución stop (14 ml)..... tapón amarillo
contiene una solución de ácido sulfúrico 1 N

*) El factor de dilución 10 que se produce durante la preparación de las muestras ya fue tomado en cuenta en la indicación de las concentraciones. De esta forma se puede leer directamente la concentración de aflatoxina de las muestras a partir de la curva de los estándares.

5. Reactivos adicionales y accesorios requeridos

5.1. Equipamiento:

- espectrofotómetro para placas portapocillos (450 nm)
- probeta graduada de 100 ml de plástico o de vidrio
- para la preparación de las muestras: embudo de filtrado y un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml
- molino para desmenuzar las muestras
- opcional: agitador
- papel de filtro: Whatman No. 1 o equivalente
- micropipetas de 50 µl, 100 µl y 1000 µl

5.2. Reactivos:

- metanol
- solución de metanol al 70 %: mezclar 70 ml de metanol (100 %) con 30 ml de agua destilada
- agua destilada o deionizada

6. Precauciones

Los estándares contienen aflatoxina, debe tenerse un cuidado particular. Evitar contacto de los reactivos con la piel (usar guantes).

La descontaminación del material de vidrio y de las soluciones que contienen aflatoxina se realiza incubando éstas durante la noche en una solución de hipoclorito de sodio (10 % (v/v)), (regular el pH de la solución con HCl hasta pH = 7).

La solución stop contiene ácido sulfúrico 1 N (R36/38, S2-26).

7. Almacenaje de reactivos

Almacene los reactivos entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F), no los congele.

Guarde los pocillos no utilizados dentro del envase original, séllelo junto con el desecador provisto y continúe con el almacenamiento a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

La solución rojiza del substrato/cromógeno es sensible a la luz, evite por lo tanto su exposición directa.

Después del vencimiento de la fecha de caducidad (vea la etiqueta exterior del kit bajo "Exp.") no se asume más la garantía de calidad.

El test puede ser utilizado normalmente por lo menos hasta la fecha de caducidad (indicada sobre la caja del kit), si es almacenado correctamente.

No intercambie reactivos individuales entre ensayos de diferentes lotes.

8. Indicación de deterioro de los reactivos

- una coloración azulada del substrato/cromógeno rojizo anterior a su adición a los pocillos
- un valor de absorbancia menor a 0.6 unidades ($E_{450\text{ nm}} < 0.6$) para el estándar cero

9. Preparación de las muestras

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz. Una muestra representativa (de acuerdo con la técnica de muestreo aceptada) debe ser molida y mezclada.

- pese 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 25 ml de metanol al 70 % *)
- agite vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador)
- filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman n. 1
- diluya 1 ml del filtrado con 1 ml de agua destilada o deionizada
- utilice 50 µl del filtrado diluido por pocillo en el test

*) la cantidad de la muestra puede ser aumentada siempre y cuando el volumen de metanol/agua se aumente respetando el factor de dilución dado, por ejemplo: 10 g en 50 ml de metanol al 70 %

10. Implementación del ensayo

10.1. Preparación del ensayo

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de su uso.
2. La reacción comienza con la adición del anticuerpo específico. Sin embargo, no se deberían utilizar más de tres tiras por test si se trabaja con una pipeta monocal. Es posible analizar hasta 6 tiras al mismo tiempo utilizando una pipeta repetidora (multistep).
3. Devuelva todos los reactivos a una temperatura entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F) inmediatamente después de ser utilizados.

Los estándares de aflatoxina se encuentran listos para su uso. El factor de dilución 10 de las muestras ya fue considerado durante el etiquetado de los estándares, por lo tanto la concentración de aflatoxina en la muestra puede ser leída directamente de la curva de estándares.

10.2. Procedimiento del ensayo

Un lavado exhaustivo es muy importante. No permita que los pocillos se sequen completamente. Evite intervalos prolongados entre los pasos de trabajo. La reproducibilidad de los resultados depende en gran parte de un lavado uniforme de los pocillos. Siga cuidadosamente la secuencia de lavado descrita en el procedimiento.

Cubra los pocillos durante los períodos de incubación evitando así la exposición directa a la luz del sol.

1. Coloque suficientes pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
2. Agregue 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
3. Agregue 50 µl del conjugado aflatoxina-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Agregue 50 µl del anticuerpo anti-aflatoxina (tapón negro) a los pocillos correspondientes, mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
5. Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos (250 µl por pocillo) con agua destilada o deionizada utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más
6. Agregue 100 µl de substrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 5 minutos (+/- 0,5) en la oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
7. Agregue 100 µl de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

11. Resultados

Para la evaluación y análisis de los resultados se puede obtener de R-Biopharm ó de su distribuidor local un software especial el RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999) para los RIDASCREEN[®] inmunoensayos enzimático.

Para determinaciones individuales recomendamos hacer el análisis usando Logit/log y para determinaciones duplicadas ó múltiples usar Cubic Spline.

El trazado de la curva de estándares se puede ver en el Certificado de Aseguramiento de la Calidad incluido en el ensayo.

Anotación para el cálculo sin el software:

$$\frac{\text{absorbancia estándar (ó muestra)}}{\text{absorbancia estándar cero}} \times 100 = \% \text{ absorbancia}$$

De esta forma, el estándar cero es igual a 100 % y los demás valores de absorción se indican en porcentaje. Los valores calculados para los estándares son aplicados a un

sistema de coordenadas en papel semilogarítmico respecto a la concentración de aflatoxina [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

La concentración de aflatoxina en $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondiente a la absorción de cada muestra puede ser leída directamente de la curva de calibrado.

R-Biopharm no brinda garantía de ningún tipo, expresa o implícita, excepto que los materiales de los cuales sus productos son hechos corresponden a las normas estándares de calidad. Si algún material es defectuoso, R-Biopharm va a proceder al reemplazo del mismo. Quedan expresamente fuera de esta garantía la comerciabilidad de este producto, los daños directos o indirectos producidos por su uso indebido o por ser usados para propósitos no previstos en su diseño, los deterioros producidos por defectos de almacenaje, así como también los daños producidos como consecuencia de su utilización para otros fines.