

Kód 141 00    96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv.  Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

### OBECNÉ INFORMACE

Aflatoxiny jsou skupinou extrémně toxických sloučenin produkovaných plísněmi *Aspergillus flavus*, *A. parvicoccus* a *A. nomius*<sup>1</sup>. Tyto plísně se mohou vyskytovat na potravinách a krmivech získaných z tropických a subtropických oblastí. Kontaminace aflatoxinem se vyskytuje hlavně u obilovin, rýže, kukuřice, sóji, ořechů a arašídů<sup>2</sup>. Aflatoxiny způsobují rakovinu, která poškozuje zejména játra, ale také střeva, plíce a prsa. V rámci EU byly nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 stanoveny maximální limity (ML) pro řadu mykotoxinů v souladu s normami FAO / WHO Codex Alimentarius. ML pro aflatoxin B1 ve většině potravin pro přímou lidskou spotřebu se pohybuje od 2 do 12 µg / kg (ppb)<sup>3,4</sup>. Pro potraviny vyrobené na bázi obilovin, pro kojenecké výživy a potraviny pro malé děti a pro dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené speciálně pro kojence<sup>4</sup> byl ML pro aflatoxin B1 stanoven na 0,1 µg / kg.

### PRINCIP METODY

**Aflatoxin B1 ELISA** je konkurenční enzymový imunotest pro kvantitativní analýzu aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv.

Mikrotitrační jamky jsou potaženy králičím anti-myším IgG. Při první inkubaci aflatoxin B1 ve vzorku (nebo ve standardu) soutěží s enzymem značeným aflatoxinem B1, aby se navázal na specifické myší protilátky proti aflatoxinu B1. Komplex antigenních protilátek je zachycen imobilizovanou anti-myší protilátkou.

Při druhé inkubaci se do každé jamky přidá tetramethylbenzidin (TMB) jako enzymový substrát a po zbarvení se enzymatická reakce zastaví kyselinou sírovou. Vzniklý produkt se měří při 450 nm. Naměřená absorbance je nepřímo úměrná koncentraci aflatoxinu B1 přítomného ve vzorku<sup>5</sup>.

### OBSAH A SLOŽENÍ

**Promývací pufr.** 30 ml. Koncentrovaný (20x) pufr.

**Ředící pufr.** 20 ml. Koncentrovaný (4x) pufr.

**Konjugát.** Lyofilizovaná, modrý uzávěr. Aflatoxin B1 značený peroxidázou.

**Roztok substrátu.** 12 ml. 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).

**Zastavovací roztok.** 15 ml. Kyselina sírová 0,5 mol / L.

**Protilátka.** Lyofilizovaná, žlutý uzávěr. Myší anti-aflatoxin B1 IgG.

**Mikrotitrační destička.** 12 proužků po 8 jamkách, každá je potažena králičími anti-myšími IgG.

**Nulový standard.** 2 ml.

**Standardy.** 6 x 1,0 ml. Koncentrace: 0,0157, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25 a 0,5 ng / ml.

### SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte při teplotě 2-8 ° C. Každá součást kitu je stabilní až do data expirace uvedeného na štítku. Kapalné složky jsou stabilní po otevření až do data expirace uvedeného na etiketě, pokud jsou skladovány při doporučené teplotě, jsou dobře uzavřené a bylo zabráněno kontaminaci během jejich používání.

Indikace poškození:

- Absorbance **nulového standardu** ( $A_B$ ) je nižší než 0,8.
- Reagencie: přítomnost částic, zákal.
- **Mikrotitrační destičky:** roztržení plastového obalu, makroskopické vady, např. škrábnutí na jamce.

Kód 141 00    96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv.  Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

### PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ (NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY)

- Metanol.
- Zvlhčovací komůrka.
- Vícestupňový aspirátor nebo automatická promývačka mikrotitračních destiček.
- Čtečka mikrotitračních destiček nebo fotometr s mikrokyvetou a filtrem 450 ± 10 nm.
- Tyto materiály potřebné pro vyšetření vzorků nejsou součástí dodávky.

### PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

**Promývací pufr.** Zředěte koncentrovaný promývací pufr s destilovanou vodou v poměru 1/20. Důkladně promíchejte. Stabilní při teplotě 2-8 ° C do data expirace uvedeného na štítku soupravy.

**Zředěný ředící pufr.** Vytemperujte koncentrovaný **ředící pufr** na pokojovou teplotu. Důkladně promíchejte, aby se rozpustila případná sraženina. Zřed'te destilovanou vodou v poměru 1/4. Důkladně promíchejte. Stabilní při 2-8 ° C do data expirace uvedeného štítků kitu.

**Ředící roztok na vzorky .** Přidejte 2 ml 100% methanolu do 8 ml zředěného ředícího pufru. Stabilní 1 den při 2-8 ° C.

**Konjugát.** Rekonstituujte lahvičku lyofilizovaného konjugátu se 4 ml ředěného ředícího pufru a důkladně promíchejte. Stabilní 7 dní při 2-8 ° C nebo 1 rok při -20 ° C.

**Protilátka.** Rekonstituujte lahvičku lyofilizované protilátky 4 ml ředěného ředícího pufru, důkladně promíchejte a uchovávejte ve tmě až do doby použití. Stabilní 7 dní při 2-8 ° C, nebo 1 rok při -20 ° C.

**Všechny ostatní komponenty** jsou připraveny k použití.

Roztok substrátu má tendenci se v chladničce vysrážet. Promíchejte, aby se sraženina před použitím rozpustila.

### OPATŘENÍ

- Aflatoxiny jsou karcinogenní sloučeniny. Zabraňte kontaktu s ústy a pokožkou. Ujistěte se , že aflatoxiny nejsou inhalovány. Jakýkoli materiál kontaminovaný aflatoxiny by měl být zničen, nebo dekontaminován přídatkem roztoku chlornanu sodného (10% obj.).

- **Zastavovací roztok** obsahuje kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu činidla s pokožkou.

- Vyvarujte se kontaktu všech biologických materiálů s kůží a sliznicemi.

- Nepipetujte ústy.

- Nejezte, nepijte, nekuřte, neuchovávejte ani nepřipravujte potraviny, nebo nenanášejte kosmetiku ve vymezeném pracovním prostředí.

- **TMB** je toxický při vdechování, při styku s pokožkou a při požití; při manipulaci se **substrátem** dbejte opatrnosti.

- Jednotlivé komponenty nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti a ani je nezeměňujte s komponenty z jiných šarží.

### PŘÍPRAVA VZORKU

Homogenní vzorek musí být získán z reprezentativní části směsi.

Kód 141 00    96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv.  Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

### **Krmivo a potraviny**

1. Vzorek (50-100 g) rozemelte a rozmělněte na jemnou homogenní směs.
2. Ke 3 g rozemletého vzorku přidejte 9 mL 80% methanolu. Důkladně protřepávejte po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
3. Vzorek centrifugujte, 10 minut, 2000 x g, nebo filtrujte.
4. Zředte 50 µL supernatantu nebo filtrátu 150 µL **ředícího pufru**.
5. Napipetujte 50 µL zředěného supernatantu do příslušných jamek na ELISA destičkách.

### **Alternativní metoda pro krmivo a potraviny**

1. Vzorek (50-100 g) se rozemelte a rozmělněte na jemnou homogenní směs.
2. Přidejte 10 mL destilované vody na 1 g homogenizovaného mletého vzorku a protřepejte na vortexu.
3. Do směsi přidejte 10 mL dichlormetanu. Důkladně promíchávejte hřídelovým míchadlem po dobu 5-10 minut (Rotor).
4. Směs vzorku centrifugujte 10 minut, 2000 x g, při pokojové teplotě. Filtrujte spodní vrstvu pomocí skládaného filtru (Scheicher & Schuell ref.no.10 311 642).
5. Odpařte 1 mL filtrátu pod mírným proudem dusíku při 50 ° C. Zbytek získaný odpařením rozpustíte v 1 mL **ředícího roztoku na vzorky**.
6. Přidejte 1 mL n-hexanu a 1 minutu protřepávejte na vortexu.
7. Centrifugujte 10 minut, 2000 x g, při pokojové teplotě. Odstraňte horní vrstvu (n-hexan).
8. Pokud je spodní vrstva zakalená, opakujte krok odmaštění, dokud nebude čirá. Do příslušných jamek ELISA destiček pipetujte 50 µL spodní vrstvy.

### **Postup extrakce mastných vzorků (olej, semena, máslo atd.)**

1. Do skleněné zkumavky navažte 2 g jemně rozdrčeného a následně zhomogenizovaného vzorku.
2. Přidejte 8 mL dichlormetanu a směs promíchávejte hřídelovým míchadlem po dobu 30 minut.
3. Extrakt filtrujte filtrem  $\varnothing$  90 mm / Schleicher & Schuell (číslo výrobku 10311642).
4. Vezměte 4 mL filtrátu a odpařte do sucha při 50 °C pod mírným proudem dusíku. Zbytek získaný odpařením rozpustíte v 1 mL **ředícího roztoku na vzorek**.
5. Přidejte 1 mL n-hexanu (pro odmaštění) a promíchejte na vortexu.
6. Centrifugujte 5 minut, 2000 x g, při pokojové teplotě. Pipetujte spodní vrstvu do čisté zkumavky.
7. Přidejte 1 mL n-hexanu a promíchejte na vortexu.
8. Centrifugujte 5 minut, 2000 x g, při pokojové teplotě. Odstraňte horní vrstvu (n-hexan).
9. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky ELISA napipetujte 50 µL spodní vrstvy.

Kód 141 00    96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv.  Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

### Alternativní metoda: Jedlé oleje

1. K 1 g oleje přidejte 3 mL 80% methanolu a 2 mL n-hexanu. Protřepávejte na vortexu a promíchejte hřidelovým míchadlem po dobu 10 minut.
2. Centrifugujte 5 minut, 2000 x g, a oddělte horní vrstvu (n-hexan).
3. Smíchejte 100 µL extraktu a 400 µL **ředícího roztoku na vzorek** a protřepte na vortexu.
4. Napipetujte 50 µL roztoku (bod 3) do příslušných jamek mikrotitrační destičky ELISA.

### POSTUP

Vytemperujte všechna činidla a mikrotitrační destičky na pokojovou teplotu.

1. Otevřete obal s mikrotitračními destičkami a vyjměte potřebné množství jamek (Poznámka 1).
2. Napipetujte 100 µL **nulového standardu** v duplikátu (jamky H1, H2).
3. Napipetujte 50 µL **nulového standardu** v duplikátu (jamky A1, A2).
4. Napipetujte v duplikátu 50 µL každého **standardního roztoku aflatoxinu B1** (jamky B1, B2 až G1, G2, tj. 0,0157, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25 a 0,5 ng / mL).
5. Napipetujte v duplikátu 50 µL roztoku každého **vzorku** do zbývajících jamek mikrotitrační destičky.
6. Přidejte 25 µL **konjugátu** do všech jamek kromě jamek H1 a H2.
7. Přidejte 25 µL **roztoku protilátek** do všech jamek kromě jamek H1 a H2. Destičku několik sekund protřepávejte.
8. Inkubujte 60 minut při teplotě 37 ° C (poznámka 2).
9. Odsajte obsahy jamek a jamky promyjte **promývacím pufrem** – 3 x 300 µL. (poznámka 3).
10. Do všech jamek pipetujte 100 µL **substrátu**.
11. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (20-25 ° C).
12. Do všech jamek pipetujte 100 µL **zastavovacího roztoku** a nechte stát 5 minut při pokojové teplotě (Poznámka 4).
13. Odečtěte absorbanci obsahu každé jamky při 450 nm (poznámka 5). Příklad vynulujte pomocí jamek H1 a H2. Barva je stabilní po dobu nejméně 30 minut.

### VÝPOČTY

Hodnoty absorbance (střední hodnoty duplikátů) šesti standardů a vzorků ( $A_s$ ) vydělte průměrnou hodnotou absorbance nulového standardu ( $A_B$ , jamky A1 a A2) a vynásobte hodnotou 100.

$$\frac{A_s}{A_B} \times 100 = \% B_{max}$$

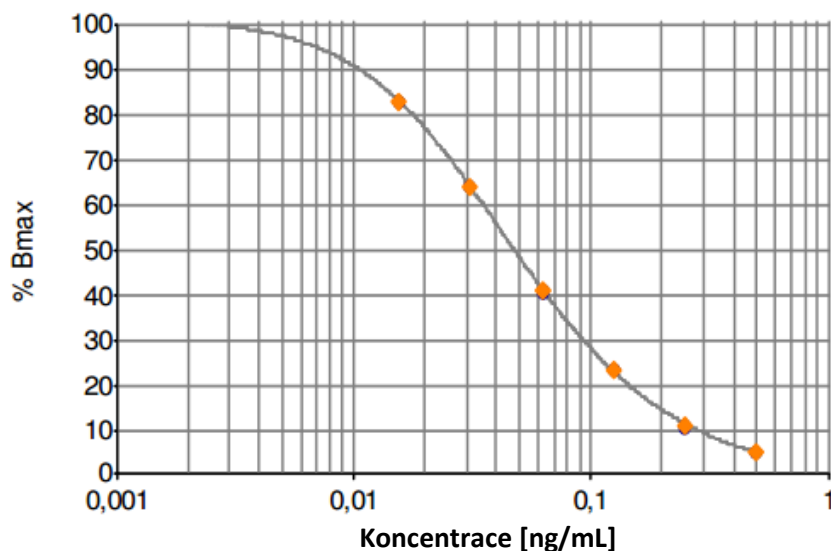
Vypočítejte hodnoty **% B<sub>max</sub>** pro každý standard na ose Y oproti koncentraci aflatoxinu B1 na ose X (logaritmičká stupnice). Koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích se vypočítá interpolací hodnot **% B<sub>max</sub>** na kalibrační křivce:

Kód 141 00    96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

Příklad kalibrační křivky :



Koncentrace aflatoxinu B1 získaná z kalibrační křivky musí být vynásobena faktorem, který závisí na použitém postupu zpracování vzorku:

$$\text{ng / mL} \times \text{Faktor} = \text{ng / g} (\mu\text{g / kg}) \text{ vzorku}$$

Postup	Faktor
Krmivo a potraviny	x 16
Alternativní metoda pro krmivo a potraviny	x 10
Postup extrakce mastných vzorků	x 1
Alternativní metoda: Jedlé oleje	x 20

### METROLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY

- Detekční limit

Vzorek	$\mu\text{g / kg}$
Cereálie	0,5
Rýže	0,4
Vejce	0,2

Vzorek	$\mu\text{g / kg}$
Med	0,75
Ovocné pyré	0,2
Jedlé oleje	0,6
Krmivo	1,0

- Limit linearity: Pro hodnoty vyšší než 0,5 ng / mL ředění vzorku 1/10 pomocí ředícího pufru pro vzorek a opakovaná měření.

- Specificita: Zkřížená reaktivita vůči aflatoxinu B1 se vyskytuje u 20% aflatoxinu B2, u 17% aflatoxinu G1 a u 4% aflatoxinu G2.

Kód 141 00 96 testů
Reagencie pro stanovení koncentrace aflatoxinu B1 ve vzorcích potravin a krmiv. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v laboratořích.



## AFLATOXIN B1 KOMPETITIVNÍ ELISA

### POZNÁMKY

1. Nepoužité jamky skladujte v uzavřeném plastovém obalu spolu s exikátorem.
2. Všechny inkubace provádějte ve zvlhčovací komůrce, aby se mikrotitrační destičky chránily před odpařováním a před světlem.
3. Promývání může být provedeno manuálně, nebo pomocí automatické promývačky. Promývací pufr by měl být zcela z jamek odstraněn. Dbejte na to, aby nedošlo k poškrábání povrchu jamek v průběhu postupu.
4. Zastavovací roztok zastaví enzymovou reakci a musí být pipetován do jamek přibližně ve stejné rychlosti, jako substrát v kroku 10.
5. Některé čtečky mikrotitračních destiček umožňují bichromatický odečet. V tomto případě použijte sekundární vlnovou délku v rozmezí 600-700 nm.

### BIBLIOGRAFIE

1. J.E. Smith, C.W. Lewis and J.G. Anderson. Mycotoxins in human nutrition and health. EU Directorate-General XII, Science, Research and Development, 1990.
2. J.L. Richard, G.A. Bennett, P.F. Ross and P.E. Nelson. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. J. Anim. Sci. 71, 2563-2574, 1993.
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. European Union. L364 (2006) 5-24.
4. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Off. J. European Union. L50 (2010) 8-12.
5. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993. J.E. Smith, C.W. Lewis and J.G. Anderson.

### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 6.2.2019.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es). Český návod je k dispozici na: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)

#### Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 155 21 Praha5,

tel.: +420 257 220 760

SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,

tel.: + 421 264 774 591

#### V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK,

tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02

SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166