

Τοξικολογία Τροφίμων

Έλεγχος υπολειμμάτων με τη μέθοδο ELISA

Στόχοι ενότητας

- **Εξοικείωση με το kit** προσδιορισμού αφλατοξίνης M1 σε δείγμα γάλακτος
- Κατανόηση των **κρίσιμων σημείων** εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου ELISA
- Αναγνώριση **παραμέτρων** που μπορεί να **επηρεάσουν** τα αναλυτικά αποτελέσματα

Προστασία κατά το χειρισμό του kit

- Τα standard διαλύματα περιέχουν **αφλατοξίνη M1**.
- Απαγορεύεται η επαφή με το **δέρμα**.
- Απαραίτητη η χρήση **προστατευτικών γαντιών**.



Συνθήκες διατήρησης - Χειρισμός

Η αποθήκευση του kit γίνεται στους **2-8 °C**.

Οι αφλατοξίνες είναι **φωτοευαίσθητες** και για αυτό να αποφεύγεται η έκθεση στο φως.

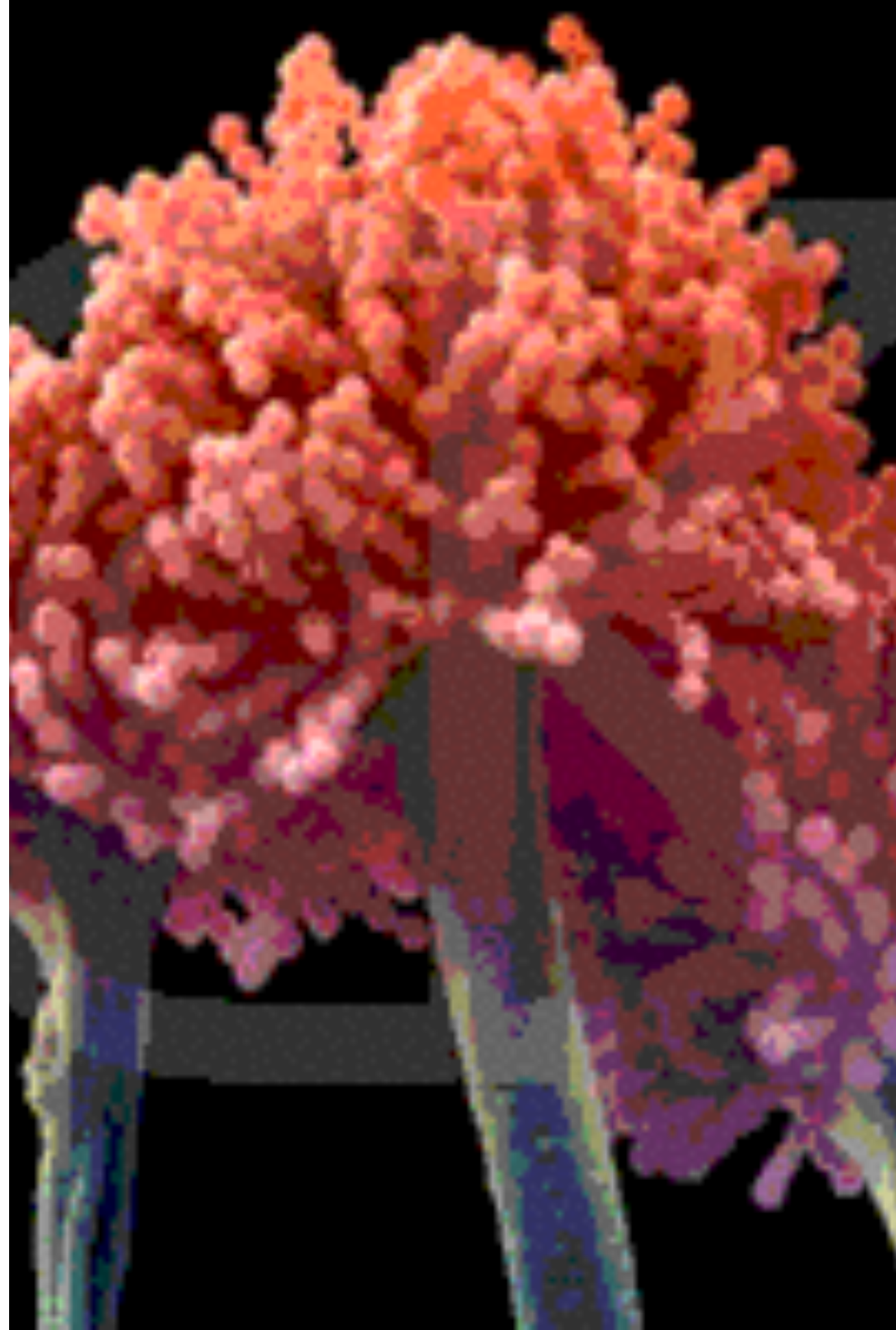
Ομοίως και για το διάλυμα **χρωμογόνου-υποστρώματος**

Αποτελέσματα μετά την **ημερομηνία λήξης** του kit δεν θεωρούνται αξιόπιστα

Να μην αναμιγνύονται αντιδραστήρια kit με διαφορετικούς **αριθμούς παρτίδας**



Περιεχόμενα του Kit



Περιεχόμενα

- 12 strip των 8 θέσεων-κυψελίδες καλυμμένα με αντισώματα
- 6 standard διαλύματα 1,3ml το καθένα (0,5,10,20,40,80 ppt)
- Ένα φιαλίδιο με κόκκινο καπάκι που περιέχει το ένζυμο σύζευξης(1,3 ml)
- Ένα φιαλίδιο με καφέ καπάκι που περιέχει το υπόστρωμα – χρωμογόνο (10ml)
- Ένα φιαλίδιο με κίτρινο καπάκι που περιέχει το διάλυμα stop(14ml)

Περιεχόμενα

- Μια φιάλη που περιέχει το buffer 1 διάλυμα 20ml
- Ένα φιαλίδιο με λευκό καπάκι που περιέχει το διάλυμα buffer 2
- Διάλυμα washing buffer

29.05.09

Inhalt / Content

Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten
Microtiter plate with 96 wells

Standard 1	Standard 4
Standard 2	Standard 5
Standard 3	Standard 6

Waschpuffer (Salz) / Washing Buffer (Salt)

Konjugat / Conjugate 1.3 ml

Substrat / Chromogen

Substrate / Chromogen 10 ml

Stopp-Reagenz / Stop Solution 14 ml

Puffer 1 / Buffer 1 20 ml

Puffer 2 / Buffer 2 12 ml

RIDASCREEN® is a trademark
of R-Biopharm AG, D-Darmstadt
R11110101 Art. No.: R 111

r-biopharm

R-Biopharm AG Landwehrstr. 54 D-64293 Darmstadt Tel.: +49 (0)6151-81020

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15

Enzymimmunoassay für die quantitative
Bestimmung von Aflatoxin M₁ (96 Kavitäten)

Enzyme immunoassay for quantitative
determination of aflatoxin M₁ (96 wells)



Reizend
Irritant
Enthält / contains 1 N H₂SO₄



Bitte beachten / Attention

Nur zum in-vitro-Gebrauch

Only for in vitro use

Nicht einfrieren

Do not freeze

Lagertemperatur / Storage temperature 2-8°C

R 36/38, S 2-26

Reizt Augen und Haut. Bei Berührung in die Hände
von Kindern gelangen. Bei Berührung mit den
Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt
konsultieren.

Irritating to eyes and skin. Keep out of reach
of children. In case of contact with eyes, rinse
immediately with plenty of water and seek
medical advice.

Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
Nur für den Gebrauch in Laboratorien bestimmt.
Caution – substance not fully tested. Only
for use in laboratories.

Exp. 2010-05

Lot 03119

RIDASCREEN[®] Aflatoxin M₁ 30/15

Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten

12 Streifen á 8 Kavitäten

Microtiter plate with 96 wells

12 strips á 8 wells

Nur zum In-vitro-Gebrauch / Only for in vitro use
Lagertemperatur / Storage temperature 2 - 8 °C

Exp.: 2010-05

Lot: 05508



R11110201

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15

Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten
12 Streifen á 8 Kavitäten

Microtiter plate with 96 wells
12 strips á 8 wells

Nur zum In-vitro-Gebrauch / Only for in vitro use
Lagertemperatur / Storage temperature 2 - 8 °C

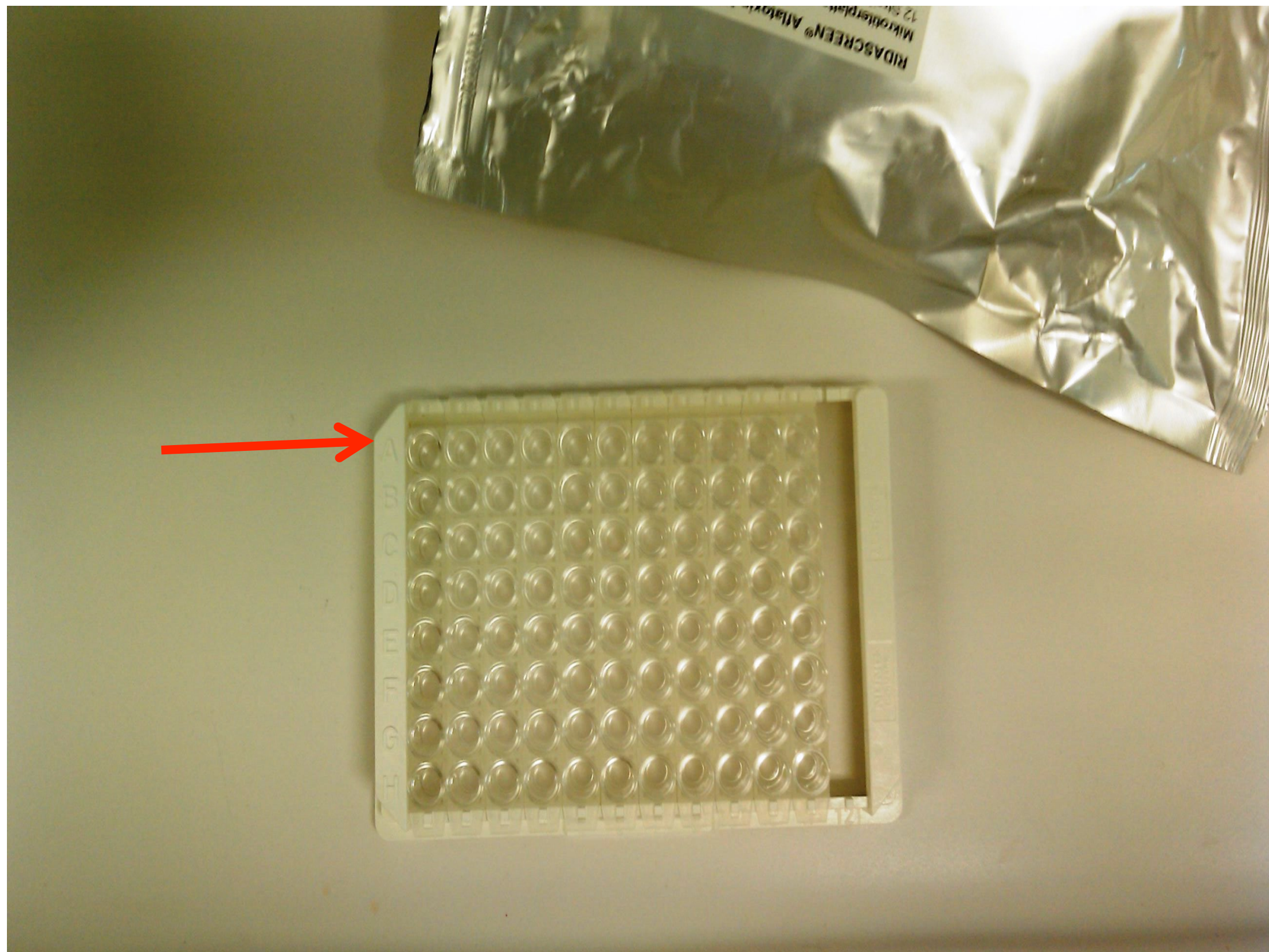
Exp.: 2010-05

Lot: 05508



R11110201







Washing buffer

Buffer 2

Buffer 1

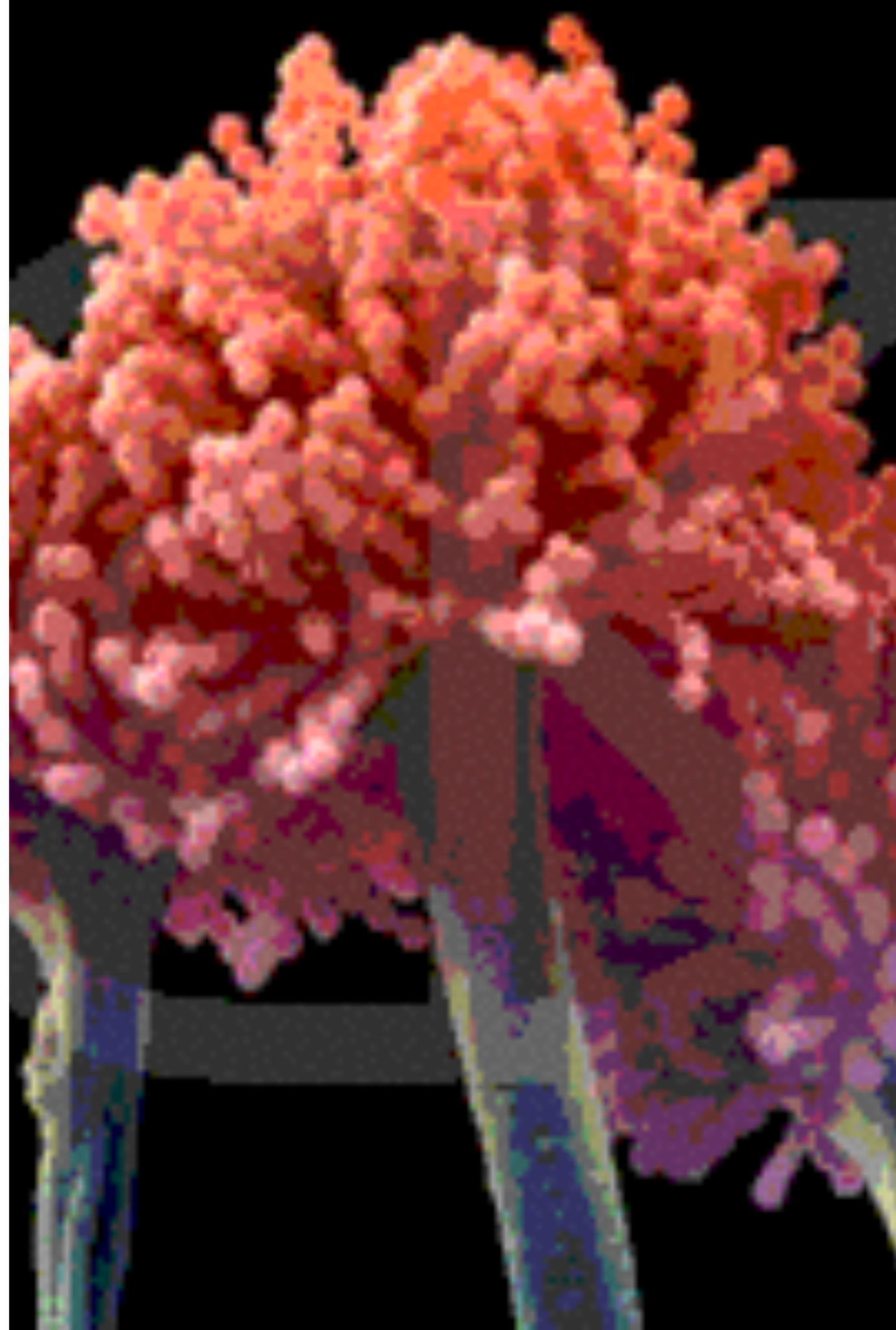
Ένζυμο
σύζευξης

Standard διαλύματα

Χρωμογόνο

Stop solution

Εφαρμογή μεθόδου



Αιτίες απόρριψης kit

- Εμφάνιση **μπλέ απόχρωσης** στο υγρό του φιαλιδίου με το ένζυμο σύζευξης (κόκκινο καπάκι)
- Τιμή **απορρόφησης μικρότερη από 0.6** για το zero standard

Προετοιμασία εξοπλισμού – αντιδραστηρίων

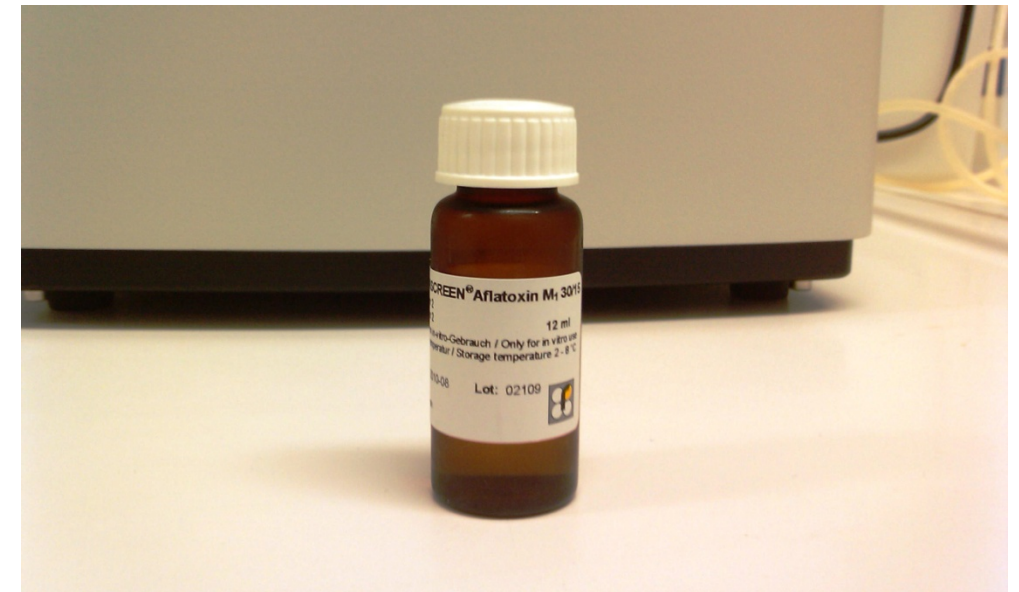
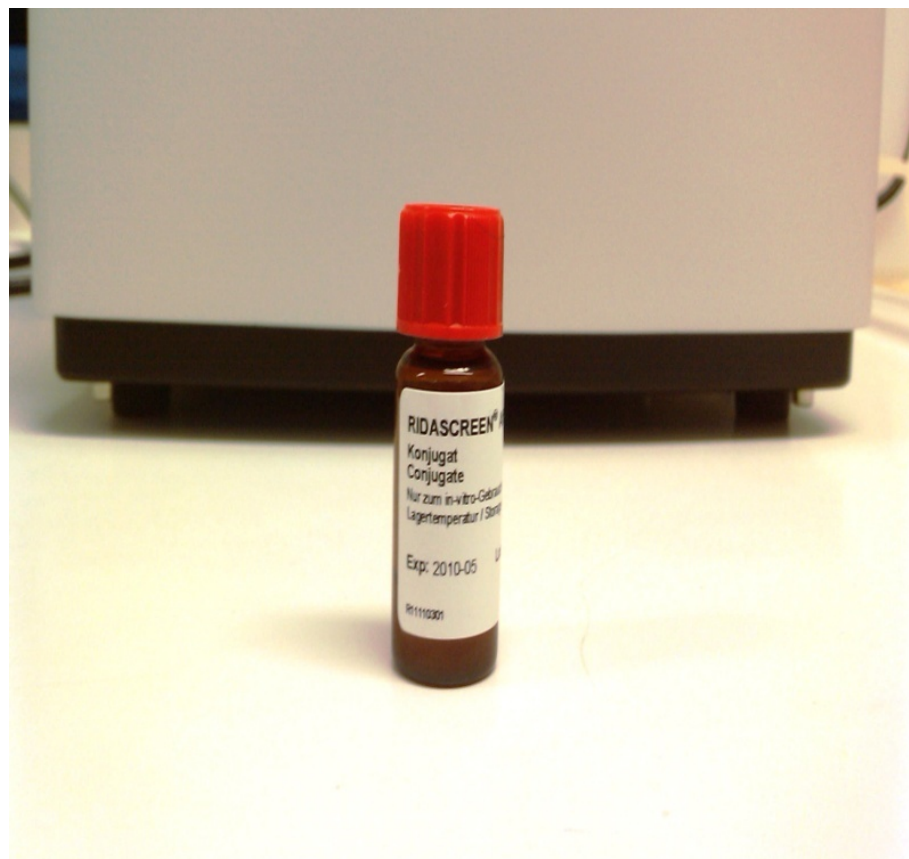
- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε **θερμοκρασία δωματίου**
- Η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στους **20-25 °C**
- Η φυγόκεντρος πρέπει να έρθει σε θερμοκρασία **10 °C**

Washing Buffer

- Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος
- Από το έτοιμο διάλυμα (διάρκεια ζωής 8-12 εβδομάδες) διαλύουμε ένα μέρος με 9 μέρη αποσταγμένο νερό.
- Για τις 8 θέσεις ενός strip χρειαζόμαστε 12 ml
- $250\mu\text{l} * 8 = 2000 \mu\text{l}$, τρείς πλύσεις συνολικά $2000\mu\text{l} * 3 = 6000\mu\text{l}$, + 6000μl για το τελευταίο πλύσιμο, Σύνολο 12000μl ή 12 ml

Διάλυμα ενζύμου σύζευξης

Για κάθε ένα strip 8 θέσεων αναμειγνύουμε (αφού αναταράξουμε προσεκτικά) **100 μl ενζύμου σύζευξης** (κόκκινο πώμα) με **1ml από το buffer 2** (λευκό πώμα).



Προετοιμασία δειγμάτων γάλακτος

- Φτιάχνουμε τη **λίστα** των κωδικών για τα δείγματα.
- Συμπληρώνουμε το **έντυπο αντιστοιχίας** δειγμάτων σε κάθε strip με βάση την αρίθμηση που υπάρχει στην πλακέτα
- **Ανακατεύουμε** το κάθε δείγμα πριν τη δειγματοληψία προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή των συστατικών του



Σημεία προσοχής

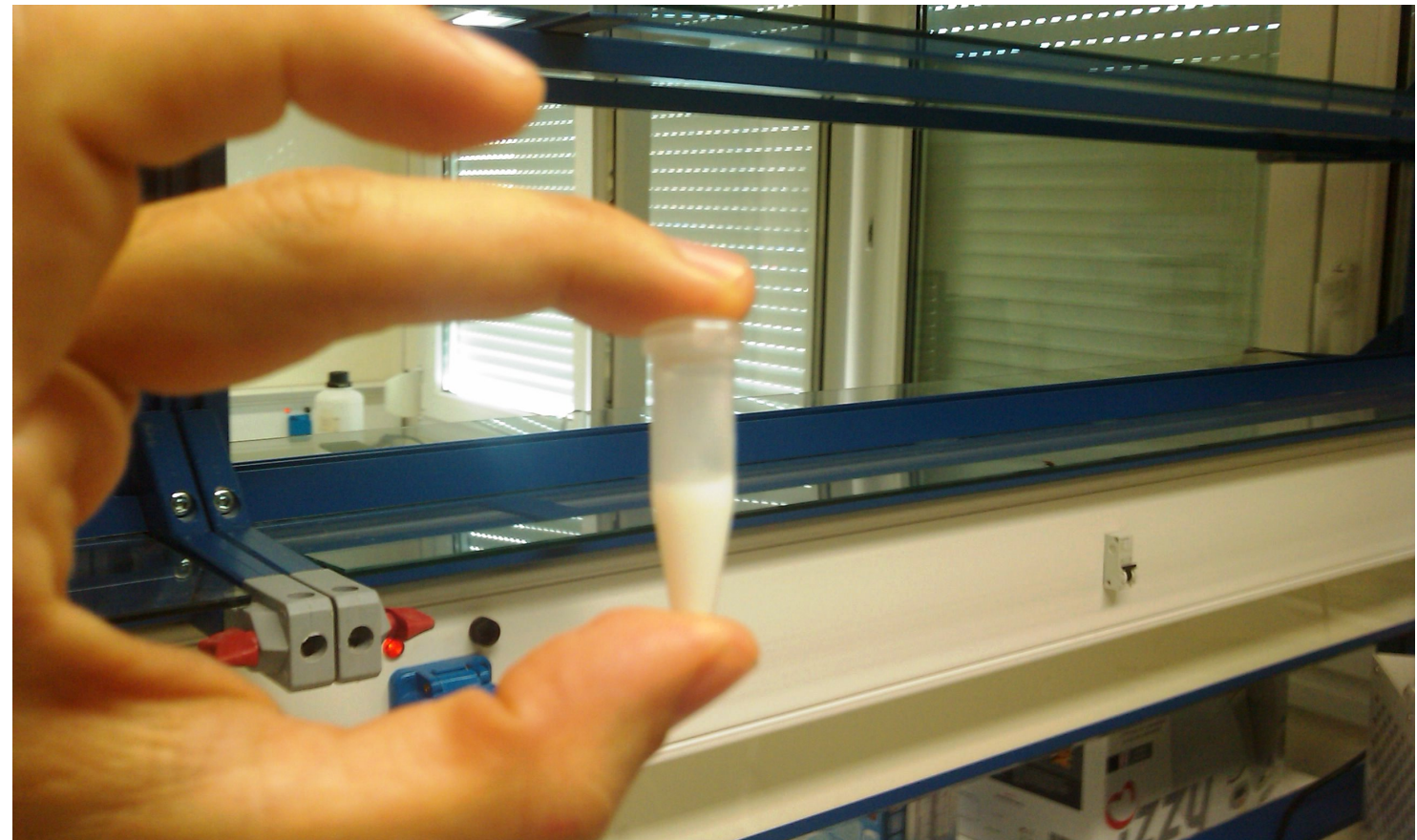
- Για τη λήψη κάθε δείγματος γίνεται χρήση **ξεχωριστής πιπέτας**.
- Προσοχή ο αριθμός των φιαλιδίων προς φυγοκέντρωση θα είναι **πάντα ζυγός**. Για τον έλεγχο της σωστής τοποθέτησης μετράμε τις κενές τρύπες μεταξύ των δειγμάτων στη κεφαλή της φυγόκεντρου. Θα πρέπει να είναι ίδιες και από τις δύο πλευρές



Εφαρμογή διαδικασίας

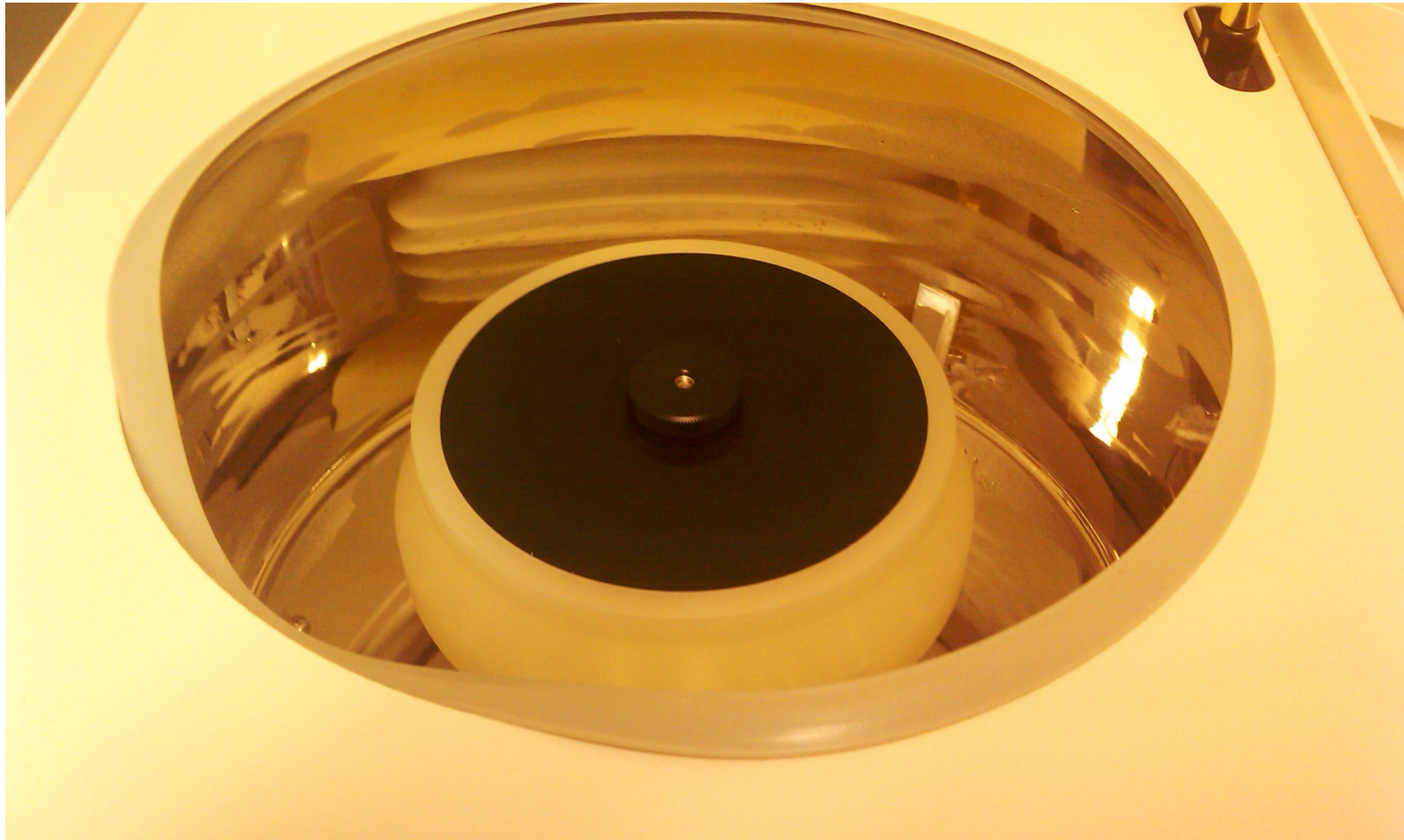
Σε κατάλληλο φιαλίδιο τοποθετούμε το γάλα προκειμένου να το φυγοκεντρίσουμε.

Σε κάθε φιαλίδιο να υπάρχει ο κωδικός του δείγματος



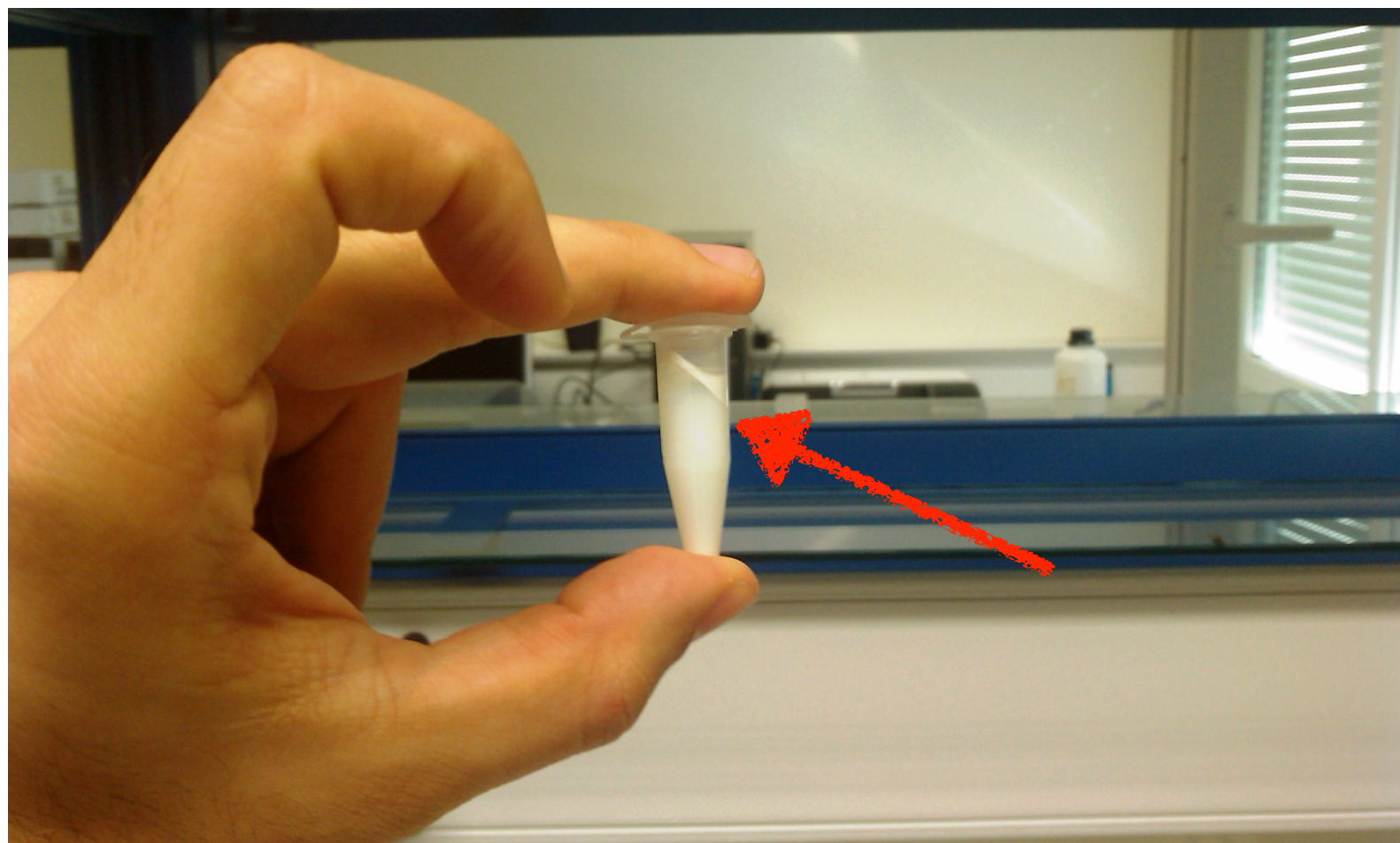
Εφαρμογή διαδικασίας - Φυγοκέντρωση

- Αφού τοποθετηθούν σωστά τα δείγματα στη φυγόκεντρο φυγοκεντρούμε το γάλα στις ακόλουθες συνθήκες
- 10min//3500 g/ 10 °C



Εφαρμογή διαδικασίας - Φυγοκέντρωση

- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρούμε το ανώτερο στρώμα της κρέμας (συμπαγές τμήμα) με τη χρήση πιπέτας.
- Στη συνέχεια από τη τρύπα που έχει γίνει προσεκτικά με μια βελόνα **χωρίς να γδάρουμε τα τοιχώματα** παίρνουμε το υγρό (αποβουτυρωμένο γάλα) και το τοποθετούμε σε **ξεχωριστό φιαλίδιο** (με γραμμένο τον κωδικό του δείγματος).



Εφαρμογή διαδικασίας - Προετοιμασία πλακέτας

- Τοποθετούμε στην πλακέτα τον αριθμό των strip που θέλουμε.
- Σε κάθε περίπτωση υπολογίζουμε ότι οι πρώτες 6 θέσεις **ΜΟΝΟ στο πρώτο strip** καταλαμβάνονται από τα standard διαλύματα





Εφαρμογή διαδικασίας - Προετοιμασία πλακέτας

- Βάζουμε στις πρώτες θέσεις του πρώτου strip από το 1 μέχρι το 6 τα standard διαλύματα με αύξουσα συγκέντρωση
- 100 μ l σε κάθε θέση

Εφαρμογή διαδικασίας - Προετοιμασία πλακέτας

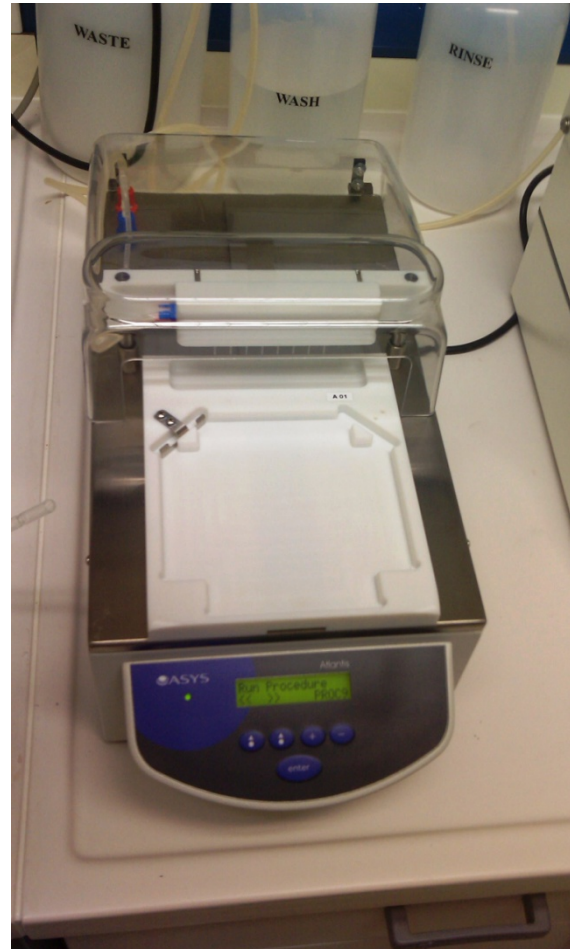
- Από το νέο φιαλίδιο με τη χρήση μικροπιπέτας παίρνουμε 100 μ l και τα τοποθετούμε στην αντίστοιχη θέση στο strip. (οι θέσεις έχουν από πριν συμπληρωθεί στο έντυπο ώστε να γνωρίζουμε που βρίσκεται το κάθε δείγμα)

Εφαρμογή διαδικασίας - Προετοιμασία πλακέτας

- Αφού έχουμε τοποθετήσει όλα τα δείγματα αναμιγνύουμε απαλά με προσοχή και τοποθετούμε την πλακέτα με τα strip στο σκοτάδι για 30 λεπτά.

Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

- Βγάζουμε την πλακέτα από το σκοτάδι και την τοποθετούμε στο ειδικό μηχάνημα για πλύσεις και αναρρόφηση.
- Επιλέγουμε το πρόγραμμα 9.
- Κάνουμε την πρώτη αναρρόφηση βγάζουμε την πλακέτα και την χτυπάμε ελαφρά σε απορροφητικό χαρτί προκειμένου να φύγει όλη η υγρασία.



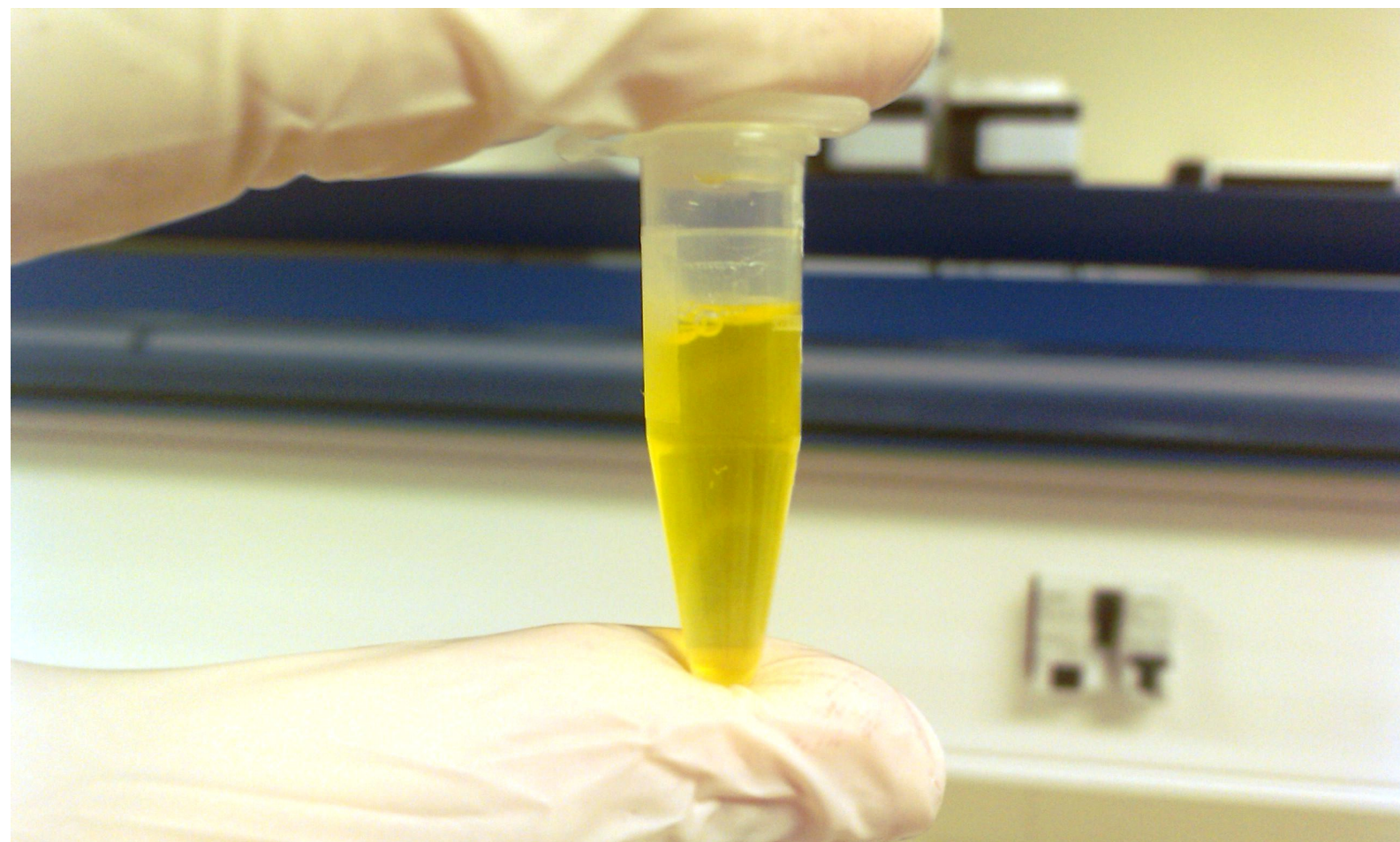
Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

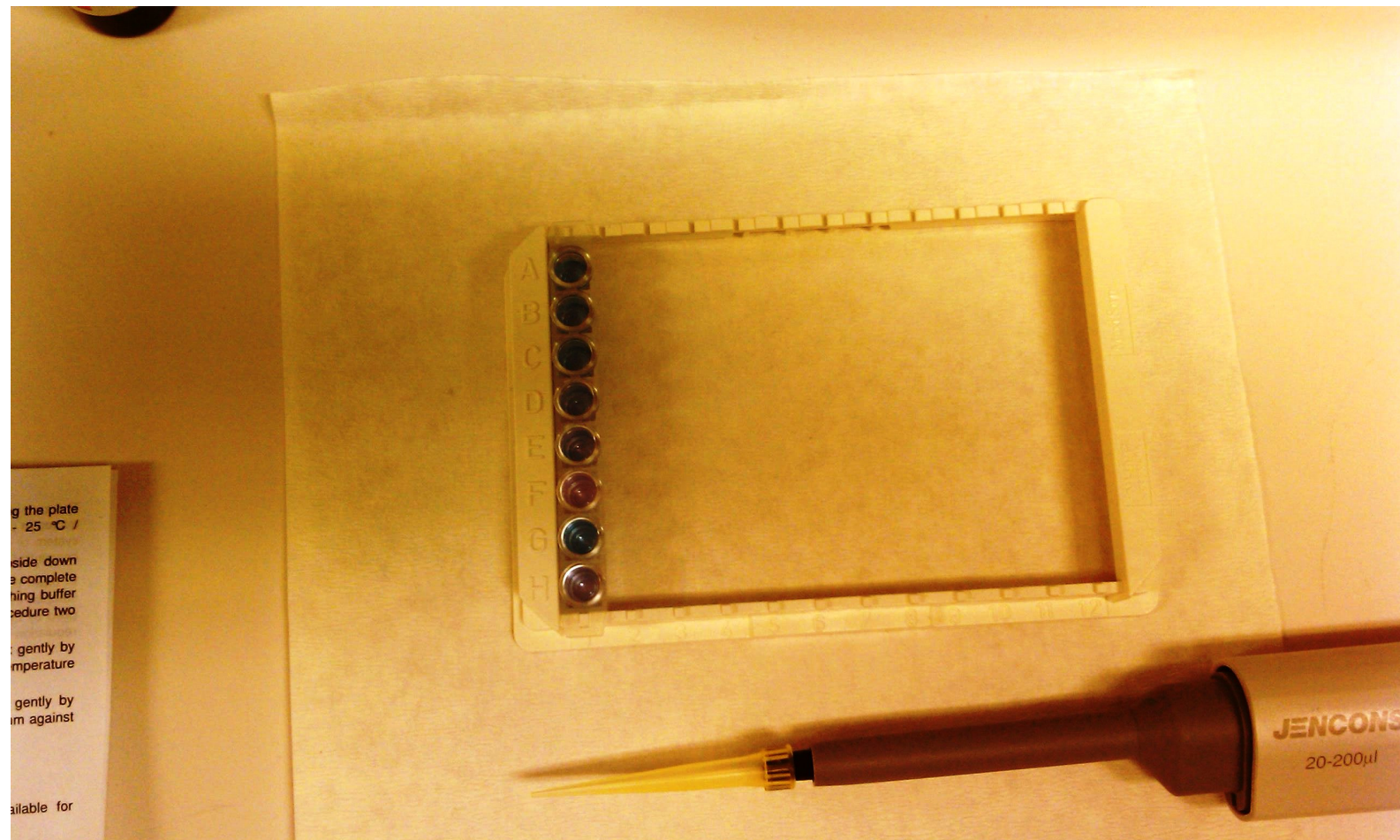
- Τοποθετούμε σε κάθε κυψελίδα 250μl από το **washing buffer solution**.
- Βάζουμε ξανά την πλακέτα στο μηχάνημα πλύσης-αναρρόφησης και επιλέγουμε ξανά το πρόγραμμα 9.
- Μετά το άδειασμα του υγρού χτυπάμε ξανά απαλά τρεις φορές την πλακέτα σε απορροφητικό χαρτί.
- Επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμη τη διαδικασία του πλυσίματος



Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

- Τοποθετούμε 100 μl από το μείγμα **ενζύμου σύζευξης** και **buffer 2** σε κάθε κυψελίδα και μετά ανακατεύουμε απαλά.
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για 15 λεπτά





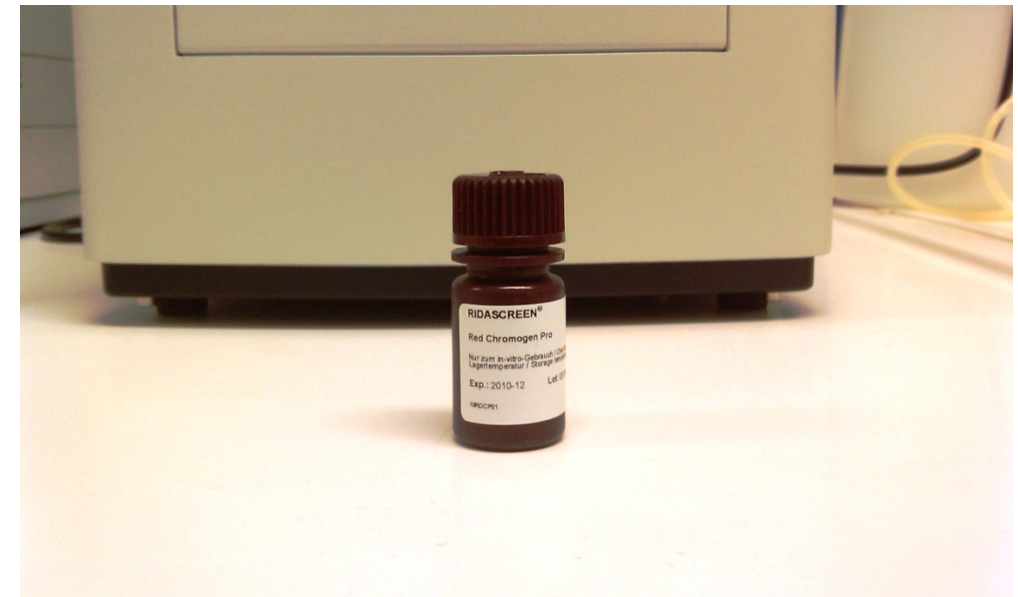
Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

- Ακολουθούν τρία πλυσίματα με το washing buffer solution με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως.



Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

- Τοποθετούμε 100μl από το χρωμογόνο **(καφέ μπουκαλάκι)** σε κάθε κυψελίδα.
- Αναμιγνύουμε απαλά.
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για άλλα 15 λεπτά.



Εφαρμογή διαδικασίας - Προσθήκη αντιδραστηρίων

- Τοποθετούμε **100μl από το stop solution (κίτρινο μπουκάλι)** σε κάθε κυψελίδα στο strip και ακολουθεί η μέτρηση.
- **ΠΡΟΣΟΧΗ** η μέτρηση πρέπει να γίνει άμεσα. Μετά από 15 λεπτά τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται αξιόπιστα.



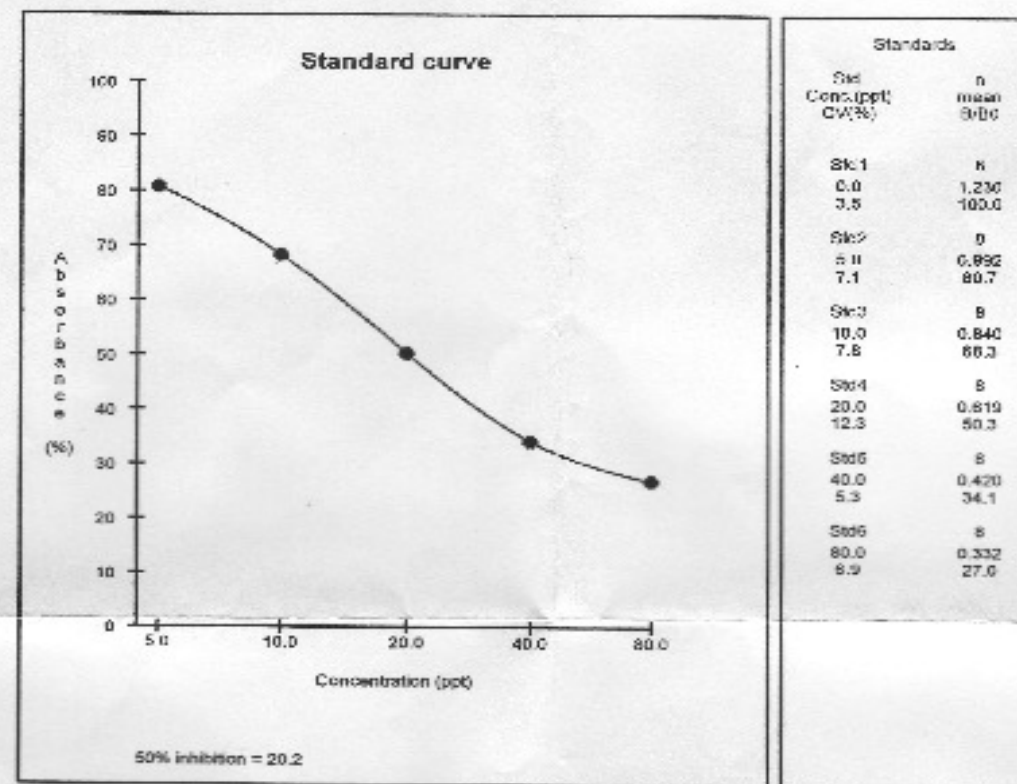


QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 30/15

Art. No.: R1111 Lot: 03119 Expiry: 2010-05

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications



	Lot No.	Expiry
Microwell plate	05508	2010-05
Standards	02109	2010-08
Conjugate	02109	2010-05
Buffer1	02109	2010-08
Buffer2	02109	2010-08
Red Chromogen Pro	05288	2010-12
Stop solution	03049	2013-12
Washing buffer salt	088K8209	2013-10

Please note:

The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

sign.: Edda Rohm
Quality Assurance Representative

Date: 2009-03-11

Remark:

This document has been created electronically and is therefore valid without a signature.

The R-Biopharm group is DIN EN ISO 9001 certified.

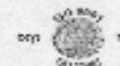


Plate ID: 191109.2

Expert Plus

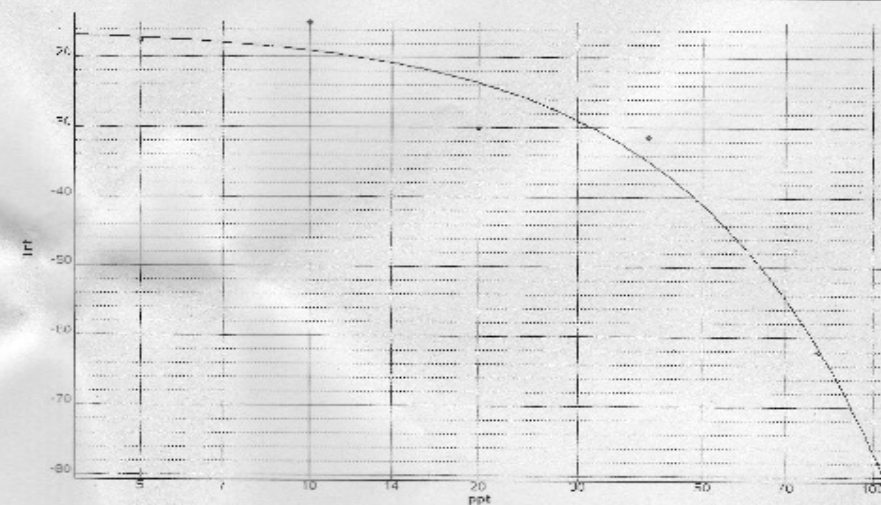
Results

Method : APL M1
Measurement Date : 19.11.09 11:00
Measurement Filtered : 100/620 nm
Lab. No. : Lab. 0001

Operator:

Legend: Target / Absorbance / Transmittance / Absorbance Index
Transmittance Range: 0.000 ppt to 100.00 ppt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
A	0	-81.9	-84.8	-107	-100	100	92.9	-100	-100	-89.8	99.9	100
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
B	0.000	99.9	99.9	100	-100	-99.9	-99.9	100	100	-99.8	-99.9	100
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
C	0.000	-100	100	99.9	100	-100	-100	-100	99.9	-100	-99.9	99.9
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
D	0.000	-100	-99.8	-99.8	-100	100	-99.9	-99.8	100	100	-99.9	-99.8
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
E	0.000	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	100	-99.8	-100
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
F	0.000	100	100	-100	-100	-100	100	100	-100	-100	100	-99.8
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
G	0.000	-100	-100	99.9	-100.1	-99.9	-100	99.9	-100.1	-99.8	100	-99.9
AK	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	-0.004	-0.003	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003	-0.004
H	0.000	-100	-100	-100	100	-100	-100	-100	100	-100.1	-0.002	-0.004



Ερωτήσεις Αυτοαξιολόγησης Ενότητας

- Για ποίο λόγο τα standard διαλύματα απαιτούν προσεκτικό χειρισμό?
- Τι περιορισμοί ισχύουν για τη διατήρηση και το χειρισμό του kit
- Υπολογισμός ποσοτήτων washing buffer solution
- Τι απαιτούν τα δείγματα γάλακτος πριν τη λήψη της αναλυτικής ποσότητας και γιατί. Τι ελέγχουμε κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο

Ερωτήσεις Αυτοαξιολόγησης Ενότητας

- Τι προφυλάξεις πρέπει να λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας και της προετοιμασίας και της αποστολής των δειγμάτων?
- Ποια είναι τα κριτήρια για την αποδοχή ή απόρριψη μιας παρτίδας μετά από έλεγχο επιπέδων μυκοτοξινών?