COD 14200 10 tests

Reactivos para la determinación de aflatoxina B1 en muestras de alimentos

Only for in vitro use in the laboratory

AFLATOXINA B1 rapid test

ENZIMOINMUNOENSAYO EN NITROCELULOSA

INFORMACIÓN GENERAL

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos extremadamente tóxicos producidos por los hongos Aspergillus flavus, A. paraciticus and A. nomius¹. Estos hongos pueden aparecer en alimentos y piensos obtenidos en áreas tropicales y subtropicales. Las contaminaciones más frecuentes se encuentran en cereales, arroz, maiz, soja, frutos secos y cacahuetes². La ingesta de aflatoxinas puede provocar cancer, principalmente de hígado, pero también de intestino, pulmón y

En la Unión Europea, se han establecido niveles máximos (MLs) para varias micotoxinas. Los MLs para las aflatoxinas B1 varían entre 2 y 50 µg/kg (ppb) dependiendo de si se trata de productos para consumo animal o humano³⁻⁵.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El Aflatoxina B1 Rapid Test es un enzimoinmunoensayo competitivo sobre nitrocelulosa para el cribaje de la Aflatoxina B1 en muestras de alimentos (avena, cebada, centeno, arroz, trigo, mijo, maíz, alforfón, leguminosas, nueces, semillas, piñones, especias).

Se han inmobilizado anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón en la línea de test (T) de la membrana de nitrocelulosa. Se añaden secuencialmente anti-aflatoxin B1 de ratón, muestra y aflatoxina B1 marcada con enzima. El anticuerpo de ratón se une al anticuerpo de conejo inmobilizado. La aflatoxina B1 de la muestra compite con el conjugado para unirse al anticuerpo específico de ratón. El conjugado no unido se elimina mediante un paso de lavado. Se añade entonces el sustrato cromógeno (tetrametilbencidina). La enzima unida transforma el sustrato cromógeno en un producto azul que aparece en forma de una banda coloreada.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Devices. 2 x 5 casetes.

Reagent A (Extraction solution). 3 frascos. Solución de extracción.

Reagent B (Dilution buffer). 1 vial. Tampón de dilución.

Reagent C (Antibody solution). 1 vial. Solución de anticuerpo, tapón amarillo.

Reagent D (Enzyme conjugate). 1 vial. Conjugado enzimático, tapón verde.

Reagent E (Washing buffer). 1 vial. Tampón de lavado, tapón blanco.

Reagent F (Tetramethylbenzidine substrate). 1 vial. Sustrato, tapón azúl.

Filters and Syringes. 10 unidades de cada uno. Filtros y jeringas

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 $^{\circ}$ C. Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Los componentes líquidos son estables una vez abiertos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven a la temperatura recomendada, bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Color azul del sustrato (Reagent F).
- Devices (casetes): roturas en el sobre contenedor, presencia de líneas o manchas en la membrana antes de utilizar.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los Reactivos están listos para su uso.

PRECAUCIONES

- Las aflatoxinas son compuestos carcinógenos. Evitar el contacto con la boca y piel. Tomar precauciones para evitar su inhalación. Cualquier material contaminado con aflatoxinas debe ser destruido o descontaminado con una solución de hipoclorito de sodio (10 % v/v).
- Evitar el contacto de los materiales biológicos con la piel y mucosas.
- No comer, beber, fumar, almacenar o preparar comida, o aplicar cosméticos en el area de trabajo designada.
- El TMB es tóxico por inhalación, en contacto con la piel o si es ingerido. Manejarlo con el debido cuidado.
- No utilizar componentes caducados ni mezclar componentes de distintos lotes.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Debe obtenerse una muestra homogénea y representativa del compuesto.

 Triturar y pulverizar la muestra (50-100 g) hasta obtener un polvo fino y homogéneo.

Extracción de la muestra:

- Para detectar 2 ppb: extraer 5 g de muestra pulverizada con 15 mL de Reactivo A.
- Para detectar 4 ppb: extraer 2,5 g de muestra pulverizada con 15 mL de Reactivo A.
- Agitar manualmente y a temperatura ambiente durante 3 minutos y dejar sedimentar la muestra hasta obtener un sobrenadante limpio.
- Para cereales y frutos secos: Aspirar 1,4 mL del tampón de dilución (Reagent B) con una jeringa y aspirar a continuación 1 mL de sobrenadante hasta alcanzar la marca de 2,4 mL. Mezclar suavemente. Fijar el filtro en la jeringa

Para otras muestras: Aspirar aproximadamente 1,5 mL del sobrenadante con una jeringa. Fijar el filtro en la jeringa.

PROCEDIMIENTO

Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente.

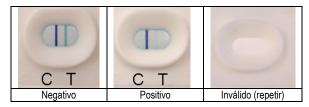
- Abrir la bolsa y tomar la cantidad necesaria de casetes. Colocar los casetes a utilizar en una superficie plana. Guardar los casetes que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
- Depositar 2 gotas de Reactivo E en el centro del pocillo. Dejar que el líquido fluva completamente.
- Depositar 2 gotas de Reactivo C en el centro del pocillo. Dejar que el líquido fluva completamente.
- Añadir 20 gotas del extracto de la muestra utilizando la jeringa. Dejar que el líquido fluya completamente.
- 5. Añadir 2 gotas de Reactivo D. Dejar que el líquido fluya completamente.
- 6. Lavar la membrana con 1 gota de Reactivo E. Dejar que el líquido fluya.
- Lavar la membrana con 3 gotas de Reactivo E. Dejar que el líquido fluya completamente.
- Añadir 5 gotas de Reactivo F y observar el desarrollo de color. La interpretación óptima del resultado se obtiene entre 5 y 6 minutos tras la aplicación.

LECTURA

Examinar la presencia de bandas de color dentro del pocillo del casete.

Resultado negativo. Aparecen 2 bandas de color: una en la zona "T" y otra en la zona "C" del pocillo.

Resultado positivo. La banda de color aparece solo en la zona "C" del pocillo. Resultado Inválido. Ausencia de bandas. Repetir el ensayo con un nuevo casete.



CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

- Valor discriminante (cut-off): 2-4 ppb.
- Especificidad: El anticuerpo utilizado muestra reacción con la aflatoxina B1 y en menor medida con las aflatoxinas B2, G1 y G2.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Council Directive 1999/29EC of 22 April 1999 on the undesirable substances and products in animal nutrition. Off. J. European Commun. L115 (1999) 32-46.
- Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. European Commun. L77 (2001) 1-13.
- Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.