

Quick Afla M1 Strip Test - Cod. ASTM1/96 96 Test - Kit immunocromatografico

Kit immunocromatografico rapido per la determinazione qualitativa/semiquantitativa dell'Aflatossina M1 nel latte secondo i limiti europei (50 ppt)

Introduzione

Il kit Quick Afla M1 Strip Test è un kit rapido basato su una reazione immunologica altamente specifica che si sviluppa tra l'anticorpo monoclonale anti-Aflatossina M1 della striscia-test e l'Aflatossina M1 stessa eventualmente presente nel campione di latte analizzato.

Le Aflatossine sono tossiche e cancerogene. Queste tossine naturali sono metaboliti delle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. I quattro tipi di Aflatossine prodotte da tali muffe sono: B1, B2, G1 e G2. L'Aflatossina B1 è indubbiamente la più frequente di questo gruppo e anche la più tossica.

L'Aflatossina M1 è un metabolita idrossilato della B1 rilevabile nel latte e nelle urine. E' il più potente agente cancerogeno epatico conosciuto per alcune specie animali. Poiché i piccoli di ogni specie sono più sensibili all'azione tossica delle Aflatossine rispetto agli adulti, grande attenzione viene rivolta all'analisi dell'Aflatossina M1 nel latte, in quanto tale alimento è diffusamente consumato dai bambini. Inoltre, l'utilizzo del latte contaminato da Aflatossina M1 per la produzione di alimenti derivati quali il latte in polvere e i formaggi non conduce ad una significativa degradazione della tossina; di conseguenza, la determinazione della concentrazione di tale sostanza nel latte all'origine è molto importante.

La commissione della Comunità Europea ha fissato il livello massimo accettabile di Aflatossina M1 nel latte (fresco o in polvere ricostituito) a 50 pg/ml (ppt) nel 1998. Il CODEX Alimentarius e la FDA hanno invece stabilito un limite massimo pari a 500 pg/ml (ppt), in vigore in U.S.A. e in molti paesi extra-europei.

Questo kit è stato ideato e realizzato per la ricerca di Aflatossina M1 nel latte in pochi minuti e senza necessità di incubatori o reagenti/consumabili addizionali. L'eventuale presenza di conservanti nel campione non influisce sul risultato.

Principio del test

Il kit Quick Afla M1 Strip Test è un saggio immunocromatografico competitivo su striscia-test che lega un anticorpo monoclonale altamente specifico anti-Aflatossina M1 a particelle d'oro colloidale. Il campione di latte (200 µL) è dispensato in un apposito pozzetto di reazione in plastica trasparente, dove vengono posti in sospensione i reagenti liofilizzati che ricoprono il fondo del pozzetto stesso; la risospensione porta ad un colore rosa uniforme. Il latte è incubato per 5 minuti per permettere all'anticorpo anti-Aflatossina M1 legato alle particelle d'oro di fissarsi all'Aflatossina M1 eventualmente presente nel campione. La striscia-test viene allora inserita nel pozzetto di reazione con le frecce rivolte in basso, in modo che il campione venga assorbito per capillarità. Gli anticorpi delle particelle d'oro che non si sono legate con l'Aflatossina M1 presente nel latte si legheranno allora all'Aflatossina M1 fissata lungo la Linea Test della striscia (T-line), formando una linea rossa in corrispondenza di quella posizione. Se gli anticorpi delle particelle d'oro si sono fissate all'Aflatossina M1 presente nel campione, queste particelle passeranno oltre la T-line e raggiungeranno la Linea del Controllo (C-line).

Interpretazione visiva dei risultati: un'intensità della T-line maggiore della C-line indica un risultato inferiore a 50 ppt; viceversa un'intensità della T-line inferiore della C-line indica un risultato positivo e superiore a 50 ppt. Se le due linee mostrano intensità uguali e indistinguibili ad occhio nudo, il risultato è pari a circa 50 ppt. Qualora si rendesse visibile solo la C-line e non la T-line, il risultato sarà allora da interpretare come fortemente positivo (*superiore a 300-400 ppt*).

Il kit contiene tutto ciò che serve per una pronta esecuzione del test ed è eseguibile ovunque, su un qualsiasi tavolo o piano d'appoggio.

Precauzioni

1. Conservare tutti i componenti del kit a 2°-8°C e protetti dalla luce. NON CONGELARE. Non utilizzarli dopo la data di scadenza. La stabilità del kit è pari a 12 mesi dalla data di produzione, se conservato correttamente.
2. Prima di aprire il contenitore delle strisce-test, mantenerlo a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) per almeno 10 minuti.
3. Utilizzando delle forbici, tagliare e rimuovere l'esatto numero di pozzetti di reazione e di strisce-test che serviranno per le analisi previste. Assicurarsi che i pozzetti inutilizzati vengano accuratamente richiusi e protetti. Riporre prontamente in frigorifero i componenti inutilizzati.
4. Attenersi alla procedura indicata in metodica. La variazione dei tempi e delle modalità rispetto a quanto indicato può portare a risultati non accurati.
5. Seguire le buone pratiche di laboratorio quando viene usato il kit e durante l'analisi. Maneggiare le strisce-test avendo cura di avere le mani asciutte e pulite.
6. E' buona norma accompagnare i test con l'analisi di un campione di latte sicuramente negativo. Tale procedura non è indispensabile, ma se ne consiglia l'applicazione per verificare la buona funzionalità del kit.
7. Mescolare bene il campione di latte e analizzarlo preferibilmente a temperatura ambiente (25°C ± 5°C). La temperatura del campione non influisce comunque sull'esito del test, purchè non sia ancora parzialmente congelato.

- Utilizzare un nuovo puntale per ogni campione. Ovviamente, i pozzetti di reazione e le strisce-test sono monouso e non possono essere riutilizzati.
- Per fare in modo che i tempi di reazione siano adeguatamente controllati e mantenuti, si consiglia di non eseguire più di 8 test simultaneamente. Prendere i tempi correttamente all'inizio di ciascuna incubazione per ogni campione, in modo che i tempi indicati siano perfettamente rispettati e non vi siano differenze tra campione e campione.
- Quick Afla M1 Strip Test è un test di screening, pertanto i risultati non dovrebbero essere considerati come definitivi. In caso di dubbio, il test deve essere confermato con il metodo di riferimento (HPLC).
- Come suggerito dalla Buona Pratica di Laboratorio, si raccomanda di indossare guanti protettivi e i dispositivi di sicurezza personale abituali quando viene usato il kit e durante l'analisi.
- Eliminare appropriatamente tutti i materiali, contenitori, reagenti e campioni (e qualsiasi altro prodotto che entra in contatto con essi) dopo l'uso. Non re-introdurre i reagenti inutilizzati nei contenitori originari.
- L'eventuale presenza di conservanti nel campione (Bronopol o Azidiol, sodio azide) non influisce sul buon esito del test. E' quindi possibile analizzare questi campioni senza problemi.

Procedura

Preparazione dei campioni

Latte liquido di qualsiasi tipologia (fresco, pastorizzato, UHT, microfiltrato, crudo, intero, parzialmente scremato, scremato, ecc.):

Utilizzare il campione tal quale. Non è necessario scremare il campione prima del test.

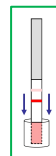
Latte in polvere:

Risospendere il campione in acqua distillata o deionizzata secondo le proporzioni peso/volume fornite dal produttore del latte in polvere. Agitare bene il campione ridissolto in modo da essere certi della sua completa dissoluzione e dell'assenza di polvere residua.

Utilizzare il campione così ripristinato come un campione di latte liquido (v. paragrafo precedente).

Analisi

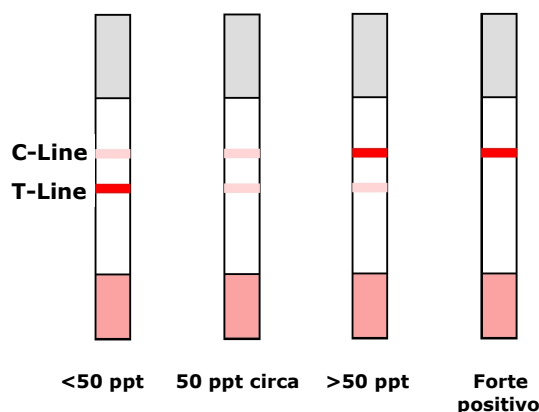
- Prelevare il kit dal frigorifero.
- Prima di aprire il contenitore delle strisce-test, mantenerlo a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) per almeno 10 minuti.
- Mediante delle forbici, tagliare e rimuovere l'esatto numero di pozzetti di reazione e di strisce-test che serviranno per le analisi previste. Assicurarsi che i pozzetti inutilizzati vengano accuratamente richiusi e protetti. Riporre prontamente in frigorifero i componenti inutilizzati. Aprire i pozzetti e assicurarli fermamente nel telaio fornito.
- Per fare in modo che i tempi di reazione siano adeguatamente controllati e mantenuti, si consiglia di non eseguire più di 8 test simultaneamente. Prendere i tempi correttamente all'inizio di ciascuna incubazione per ogni campione, in modo che i tempi indicati siano perfettamente rispettati e non vi siano differenze tra campione e campione.
- Mescolare bene il campione di latte e analizzarlo preferibilmente a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). La temperatura del campione non influisce comunque sull'esito del test, purchè non sia ancora parzialmente congelato.
- Prelevare 200 μL di campione di latte utilizzando la micropipetta da 200 microlitri fornita sulla quale sia stato già inserito fermamente un nuovo puntale, avendo cura di eseguire il prelievo almeno 1 centimetro all'interno del campione stesso.
- Dispensare tali 200 microlitri di latte sul fondo di un pozzetto di reazione già posizionato nel telaio fornito.
- Utilizzando la pipetta con lo stesso puntale, **aspirare e dispensare nuovamente il contenuto del pozzetto al suo interno per circa 8-10 volte**, in modo da risospendere e miscelare il liofilizzato di particelle d'oro nel latte. Evitare la formazione di bolle. Il campione dovrebbe assumere una colorazione rosa uniforme.
N.B.: la mancata o parziale esecuzione di questo passaggio può compromettere i risultati del test.
- Lasciare ad **incubare il pozzetto per 5 minuti**, a temperatura ambiente.
- Con le mani asciutte e pulite, prelevare una striscia-test e porla nel pozzetto avendo cura di mantenere le frecce stampate sulla striscia-test orientate verso il basso. La striscia-test deve rimanere nel pozzetto in posizione verticale, in modo che l'estremo della striscia tocchi il fondo del pozzetto.
- Lasciare ad **incubare per 5 minuti**, a temperatura ambiente.
- Estrarre la striscia-test dal pozzetto, porla su una superficie orizzontale ed **interpretare i risultati entro i 5 minuti seguenti**, ad occhio nudo o mediante il lettore opzionale RDS-1500 PRO Strip Reader (v. paragrafo seguente). Quando si utilizza il lettore opzionale RDS-1500 PRO Strip Reader per l'interpretazione quantitativa, al fine di garantire la massima accuratezza e una riproducibilità ottimale dei risultati, si consiglia vivamente di leggere i risultati immediatamente al termine dei 10 minuti totali previsti (5' + 5').



Interpretazione dei risultati

Al termine del periodo di incubazione, osservare visivamente la striscia-test e le bande trasversali eventualmente comparse sulla stessa. La banda più vicina alle frecce (cioè alla zona immersa nel pozzetto) è chiamata T-Line (Linea Test), mentre la banda più lontana è chiamata C-Line (Linea del Controllo).

- **La Linea Test (T-Line) è più intensa della Linea del Controllo (C-Line):** la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione analizzato è inferiore a 50 ppt.
- **La Linea Test (T-Line) ha la stessa intensità della Linea del Controllo (C-Line):** la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione analizzato è pari a circa 50 ppt.
- **La Linea Test (T-Line) è meno intensa della Linea del Controllo (C-Line):** la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione analizzato è superiore a 50 ppt.
- **La Linea Test (T-Line) è assente ed è presente solo la Linea del Controllo (C-Line):** la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione analizzato è molto elevata (pari o superiore a 300-400 ppt).
- **Nessuna banda in corrispondenza della Linea del Controllo (C-Line):** il test NON è valido. Si consiglia di ripetere l'analisi.



N.B.: Quick Afla M1 Strip Test fornisce anche un'indicazione approssimativa della quantità di Aflatossina M1 a seconda del grado di intensità reciproca delle due linee. Ad esempio, quando la Linea Test (T-Line) è più intensa della Linea del Controllo (C-Line) e quest'ultima è poco visibile potremmo dire che la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione è quanto più prossima a zero quanto meno la C-Line è visibile; analogamente, quando la Linea Test (T-Line) è meno intensa della Linea del Controllo (C-Line) e la T-Line è poco visibile potremmo dire che la concentrazione di Aflatossina M1 nel campione è quanto più superiore a 50 ppt quanto meno la T-Line è visibile. Una simile interpretazione semi-quantitativa visiva è comunque sempre approssimativa e deve essere confermata da un metodo quantitativo (ELISA o HPLC).

E' possibile conservare la striscia-test con il risultato ma è necessario tagliarne la parte bassa contrassegnata dalle frecce per evitare che il flusso di campione continui lungo la striscia e il risultato si modifichi nel tempo.

La mancata migrazione del liquido sulla striscia-test porterà ad un test non valido. Questa situazione avviene quando il test è eseguito su latte anormale, coagulato o con presenza di residui solidi, oppure se la procedura non è stata effettuata correttamente. In tutti questi casi si consiglia di ripetere il test dall'inizio. Tutti i campioni interpretati come positivi devono essere confermati con il metodo di riferimento (HPLC).

Per la lettura della striscia-test con il lettore RDS-1500 PRO, in grado di fornire un risultato quantitativo in ppt, inserire la strip nell'apposito alloggiamento in plastica nera secondo il verso indicato nel manuale del lettore stesso. Quindi, mantenendo l'alloggiamento per il suo lato semicircolare, inserirlo nella guida posta sulla parte superiore dello strumento avendo cura di introdurlo con la striscia-test rivolta verso il lettore. Premere quindi il tasto "Run test" sullo schermo: il risultato quantitativo sarà mostrato sul display immediatamente. Per tutte le altre operazioni con il lettore RDS-1500 PRO si rimanda alla lettura del suo manuale d'uso. **Quando si utilizza il lettore opzionale RDS-1500 PRO Strip Reader, al fine di garantire la massima accuratezza e una riproducibilità ottimale dei risultati, si consiglia vivamente di leggere i risultati immediatamente al termine dei 10 minuti totali previsti (5' + 5').**

Materiale fornito nel kit

- 96 pozzetti di reazione e 96 strisce-test, suddivisi in tubi cilindrici richiudibili e dotati di tappo essiccatore. Ciascun tubo cilindrico contiene 8 pozzetti e 8 strisce-test.
- Micropipetta da 200 microlitri, riutilizzabile
- 96 puntali monouso
- Telaio riutilizzabile da 96 posizioni per mantenere i pozzetti di reazione in posizione verticale
- Istruzioni

Quick Afla M1 Strip Test - Code ASTM1/96 96 Tests - Lateral-flow test kit

Rapid immunochromatographic test for the qualitative/semiquantitative determination of Aflatoxin M1 in milk according to European limits (50 ppt)

Introduction

Quick Afla M1 Strip Test is a rapid assay based on a highly specific immunologic reaction which develops between the anti-Aflatoxin M1 monoclonal antibody of the lateral flow test and the Aflatoxin M1 of the milk sample.

Aflatoxins are toxic and carcinogenic metabolites produced by some moulds such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Crops may be contaminated by one or more of the four following sub-types of aflatoxins: B1, B2, G1 and G2. Aflatoxin B1 is the most toxic and frequently detected type.

When cows eat contaminated feed, Aflatoxin B1 is converted by hydroxylation to Aflatoxin M1, which is subsequently secreted in the milk and urine of lactating cows. It is the most hepatic carcinogenic agent for some animal species. Since young animals are more sensitive to the toxic action of all aflatoxins when compared to adults, great attention is paid to the analysis of Aflatoxin M1 in milk, as it is widely consumed by babies. As a matter of fact, Aflatoxin M1 is quite stable towards the normal milk processing methods such as pasteurization and, if present in raw milk, it may persist into final products for human consumption. Furthermore, the use of contaminated milk for the production of dairy products does not reduce or destroy the toxin, therefore the determination of this substance at every level of milk distribution is very important.

Most controlling government agencies worldwide have regulations regarding the amount of aflatoxins allowable in human and animal foodstuffs. Many countries established limits for the presence of Aflatoxin M1 in milk and milk products. Since 1998, in the EU the limit for the presence of M1 in milk and reconstituted milk powders has been set at 0.05 mg/L or 50 parts per trillion (50 ppt). CODEX Alimentarius and FDA have established a maximum level of 0.5 mg/L or 500 parts per trillion (500 ppt).

The use of this kit is meant for the determination of Aflatoxin M1 in milk samples in a few minutes and without any need of incubators or additional chemicals/consumables. The presence of preservatives in the samples does not alter the test results.

Principle of the test

Quick Afla M1 Strip Test is a competitive immunochromatographic assay based on the lateral flow format. Each test strip includes a highly specific anti-Aflatoxin M1 monoclonal antibody linked to colloidal gold particles. The milk sample (200 µL) is added to a clear plastic reaction microwell, and used to resuspend the lyophilized reagents to a uniform pink color in the bottom of the microwell. The milk is incubated briefly (5 min) to allow the anti-Aflatoxin M1 antibody bound to the gold particles to engage with the Aflatoxin M1 present in the milk sample. The test strip is then put into the sample well with the arrows pointing downward so that the milk is capillary absorbed by the strip. Any antibody linked to gold particles that is not complexed with the Aflatoxin M1 present in the milk will bind to the Aflatoxin M1 imprinted at the Test line (T-Line), forming a signal (red line) at that position. If the antibody linked to the gold particles has engaged with the Aflatoxin M1 present in the milk sample, the gold particles will flow past the T-Line and reach the Control line (C-Line).

Visual interpretation of the test results: if the T-Line signal intensity is stronger than the signal at the C-Line it means that the result is lower than 50 ppt. If the signal at the T-Line is less intense compared to the C-Line it means that the concentration of Aflatoxin M1 in the milk sample is higher than 50 ppt. If the two lines have equal signal intensities and it is not possible to distinguish which one is more intense by eye, then the test result is about 50 ppt. When only the C-Line is visible and the T-Line cannot be seen, the test result is strongly positive (*equal or higher than 300-400 ppt*).

The kit includes all that is needed to perform the test on milk samples everywhere, on every kind of table or bench.

Precautions

1. Store all components of the kit at 2°-8°C and far from the light. DO NOT FREEZE. Do not use the kit after its expiry date printed on the external label. The kit shelf life is 12 months after the production date, when correctly stored.
2. Before opening the test strips container, allow it to reach the room temperature (25°C ± 5°C).
3. By means of scissors, cut and remove the exact number of reaction wells the remove the needed number of test strips according to the number of samples to analyze. Close back all the unused wells and strips in their container, then promptly put them back in the refrigerator.
4. Follow the instructions as given in this document, strictly. Any variation to times and procedures may cause wrong results.
5. Follow the Good Laboratory Practice when the kit is used and during the analysis. Handle the test strips with care with clean and dry hands.
6. It is suggested to include a negative control sample in every test session. This is not mandatory, but it may be useful to check the kit is working properly.

7. Mix well all milk samples before testing them. Preferably, analyze all samples at room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), however the temperature of the samples does not affect the test results, unless they are still partially frozen.
8. Use a new plastic tip for each sample. Obviously, the reaction microwells and the test strips cannot be reused.
9. To check and follow the reaction times correctly, it is strongly suggested not to run more than 8 tests simultaneously. Start the incubation time at the beginning of each period and for every sample, appropriately, to avoid different incubation times from sample to sample.
10. Quick Afla M1 Strip Test is a screening test: all results should be confirmed by the reference method (HPLC).
11. As suggested by Good Laboratory Practice, it is strongly recommended to wear protective gloves and all usual safety devices when the kit is used and during the analysis.
12. Waste all materials, containers, reagents and samples (and every product that gets in touch with them) appropriately after their use. Do not pour the unused reagents back in their original containers.
13. The presence of preservatives in the samples, such as Bronopol or Azidol, sodium azide, does not affect the test results. It means that preserved samples can be analyzed without any problem.

Test procedure

Preparation of the samples

Liquid milk from every process (fresh, pasteurized, UHT, microfiltered, raw, whole, partially skimmed, skimmed, etc.):

Use the sample as it is, without any pre-treatment. It is not necessary to defat it before the test.

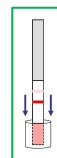
Powdered milk:

Dissolve the sample in distilled or deionized water according to the appropriate proportion weight/volume, as described by the producer of the powdered milk. Shake well the dissolved sample in order to be sure about its perfect solubilization and the absence of residuals of powder in the solution.

Use such a solution as a liquid milk sample (*see the previous paragraph*).

Analysis

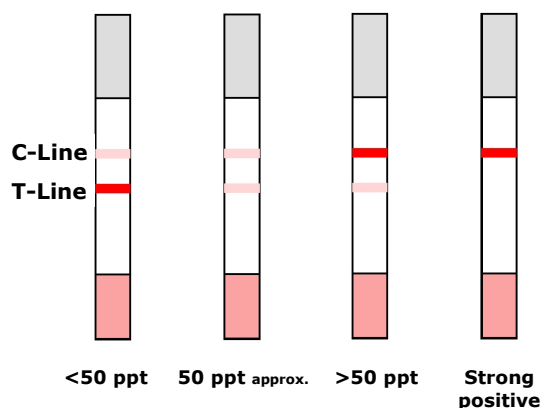
1. Take the kit out of the refrigerator.
 2. Before opening the container of the test strips, allow it to reach room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
 3. Using scissors, carefully cut and remove the right number of wells and test strips according to the number of samples that will be tested. Close back all the unused wells and strips in their container, then promptly put them back in the refrigerator. Open the reaction microwells and insert them firmly in the supplied white plastic frame.
 4. To check and follow the reaction times correctly, it is strongly suggested not to run more than 8 tests simultaneously. Start the incubation time at the beginning of each period and for every sample, appropriately, to avoid different incubation times from sample to sample.
 5. Mix well all milk samples before testing them. Preferably, analyze all samples at room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), however the temperature of the samples does not affect the test results, unless they are still partially frozen.
 6. Aspirate 200 μL of milk by using the supplied 200- μL micropipette with a new plastic tip firmly inserted. Be sure to take this volume when the tip enters deeper than 1 centimeter below the higher level of the milk sample.
 7. Dispense this volume in a new reaction microwell, fixed in the provided frame, being sure to depress the plunger to completely expel the milk sample from the plastic tip into the well.
 8. Using the same pipet tip, **aspirate the sample up and down about 8-10 times to completely resuspend the lyophilized gold particles in the milk sample**. Avoid the production of bubbles. The sample should turn a uniform pink color. After resuspending the particles, remove and discard the pipet tip.
- Note:** if this step is missed or not performed correctly, the test results may be affected.
9. **Incubate the sample for 5 minutes at room temperature** ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
 10. With clean and dry hands, insert the bottom of the test strip into the microwell containing the milk sample. The test strip should be inserted with the printed arrows pointing down. Be sure the test strip is oriented vertically and it reaches the bottom of the well.
 11. **Incubate the test strip for 5 minutes at room temperature** ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
 12. Take the test strip out of the microwell, put it on a horizontal surface and **interpret the result within 5 minutes**, by eye or by means of the optional RDS-1500 PRO Strip Reader (*see the following paragraph*). When using the RDS-1500 PRO Strip Reader for the quantitative interpretation, in order to grant the maximum accuracy and reproducibility of the results, please read the strip test immediately after the 10-minute incubation period (5' + 5') is over.



Interpretation of the results

At the end of the last incubation time, observe the test strip and the red lines that have appeared on it. The line located close to the arrows (that is, close to the zone that has been inserted in the microwell) is called T-Line (Test Line); the line located far from the arrows is called C-Line (Control Line).

- **The Test Line (T-Line) looks more intense than Control Line (C-Line):** the concentration of Aflatoxin M1 in the analyzed sample is lower than 50 ppt.
- **The Test Line (T-Line) shows the same intensity as the Control Line (C-Line):** the concentration of Aflatoxin M1 in the analyzed sample is equal to approx. 50 ppt.
- **The Test Line (T-Line) looks less intense than Control Line (C-Line):** the concentration of Aflatoxin M1 in the analyzed sample is higher than 50 ppt.
- **The Test Line (T-Line) is absent and only the Control Line (C-Line) is visible:** the concentration of Aflatoxin M1 in the analyzed sample is very high (equal to or higher than 300-400 ppt).
- **If no line is present in the C-Line area:** the test is INVALID. It is suggested to repeat the test from the start.



Note: Quick Afla M1 Strip Test also gives an approximate indication of the concentration of Aflatoxin M1 in the sample according to the intensity level of the two lines. As an example, when the Test Line (T-Line) is more intense than Control Line (C-Line) and this one is scarcely visible, the weaker the C-Line looks and the closer to zero the concentration of Aflatoxin M1 in the sample is; similarly, when the Test Line (T-Line) is less intense of the Control Line (C-Line) and the T-Line is scarcely visible, the weaker the T-Line looks and the higher than 50 ppt the concentration of Aflatoxin M1 in the sample is. Such a semiquantitative interpretation is always approximate if realized by eye: for this reason, it should be confirmed by a quantitative method (ELISA or HPLC).

It is possible to keep the test strip and its test result for future references: to this purpose, cut the lower part of the strip (where the arrows are printed) by means of scissors to avoid that the sample flow keeps on running along the test strip and the test result changes.

The lack of liquid migration along the test strip brings to an invalid test. This problem may occur when the test is performed with abnormal milk, coagulated milk or when solid residues are present, or even if the test procedure has not been followed correctly. If such an inconvenient occurs, please repeat the test from the start. All samples that have been interpreted as positive should be confirmed by the reference method (HPLC).

The test strip can be also objectively read by means of the RDS-1500 PRO Reader, which provides quantitative results (in ppt). To start the reading, insert the strip in the black cartridge adapter in the direction as indicated in the manual of the reader. Then, by handling the semi-circular part of the adapter with the strip facing the equipment, put the adapter into the reading chamber located on the upper part of the equipment. Press the "Run test" key on the touch-screen: the quantitative result will be displayed immediately. Please, read the user manual of the RDS-1500 PRO Reader for more information about all other functions and operations featured by the equipment. **When using the RDS-1500 PRO Strip Reader for the quantitative interpretation, in order to grant the maximum accuracy and reproducibility of the results, please read the strip test immediately after the 10-minute incubation period (5' + 5') is over.**

Kit content

- 96 reaction microwells and 96 test strips, parted in cylindrical tubes with drying caps. Each cylindrical tube includes 8 microwells and 8 test strips.
- 200- μ L micropipette, reusable
- 96 disposable plastic tips
- 96-hole reusable frame, to keep the reaction microwells in the appropriate vertical position
- Test manual

Quick Afla M1 Strip Test - Código ASTM1/96 96 Test - Kit inmunocromatográfico

Kit inmunocromatográfico rápido para la determinación cualitativa/semicuantitativa de Aflatoxina M1 en la leche según los límites europeos (50 ppt)

Introducción

El kit Quick Afla M1 Strip Test es un kit rápido basado en una reacción inmunológica muy específica que se desarrolla entre el anticuerpo monoclonal anti-Aflatoxina M1 de la tira y la Aflatoxina M1 misma que se encuentra en la muestra de leche analizada.

Las Aflatoxinas son tóxicas y carcinogénicas. Estas toxinas naturales son metabolitos de los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Los cuatro tipos de Aflatoxinas producidos por estos mohos son: B1, B2, G1 y G2. La Aflatoxina B1 es seguramente la más frecuente en este grupo y también la más tóxica.

La Aflatoxina M1 es un metabolito hidroxilado de la B1 y se puede detectar en la leche y orina. Es el más poderoso agente carcinogénico hepático conocido para algunas especies animales. Como los cachorros y los pequeños de cada especie son los más sensibles a la acción tóxica de las Aflatoxinas que los adultos, se pone la máxima atención al análisis de Aflatoxina M1 en la leche porque este alimento es ampliamente consumido por los niños. Además, el uso de leche contaminada por Aflatoxina M1 para la producción de derivados como la leche en polvo y los quesos no conlleva una significativa degradación de la toxina: por consiguiente, la determinación de la concentración de esta sustancia en la leche como materia prima es muy importante.

En el 1998 la comisión de la Comunidad Europea estableció el nivel máximo aceptable de Aflatoxina M1 en la leche y leche en polvo reconstituida de 50 pg/ml (ppt). En cambio, el CODEX Alimentarius y la FDA establecen un nivel máximo permitido de 500 pg/ml (ppt) en E.E.U.U.

Este kit ha sido desarrollado para la detección de Aflatoxina M1 en la leche en pocos minutos y sin necesidad de incubadores o reagentes/consumibles adicionales. La posible presencia de conservantes en la muestra no afecta los resultados.

Principio del test

El kit Quick Afla M1 Strip Test es un ensayo inmunocromatográfico competitivo en formato de tira donde un anticuerpo monoclonal muy específico anti-Aflatoxina M1 está atado a partículas de oro coloidal. La muestra de leche (200 µL) se dispensa en un pocillo de reacción de plástico transparente, donde se ponen en suspensión los reactivos liofilizados que recubren el fondo del mismo pocillo; la disolución lleva a un color rosa uniforme. La leche se mantiene en incubación por 5 minutos para permitir al anticuerpo anti-Aflatoxina M1 atado a las partículas de oro reaccionar con la Aflatoxina M1 presente en la muestra. Después se pone la tira en el pocillo con las flechas dirigidas hacia abajo por 5 minutos más, para que la muestra sea absorbida por la tira por capilaridad. Los anticuerpos de las partículas de oro que no se han atado a la Aflatoxina M1 de la leche reaccionarán con la Aflatoxina M1 vinculada en la Línea Test de la tira (T-Line), desarrollando una línea roja en esta posición. Si los anticuerpos de las partículas de oro han reaccionado con la Aflatoxina M1 de la muestra, estas partículas sobrepasarán la T-Line y alcanzarán la Línea del Control (C-Line).

Para interpretar los resultados, una intensidad de la T-Line mayor que la de la C-Line indica un resultado inferior a 50 ppt; diferentemente, una intensidad de la T-Line menor que la de la C-Line indica un resultado positivo y superior a 50 ppt. Si las dos líneas muestran una intensidad igual e indistinguible a simple vista, el resultado es aproximadamente 50 ppt. Si tan sólo la C-Line fuera visible sin la T-Line, el resultado sería igual o superior a 500 ppt.

El kit incluye todo el material para realizar el análisis, en laboratorio o sobre una mesa cualquiera.

Precauciones

1. Conservar todos los componentes del kit a 2°-8°C y protegidos de la luz. NO CONGELLEN. No utilicen el kit después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase del producto. La vida útil del kit es de 12 meses de la fecha de producción, si conservado correctamente.
2. Antes de abrir el contenedor de las tiras, manténganlo a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) de 10 a 15 minutos.
3. Por medio de tijeras, cortar y remover el número exacto de pocillos de reacción y de tiras que se necesitan para el análisis. Asígúrense que los pocillos que no se utilizan se vuelvan a cerrar apropiadamente. Poner en la nevera todos los componentes inutilizados, enseguida.
4. Sigán cuidadosamente las instrucciones indicadas en este documento. La variación de los tiempos de incubación y del procedimiento del ensayo respecto a lo indicado podría causar resultados inexactos.
5. Sigán las Buenas Prácticas de Laboratorio cuando se use el kit y durante el análisis. Toquen las tiras con manos secas y limpias.
6. Se sugiere que se analice una muestra de leche seguramente negativa durante los ensayos. Si bien no es indispensable, puede resultar útil para comprobar la buena reactividad del kit.

7. Mezclen bien la muestra de leche y la analicen preferiblemente a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). De todos modos la temperatura de la muestra no afecta el resultado del test, con tal que la muestra no sea todavía parcialmente congelada.
8. Utilicen una nueva punta con cada muestra. Por supuesto, los pocillos de reacción y las tiras son desechables y no se pueden volver a usar.
9. Para que los tiempos de incubación resulten correctamente controlados y mantenidos, se sugiere que no se realicen más de 8 ensayos simultáneamente. Cuiden los tiempos de incubación de cada muestra precisamente, de manera que los tiempos indicados sean respetados perfectamente y no se produzcan diferencias entre muestra y muestra.
10. Quick Afla M1 Strip Test es un test de screening, por tanto los resultados no deberían considerarse como definitivos. Si hay dudas, el test debe ser confirmado por el método de referencia (HPLC).
11. Como establecido por las Buenas Prácticas de Laboratorio, se recomienda utilizar guantes de protección y los habituales dispositivos de seguridad individual cuando el kit sea usado y durante los análisis.
12. Eliminen todos los materiales, contenedores, reagentes y muestras (y cualquier otro producto puesto en contacto con ellos) apropiadamente después de su uso. No reintroduzcan los reagentes inutilizados en sus contenedores originales.
13. La presencia de conservantes en las muestras (Bronopol o Azidiol, azida sódica) no afecta los resultados del test. Por tanto es posible analizar estas muestras sin problemas.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Leche líquida de cualquier tipo (fresca, pasteurizada, UHT, microfiltrada, cruda, entera, parcialmente descremada, descremada, etc.):

Utilicen la muestra sin tratamiento. No es necesario descremar la muestra antes del ensayo.

Leche en polvo:

Resuspender la muestra en agua destilada o desmineralizada según las proporciones peso/volumen indicadas por el productor de la leche en polvo. Agiten la muestra muy bien para que su solubilización resulte completa y no se encuentren residuos de polvo.

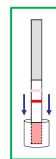
Ahora se puede analizar la muestra como si fuera leche líquida (*vean el párrafo precedente*).

Análisis

1. Quiten el kit de la nevera.
2. Antes de abrir el contenedor de las tiras, manténganlo a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) de 10 a 15 minutos.
3. Por medio de tijeras, corten y remuevan el número exacto de pocillos de reacción y de tiras que se necesitan para el análisis. Asígúrense que los pocillos que no se utilizan se vuelvan a cerrar apropiadamente. Pongan en la nevera todos los componentes inutilizados, enseguida. Abran los pocillos e introdúzcanlos bien en el marco proveído.
4. Para que los tiempos de incubación resulten correctamente controlados y mantenidos, se sugiere que no se realicen más de 8 ensayos simultáneamente. Cuiden los tiempos de incubación de cada muestra precisamente, de manera que los tiempos indicados sean respetados perfectamente y no se produzcan diferencias entre muestra y muestra.
5. Mezclen bien la muestra de leche y la analicen preferiblemente a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). De todos modos la temperatura de la muestra no afecta el resultado del test, con tal que la muestra no sea todavía parcialmente congelada.
6. Aspiren 200 μL de muestra de leche por medio de la micropipeta de 200 microlitros, con una nueva punta insertada apropiadamente, introduciéndola por lo menos 1 centímetro en el interior de la muestra.
7. Dispensen estos 200 microlitros de leche en el fondo del pocillo ya puesto en el marco proveído.
8. Utilizando la pipeta con la misma punta, **aspiren y vuelvan a dispensar el contenido del pocillo en su interior unas 8-10 veces**, para que se disuelva y mezcle el liofilizado de partículas de oro en la leche. Eviten la producción de burbujas. La muestra debería asumir un color rosa uniforme.

Nota: si este paso no se realiza correctamente o solo parcialmente se pueden afectar los resultados del test.

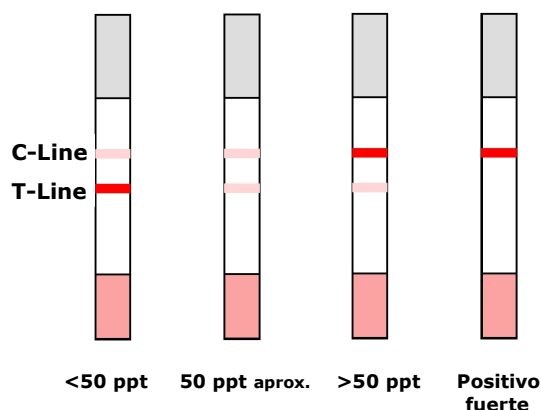
9. **Incuben el pocillo por 5 minutos**, a temperatura ambiente.
10. Con las manos secas y limpias, cojan una tira e pónganla en el pocillo con las flechas imprimidas en la tira dirigidas hacia abajo. La tira debe ser mantenida en el pocillo en posición vertical, con la parte más baja de la tira que toque el fondo del pocillo.
11. **Incuben por 5 minutos**, a temperatura ambiente.
12. Extraigan la tira del pocillo, pónganla en una mesa horizontal e **interpreten los resultados dentro de 5 minutos**, mediante lectura visiva o mediante el lector RDS-1500 PRO Strip Reader opcional (*vean el párrafo siguiente*). Si se utiliza el lector opcional RDS-1500 PRO Strip Reader para la interpretación cuantitativa, lean los resultados inmediatamente después de los 10 minutos totales de incubación (5' + 5'), para garantizar las máximas exactitud y reproducibilidad de los resultados.



Interpretación de los resultados

Al término del periodo de incubación, observen atentamente la tira y las líneas que han aparecido en la tira misma. La línea más cerca de las flechas (es decir a la zona puesta en el pocillo) se llama T-Line (Línea Test), mientras la línea más próxima se llama C-Line (Línea del Control).

- **La Línea Test (T-Line) es más intensa de la Línea del Control (C-Line):** la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra analizada es menor de 50 ppt.
- **La Línea Test (T-Line) muestra la misma intensidad de la Línea del Control (C-Line):** la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra analizada es igual a 50 ppt aprox.
- **La Línea Test (T-Line) es menos intensa de la Línea del Control (C-Line):** la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra analizada es mayor de 50 ppt.
- **La Línea Test (T-Line) no aparece y sólo la Línea del Control (C-Line) es visible:** la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra analizada es muy elevada (igual a o mayor de 300-400 ppt).
- **Ninguna línea aparece en la zona de la Línea del Control (C-Line):** el test es INVÁLIDO. Se sugiere repetir el análisis desde el principio.



Nota: Quick Afla M1 Strip Test permite obtener una indicación aproximada de la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra según el nivel de intensidad recíproca de las dos líneas. Por ejemplo, cuando la Línea Test (T-Line) es más intensa de la Línea del Control (C-Line) y ésta resulta menos visible la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra es tanto más próxima a cero cuanto menos la C-Line es visible; análogamente, cuando la Línea Test (T-Line) es menos intensa de la Línea del Control (C-Line) y la T-Line resulta poco visible la concentración de Aflatoxina M1 en la muestra es tanto mayor de 50 ppt cuanto menos la T-Line es visible. De todos modos, una parecida interpretación semicuantitativa visual es siempre aproximada y se debe confirmar a través de un método cuantitativo (ELISA o HPLC).

Es posible conservar la tira con el resultado pero es necesario cortar su parte baja, es decir la zona con las flechas, para evitar que el flujo de muestra siga su curso a lo largo de la tira y el resultado se modifique en el tiempo.




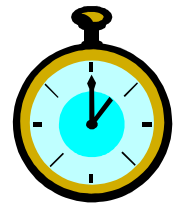
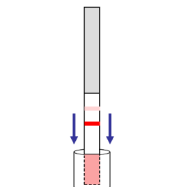
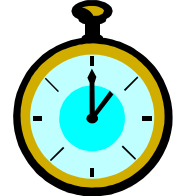
La carencia de flujo de la muestra en la tira lleva a un ensayo inválido. Esta situación puede ocurrir si el test se realiza con leche anormal, cuajada o con presencia de residuos sólidos, o también si el procedimiento no ha sido respetado correctamente. En todos estos casos se sugiere repetir el test desde el principio. Todas las muestras interpretadas como positivas deben ser confirmadas con el método de referencia (HPLC).

Para leer la tira con el lector RDS-1500 PRO, que permite obtener un resultado cuantitativo (en ppt), inserten la tira en el adaptador de plástico negro según la dirección indicada en el manual del lector. Después, manteniendo el adaptador por su lado semicircular, insértenlo en la cámara de lectura situada en la parte superior del equipo manteniendo la tira hacia el lector. Luego, presionen la tecla "Run test" en la pantalla táctil: el resultado cuantitativo será mostrado en la pantalla, inmediatamente. Para más información sobre el uso del lector RDS-1500 PRO les rogamos se sirvan leer su manual de usuario. **Si se utiliza el lector opcional RDS-1500 PRO Strip Reader para la interpretación cuantitativa, lean los resultados inmediatamente después de los 10 minutos totales de incubación (5' + 5'), para garantizar las máximas exactitud y reproducibilidad de los resultados.**

Material incluido en el kit

- 96 pocillos de reacción y 96 tiras, repartidos en envases cilíndricos recerrables con tapón desecante. Cada envase cilíndrico contiene 8 pocillos y 8 tiras.
- Micropipeta de 200 microlitros, reusable
- 96 puntas desechables de plástico
- Marco reusable con 96 huecos para mantener los pocillos en posición vertical
- Manual del usuario

Metodica schematica / Quick guide / Guía rápida

		ITALIANO	ENGLISH	ESPAÑOL
	1.	Prelevare il kit dal frigorifero. Prima di aprire il contenitore delle strisce-test, mantenerlo a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) per almeno 10 minuti.	Take the kit out of the fridge. Before opening the cylindrical tube containing the test strips, keep it at room temperature (25°C ± 5°C) at least 10 minutes	Quiten el kit de la nevera. Antes de abrir el contenedor de las tiras, manténganlo a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) de 10 a 15 minutos
	2.	Tagliare e rimuovere l'esatto numero di pozzetti di reazione per le analisi previste. Richiudere i pozzetti inutilizzati nel contenitore originale. Riporre in frigorifero i componenti inutilizzati.	Cut and remove the exact number of reaction microwells according to the number of samples. Close the unused microwells back in the tube. Put the unused components back in the fridge.	Corten y remuevan el número exacto de pocillos y tiras que se necesitan para el análisis. Vuelvan a cerrar los pocillos que no se utilizan en su envase. Pongan en la nevera todos los componentes inutilizados, enseguida.
	3.	Mescolare bene il campione di latte. Prelevare 200 µL di campione di latte mediante la pipetta da 200 µL con un puntale nuovo, avendo cura di introdurre il puntale per almeno 1 cm nel campione stesso. Dispensare tali 200 µL di latte in un pozzetto di reazione già posizionato nel telaio fornito.	Mix well the milk sample. Aspirate 200 µL of milk sample by using the supplied 200-µL micropipette with a new tip, ensuring to insert the tip at least 1 cm below the surface of the sample. Dispense these 200 µL of milk in a microwell, correctly put in the supplied frame.	Mezclen bien la muestra de leche. Aspiren 200 µL de muestra de leche por medio de la micropipeta de 200 µL con una nueva punta insertada apropiadamente, introduciendo la punta por lo menos 1 cm en el interior de la muestra. Dispensen estos 200 microlitros de leche en el fondo del pocillo ya puesto en el marco proveído
	4.	Con la stessa pipetta aspirare e dispensare nuovamente il contenuto del pozzetto al suo interno per <u>circa 8-10 volte</u> , in modo da miscelare il reagente liofilizzato con il latte. Evitare la formazione di bolle. Il campione dovrebbe assumere una colorazione rosa uniforme. Lasciare ad incubare per <u>5 minuti</u> a temperatura ambiente.	With the same pipette aspirate and dispense the liquid in the microwell <u>about 8-10 times</u> , so that the reagent is mixed and dissolved in the sample. Avoid the formation of bubbles. The sample should get a uniform pink color. Incubate for <u>5 minutes</u> at room temperature.	Utilizando la pipeta con la misma punta, aspiren y vuelvan a dispensar el contenido del pocillo en su interior <u>unas 8-10 veces</u> , para que se disuelva y mezcle el liofilizado de partículas de oro en la leche. Eviten la producción de burbujas. La muestra debería asumir un color rosa uniforme. Incuben el pocillo por <u>5 minutos</u> , a temperatura ambiente.
	5.	Con le mani asciutte e pulite prelevare una striscia-test e porla nel pozzetto avendo cura di mantenere le frecce stampate sulla striscia-test orientate verso il basso. La striscia-test deve rimanere nel pozzetto in posizione verticale, in modo che l'estremo della striscia tocchi il fondo del pozzetto.	With clean and dry hands insert the bottom of the test strip into the microwell containing the milk sample. The test strip should be inserted with the printed arrows pointing down. Be sure the strip is oriented vertically and it reaches the bottom of the well.	Con las manos secas y limpias, cojan una tira e pónganla en el pocillo con las flechas imprimidas en la tira dirigidas hacia abajo. La tira debe ser mantenida en el pocillo en posición vertical, con la parte más baja de la tira que toque el fondo del pocillo.
	6.	Lasciare ad incubare per <u>5 minuti</u> a temperatura ambiente. Estrarre la striscia-test dal pozzetto, porla su una superficie orizzontale ed <u>interpretare i risultati entro 5 minuti</u> secondo le istruzioni fornite in questo manuale.	Incubate for <u>5 minutes</u> at room temperature. Get the test strip out of the microwell, put it on a horizontal surface and <u>interpret the results within 5 minutes</u> according to the instructions given in this manual.	Incuben por <u>5 minutos</u> a temperatura ambiente. Extraigan la tira del pocillo, pónganla en una mesa horizontal e <u>interpreten los resultados dentro de 5 minutos</u> según las indicaciones contenidas en este manual.

Per ulteriori informazioni o dettagli, si prega di contattare:

In case you need further information and details, please contact:

Para más información y detalles, les rogamos se sirvan ponerse en contacto con:

Zetalab s.r.l.

Via Castelfidardo, 11 - 35141 Padova
Tel. 049/2021144- Fax 049/2021143
Email: info@zetalab.it - www.zetalab.it