DETERMINACION DE AFLATOXINAS TOTALES POR (ELISA)

ELABORADO POR:	VERIFICADO POR:	VISTO BUENO DE:
Nombre y Apellido: Lic. Leyla Díaz Lic Laura Lezcano	**Nombre y Apellido:** Lic. Olga Pavón	**Nombre y Apellido:** Ing. Agr. Carmen Berni
Cargo: Jefa Técnico Departamento de Laboratorio Químicos (DLQ)	**Cargo:** Directora Dirección de Laboratorios (DL)	**Cargo:** Directora General Dirección General Técnica (DGT)
Firma: **Fecha:**	**Firma:** **Fecha:**	**Firma:** **Fecha:**

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es detallar la metodología analítica para detección y cuantificación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) mediante ENSAYO INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS(ELISA) en distintas muestras de semillas usando un lector de microplacas.

2. ALCANCE

Este protocolo provee los requisitos específicos el análisis de Aflatoxina Totales en distintas muestras de semillas. Se aplica a cuando haya necesidad de múltiples análisis o si así lo dispusiese el cliente.

3. DOCUMENTO DE REFERENCIA

3.1 Official analytical test method for total aflatoxins in food as stipulated in Section 2.2 of Notice - Shoku-an-hatsu 0331 No.5 issued on 31 March 2011 and in an appendix of Notice - Shoku-an-hatsu 0816 No.2 issued on 16 August 2011.

3.2 Principles of curve fitting for multiple Sandwich Immunoassay- https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2861.pdf

4. SIGLAS

4.1. Siglas:

4.1.1 µg/kg y ng/mL: Es el equivalente a ppb

4.1.2 µg/mL, mg/kg y mg/L: Es el equivalente a ppm.

4.1.3 IAC: Columna de Inmunoafinidad

4.1.4 PBS: Buffer Fosfato Salino

4.1.5 AFT: Aflatoxinas Totales

4.1.6 AFG1: Aflatoxinas G1

4.1.7 AFB1: Aflatoxinas B1

4.1.8 AFG2: Aflatoxinas G2

4.1.9 AFB2: Aflatoxinas B2

4.2.0 OD: Densidad óptica

4.2.1 Curva 4PL: Logistica de 4 parámetros

5. RESPONSABLE

El Departamento de Laboratorios Químicos es responsable de asegurar la correcta implementación del procedimiento. Los técnicos del área deben ejecutar cada etapa del método, registrar la información en los formularios correspondientes y garantizar el cumplimiento de los lineamientos técnicos establecidos

6. ACTIVIDADES

Se describen los equipos y materiales a emplear en el ensayo:

6.1Equipos

a) Agitador Vortex

b) Lector UV de Microplacas para Elisa

c) Agitador de Tubos

Lic. Olga Pavón
SENAVE

MSC. Layla Sofía Díaz
Lic. Química- R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

mecip 2015

d) Sonicador

e) Balanza granataria

f) Bomba de vacío

6.2. Materiales:

a) Espatula de metal

b) Probeta de vidrio o plástico de 50 mL

c) Pipeta automática o micropipeta 100 a 1.000µL

d) Pipeta automática o micropipeta 20 a 200µL

e) Pipeta automática o micropipeta multicanal de 30 a 300µL

f) Vasos de precipitado 100 mL o 600mL

g) Tubo de centrifuga de 50 y 10ml con tapa.

h) Embudo de Filtracion

6.3. Reactivos:

a) MRC de Aflatoxinas

b) Hexano p.a

c) Acetonitrilo HPLC

d) Metanol HPLC

e) Tween 20

f) IAC(Columna de Inmunoafinidad)

g) Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,4

h) Kit de aflatoxinas

i) Hipoclorito de Sodio

6.4. Desarrollo del ensayo:

6.4.1 Preparación de la solución del estándar:

6.4.2 Soluciones: Cuando se cuenta con estándares por separado:

6.4.2.1 Solución Estándar Patrón (disponibles en el mercado)

Ejemplo:

a) Solución para Aflatoxinas B1 2µg/ml

b) Solución para Aflatoxinas B2 0,5µg/ml

c) Solución para Aflatoxinas G1 2µg/ml

d) Solución para Aflatoxinas G2 0,5µg/ml

6.4.2.2 Solución Estándar para Aflatoxinas Totales de 50ng/mL

Ejemplo: Tomar respectivamente 1,25mL de la solución de 2µg/ml de Aflatoxina B1, 0,5mL de la solución de 0,5µg/ml de Aflatoxina B2, 1mL de la solución de 2µg/ml de Aflatoxina G1

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

y 0,5mL de la solución de 0,5µg/ml de Aflatoxina G2 y llevar hasta 100mL con metanol para tener una solución de 50ng/mL

6.4.3 Cuando se cuenta con Mix de Aflatoxinas

A modo de ejemplo se describe a el Mix comercial de 25µg/ml de cada uno, pudiendo estar disponibles otras concentraciones a las cuales solo debería de aplicárseles los cálculos correspondientes para obtener concentraciones similares a la que describe la técnica.

a) Solución Estándar Patrón (disponibles en el mercado)

Ejemplo: Mix de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. 25µg/ml de cada uno

b) Solución Estándar (0,125 µg/ml de cada uno)

Ejemplo tomar 1ml de la solución Estándar Patrón (25µg/ml de cada uno) y diluir en 200ml de acetonitrilo

Mantener refrigerado a -20°C. El vencimiento de la solución madre es de 18 meses.

c) Solución intermedia.

Diluir la solución stock en acetonitrilo para preparar las soluciones de diferentes concentraciones de un rango apropiado incluyendo la del límite de cuantificación (ejemplo: 0.0005 µg/ml, 0.001 µg/ml, 0.002 µg/ml, 0.005 µg/ml). Mantener refrigerado entre -4 a -10ºC o bien en Freezer. Los vencimientos de las soluciones son de 9 meses.

6.4.4 Preparación de Reactivos.

a) Solución Buffer fosfato salino pH 7.4:

Solución que contenga 0.138M de NaCl, 0.027M KCl y pH 7.4.

Usar el disponible en el mercado diluir según convenga.

b) Soluciones de Tween20:

Tween20 al 0.01%: Diluir 100µl de tween 20 en 1litro de PBS. Mezclar bien.

Elaborarlo según convenga para cada matriz.

c) Soluciones de extracción:

Dependiendo de la matriz a ser analizada, siempre será una proporción mayor de solvente y menor de agua, con el agregado en ciertas ocasiones de sales para mejorar el proceso de extracción.

6.4.5 Método del ensayo

6.4.5.1 Trituración.

a) Quitar las partes no comestibles (piel, cascara, semilla, etc.).

b) Moler por completo con trituradora hasta homogenizar:

En el caso de oleaginosas, la trituración debe llegar a una consistencia pastosa.

Las muestras que queden con consistencia pulverulenta, deben pasar por un tamiz de 20 mesh.

6.4.5.2 Preparación de la muestra.

a) Pesar 5 g con balanza electrónica en tubo de centrifuga de 50ml.En casos en los que se necesite extraer una mayor cantidad, tener en cuenta que el radio de extracción es de 1:5 (1 parte de muestra por 5 de solución de extracción)

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

mecip 2015

b) Agregar 25mL de solución de extracción (ej: Metanol 70%), a la muestra de 5g y agitar por 3minutos con la agitadora de tubos.

c) Colocar el embudo con el papel de filtro en el tubo de centrífuga de 50mL y tomar la solución de extracción y filtrar. Si no se logra obtener el suficiente filtrado, duplicar el solvente de extracción inicial.

6.4.5.3 Fortificación

Pesar en dos tubos limpios 5g de muestra para el tubo elegido como control positivo realizar la siguiente operación:

a) Si el estándar se encuentra por separado: adicionar en una 1mL (50ng/mL) de solución estándar de Aflatoxinas totales

b) Se el estándar es un MIX:

$$\frac{X1 \times V1}{5g} = X2(\frac{\mu g}{kg})$$

Siendo:

X1:es la concentración de cada aflatoxina en el mix

V1: el volumen en mL a tomar de dicho estándar

X2: la concentración de cada aflatoxina en la muestra fortificada

Donde:

Sabiendo que el valor de fortificación al cual se pretende llegar es de 10µg/mL, se irán tanteando valores para V1 hasta que la sumatoria de los mismos sea la esperada.

c) Para el tubo de control negativo:

No se adicionará estándar.

Manipular ambos del mismo modo descrito anteriormente, Considerar como conforme la tasa de recuperación de entre 50 y 150% en la diferencia entre valores medidos con y sin solución añadida

6.4.5.3 Dilución de los extractos

a) Colocar en el colector la columna previamente puesta a temperatura ambiente. Las siguientes operaciones deben practicarse rápidamente antes de que la columna se seque y se endurezca.

b) Acondicionar o no la columna según indicaciones que ofrezcan los manuales que vienen con dicho insumo. Ej: Llenar la columna con 3mL de PBS o agua purificada (añadir tween20 según sea necesario) y después ocurrir de la columna (acondicionamiento de la columna según necesidad).

c) Tras colocar el reservorio en la columna, colocar 2mL de la solución de extracción con 8mL de PBS que contenga 0.01% de Tween20(*si se ha duplicado la extracción entonces las cantidades de serían de 4ml de la solución de extracción con 16 ml de PBS que contenga 0.01% de Tween20, o aumentar según necesidad*) y mezclar bien. Abrir la llave y verter. Cuidar la velocidad de escurrimiento desde la columna, la cual debe ser aproximadamente de 1-3 mL/min.

d) Tras escurrir la solución de extracción a través de la columna, lavar la columna primero con 10mL de PBS con 0,01% de Tween y 10mL de agua purificada. Una vez que el agua purificada deje de escurrir, extraerla por completo empujándola con una jeringa o similar.

Lic. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química – R.P.N° 497
Ing. Agrónoma– R.P.N° 8.544

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

mecip 2015

e) Colocar la columna en un tubo de centrifuga de 10mLy eluir cargando 1,4mL de metanol (grado HPLC). Una vez que el metanol deje de escurrir, recupéralo por completo empujándolo con una jeringa o similar.

f) Agregar 0,6mL de agua purificada y considéralo la solución muestra.

6.4.6 Uso del Kit.

6.4.6.1 Precaución

a) Antes de comenzar el procedimiento de ensayo, poner todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C).

b) Todos los reactivos deben ser mezclados por inversión suave o o agitando antes de su uso. No inducir la formación de espuma.

c) Una vez iniciado el ensayo, todos los pasos subsiguientes pasos subsiguientes deben completarse sin interrupción y dentro de los límites de tiempo recomendados.

d) Tapar todos los reactivos inmediatamente después uso. No intercambie las tapas de los frascos.

e) Utilice una punta desechable distinta para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

f) Todas las muestras y los estándares deben realizarse al mismo tiempo mismo tiempo, para que todas las condiciones de la prueba sean las mismas.

g) La aflatoxina es una sustancia muy tóxica. Deseche todos los líquidos en un recipiente de plástico que contenga lejía blanqueador doméstico (mínimo 10%). Todo el material de laboratorio debe ponerse en remojo durante al menos 1 hora en una solución de lejía doméstica al 10%. de lejía doméstica. Evite el contacto de la piel y las mucosas con los reactivos y los extractos de las muestras mediante el uso de guantes y ropa de protección. Si se produce una exposición de la piel y las membranas mucosas a los líquidos, lavar inmediatamente con agua.

h) La solución de parada es ácido clorhídrico 1N. Evite contacto con la piel y las membranas mucosas.Limpie inmediatamente cualquier derrame y lave la zona con abundante cantidad de agua. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con abundante agua.

i) No mezclar componentes de diferentes lotes.

j) No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.

k) Comprobar tanto la precisión como la exactitud del equipo de laboratorio utilizado durante el procedimiento (micropipetas, lector de ELISA, etc.).

6.4.6.2 Protocolo de preparación y lectura

b) Puede variar según el Kit a utilizar ver catalogo del producto

c) Todos los kits y reactivos deben de usarse tras volver a temperatura ambiente. Agregar 200µL del conjugado en cada pocillo utilizando una micropipeta de 8 canales. Agregar también a cada pocillo 100µL de las soluciones de referencia de aflatoxinas (0; 1,0; 2,0; 4,0; 10 y 20 ppb) y de solución de muestra. La relación del conjugado estándar/muestra debe permanecer en 2:1, pero el volumen de conjugado y estándar/muestra puede reducirse por ejemplo a 100uL y 50ul respectivamente. El contenido a transferir del pocillo de dilución a los pocillos recubiertos con anticuerpos debe permanecer en 100uL

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Isc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química- R.P.N° 497
Agrónoma- R.P.N° 8.544

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

mecip 2015

d) Poner la cantidad necesaria de tiras en las placas de antígenos en fase sólida.

e) Trasladar 100µL de la solución de la placa para mezclas a cada pocillo de la placa de antígenos en fase y dejar reposar por 15 minutos en oscuridad.

f) Tirar la solución del interior de los pocillos y lavarlos agregando 250µL o más de solución de lavado. Realizar la operación en cuestión unas 5 veces como minimo.

g) Limpiar las placas de antígenos en fase solida sobre una toalla de papel y quitar bien el líquido del interior de los pocillos.

h) Agregar a cada pocillo 100µL del sustrato y dejar reposar por 5 minutos en oscuridad.

i) Detener a la reacción agregando 100µL de solución bloqueadora en cada uno. Como la diferencia de tiempo entre la adición del sustrato hasta la adición de la solución bloqueadora influye en la absorbancia, procurar que los intervalos sean homogéneos. Medir con el lector de microplacas (450nm) la absorbancia de las placas en que se detuvo la reacción.

j) Abrir el archivo para preparar la curva de calibración.

k) Comprobar la curva de calibración y las concentraciones de aflatoxinas.

6.5 Resultados de Inspección y evaluación de los resultados

a) Un valor de OD menor a 0.5 de unidades de absorbancia para el estándar de 0ppb podría indicar deterioro de los reactivos.

b) No adoptar los resultados y repetir el ensayo en caso de que el coeficiente de correlación de la curva de calibración sea inferior a 0,980 o menor a lo establecido por el fabricante del kit.

c) En caso de detectar más de 4ppb, tomar la determinación final luego de realizar un nuevo ensayo con HPLC.

6.5 Cálculos:

6.5.2 Los resultados semicuantitativos pueden obtenerse por simple comparación de la absorbencia de la muestra con la absorbancia de los pocillos del calibrador: Las muestras que contienen menos color que un pocillo calibrador tienen una concentración de aflatoxina mayor que la concentración del calibrador. Las muestras que contienen más color que un pozo calibrador tienen una concentración inferior a la concentración del calibrador.

6.5.3 La interpretación cuantitativa requiere graficar las absorciones de los calibradores (eje Y) frente a la concentración del calibrador (eje X). Se puede utilizar el ajuste de la curva de 4 parámetros o el ajuste de la curva LOG-LOGIT. Si el software del lector de placas no proporciona estos ajustes de curva, se puede utilizar una hoja de cálculo que realice el ajuste de la curva.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

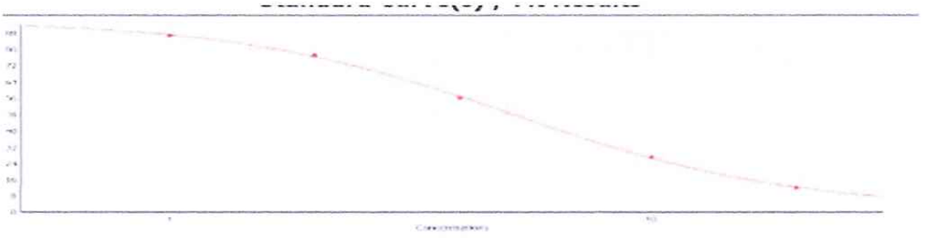
Lsc. Leyla Boffa Díaz
Lic. Química
Autónoma- R.P.N° 8.544
R.P.N° 497

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

6.5.4 Ejemplo de curva estándar

La siguiente tabla contiene un ejemplo para una típica curva estándar. La unión se calcula como porcentaje de la absorción del estándar de 0 ng/mL. Estos valores de valores son sólo un ejemplo y no deben utilizarse en lugar de la curva estándar que debe ser medir en cada nueva prueba.

Well Col	Conter	Well	OD(450-630)	%B/Bo	AFT(µg/kg)	Ratio calc/known based on AFT(µg/kg) (calculated)
	ard S1	A01	1,24	100	>> Y range	n.a.
	ple X3	A02	0,976	79	1,794	
	ard S2	B01	1,076	87	1,039	103,88
	ple X4	B02	0,927	75	2,152	
	ard S3	C01	0,959	77	1,919	95,96
	ple X5	C02	0,91	73	2,284	
	ard S4	D01	0,695	56	4,094	102,34
	ple X6	D02	0,931	75	2,125	
	ard S5	E01	0,336	27	9,813	98,13
	ple X7	E02	0,914	74	2,254	
	ard S6	F01	0,149	12	20,331	101,66
	ple X8	F02	0,879	71	2,519	
	ple X1	G01	0,99	80	1,69	
	ple X9	G02	0,821	66	2,977	
	ple X2	H01	1,033	83	1,369	
	le X10	H02	1,01	81	1,54	



6.5.5 Cantidad de Aflatoxina Total contenida en la muestra (µg/kg)

Se obtiene mediante el remplazo de valores en la siguiente ecuación de la curva generada por el análisis hecho por el software del equipo:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

Siendo:

a = el valor mínimo que se puede obtener (es decir, lo que ocurre con una dosis 0)

d = el valor máximo que puede obtenerse (es decir, lo que ocurre con una dosis infinita)

c = el punto de inflexión (es decir, el punto de la curva en forma de S situado a mitad de camino entre a y d)

b = la pendiente de Hill de la curva (es decir, está relacionada con la inclinación de la curva en el punto c).

Msc. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química -R.P.N° 497
Ing. Agrónoma- R.P.N° 8.544

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

mecip 2015

6.6 Expresión de resultados:

Generalmente se utilizará la expresión µg/kg pudiendo utilizarse sus equivalentes según necesidad del cliente.

6.6.2 Bondad de ajuste y Porcentaje de Recuperación

Al utilizar ajustes de curva del tipo 4PL más que observar los valores de el coeficiente de correlación, se espera que los valores de recuperación de los estándares se encuentren de entre 70 a 130%

Tanto en casos de muestras como estándares: Se procede al siguiente calculo:

$$\% R = \frac{\text{(Aflatoxinas en muestra)}}{\text{(Aflatoxina agregado)}} \times 100$$

7. CONTROL DE CAMBIOS

Item	Página	Cambios
-----	-----	-------

8. DOCUMENTOS

Nombre del Documento	Código	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición Final
Historial de ensayos	FOR-DLQ-021	SILAB	Técnicos	5 años	Eliminación
Informe de Resultados de Ensayo LRCV	FOR-DLQ-017	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación
Protocolo de Trabajo LRCV	FOR-DLQ-014	Sala de archivos	Técnicos	5 años	Eliminación

9. APROBACIÓN DEL DOCUMENTO

APROBACIÓN POR LA DGT	
Nombre y Apellido	Carmen Berni Ing. Agr. Reg. COSAVE PY-078
Fecha	05/20/26
Vigencia	El presente documento será de aplicación a partir del día hábil siguiente a la fecha de su aprobación.

Lic. Olga Pavón
SENAVE

Carmen Berni
Ing. Agr.
Reg. COSAVE PY-078

MSC. Leyla Sofía Díaz
Lic. Química - R.P.N° 497
Ing. Agrónoma - R.P.N° 8.544

mecip 2015