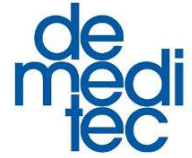


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Aflatoxin M₁ ELISA

REF

DEAM1E01



96

CONTENTS/ INHALTSVERZEICHNIS

1. GENERAL INFORMATION	3
2. PRINCIPLE OF THE TEST	3
3. PRECAUTIONS	3
4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS	4
5. REAGENTS	4
6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)	4
7. SAMPLE PREPARATION	5
8. REAGENT PREPARATION	5
9. PROCEDURE	6
10. CALCULATION OF RESULTS	6
11. TYPICAL STANDARD VALUES	6
12. PERFORMANCE	7
13. REFERENCES	7
1. ALLGEMEINES	8
2. TESTPRINZIP	8
3. VORSICHTSMAßNAHMEN	9
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN	9
5. REAGENZIEN	9
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN	10
7. PROBENVORBEREITUNG	10
8. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	11
9. TESTDURCHFÜHRUNG	11
10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	11
11. TYPISCHE STANDARDKURVE	11
12. TECHNISCHE DATEN	11
13. LITERATUR	12
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	12

Sensitivity	22-38 pg/mL
Recovery (Milk)	78%
Recovery (Cheese)	83%
Recovery (Yoghurt)	108%
Incubation Time	140 min

1. GENERAL INFORMATION

Aflatoxins belong to the class of mycotoxins. Chemically they are defined as difuranocyclopentanocumarines or difuranopentanolidocumarines, i.e. aflatoxins contain a dihydrofuran or a tetrahydrofuran ring, to which a substituted cumarin system is condensed. Out of about 20 known aflatoxins, the moulds *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* produce exclusively aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂, and all the other aflatoxins are derivatives of these four. The derivatives are developed either by metabolism in humans, animals and microorganisms or by environmental reactions.

Aflatoxin M₁ was the first metabolite of Aflatoxin B₁, which could unequivocally be detected by Allcroft and Carnaghan in the milk of cows in 1963. Out of this reason this first derivative was called Aflatoxin M₁ (= milk). As further investigations showed, also other mammals excrete Aflatoxin M₁ in milk, feces and urine. Contaminations of milk and milk products can be hazardous for human beings, because M₁ is similar to Aflatoxin B₁ regarding its hepatotoxicity. M₁ is only less carcinogenic.

In order to protect people against aflatoxin-induced diseases, there is a need for the qualitative and quantitative control of endangered foodstuff, besides appropriate hygienic precautions, which avoid the formation of aflatoxins. The **Demeditec Aflatoxin M₁ ELISA** is a quick, economical and sensitive method to detect aflatoxin M₁ in milk and milk products. After an appropriate sample preparation, 40 samples can be tested in duplicate within 140 minutes.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Aflatoxin M₁** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An aflatoxin conjugate is bound on the surface of a microtiter plate. Aflatoxin M₁ containing samples or standards and an antibody directed against aflatoxin M₁ are given into the wells of the microtiter plate. Immobilized and free aflatoxin M₁ compete for the antibody binding sites. After one hour incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugate against the antibody is given into the wells and after another hour incubation, the plate is washed again. Then a substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of aflatoxin M₁ is indirectly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).
5. Aflatoxins are very toxic substances. They can cause cancer or irreversible damages of the genetic substance. Aflatoxins are toxic after inhalation, swallowing or dermal contact. Appropriate protective clothing must be worn.

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with aflatoxin conjugate.
2. **CAL 1 - 6 10x** Aflatoxin M₁ Standards (0; 100; 500; 1000; 5000; 10000 pg/mL): 6 vials with 0.5 mL each in methanol as 10x concentrate. Dilute 1+9 with sample/ standard diluent.
Note: The concentrations above refer to the 10x concentrated standards.
3. **Ab** Anti-Aflatoxin M₁ Antibody (rabbit): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-rabbit-IgG-HRP): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
5. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL; ready-to-use.
6. **STOP SOLN** Stop Solution (0.5 M H₂SO₄): 15 mL; ready-to-use.
7. **SAM DIL** Sample/Standard Diluent (PBS): 60 mL, dyed red, ready-to-use.
8. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate, dyed blue. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
9. **Instruction Manual.**

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 50, 100, 500 and 1000 µL-micropipets
- Microtiter plate shaker
- ELISA reader (450 nm)
- Volumetric flask
- Mixer
- Horizontal shaker, magnetic stirrer
- Centrifuge
- Plastic bag to store unused microtiter strips

Reagents

- Methanol
- Hexane
- Double-distilled water

7. SAMPLE PREPARATION

Milk

- 5 mL of a fresh milk sample (full-cream milk or skim milk) are pipetted into a test tube and incubated for 30 minutes at 4°C.
- Afterwards there follows a centrifugation at 3000 g for 10 minutes. 450 µL of the clear milk serum below the fat layer is taken off and mixed with 50 µL methanol.
- This solution can now be directly inserted in the ELISA.

Milk Powder

- 9.1 g skim milk powder or 12.5 g full-cream milk powder respectively are reconstituted with double-distilled water, so that the total volume comes to 100 mL, are further warmed up to about 50°C and are homogenized by using a magnetic stirrer and are finally treated according to the sample preparation for milk.

Cheese

- A representative cheese sample is crushed in a mixer without addition of liquid.
- From this sample, 2 g cheese are combined with 10 mL of a mixture of hexane, methanol and double-distilled water (50:30:20) and are extracted for 30 minutes on a horizontal shaker at 125 / minute.
- The liquid is decanted and centrifuged for 5 minutes at 3000 g.
- The lower aqueous methanolic phase is removed by means of a pasteur pipette, diluted 1:10 with sample diluent and then directly inserted in the ELISA.

Yoghurt

- 1 g sample are mixed with 5 mL of methanol.
- The mixture is shaken or vortexed thoroughly for 5 minutes and centrifuged for 5 minutes at 3000 g afterwards.
- 0.25 mL cleared sample are transferred in dark glass vials and evaporated under an air or nitrogen stream to dryness at 40°C.
- A 10% solution of methanol in sample diluent is prepared (e.g. 9 mL sample diluent + 1 mL methanol).
- The residue of the evaporated sample is dissolved in 0.25 mL of the sample diluent/methanol mixture. The solution is mixed thoroughly (vortex) for 1 minute and is directly tested in the ELISA.

8. REAGENT PREPARATION

Because the standards are concentrated 10x, they have to be diluted by the enclosed standard/sample diluent 1:10 (e.g. 50 µL standard + 450 µL diluent), before using them in the assay procedure.

9. PROCEDURE

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL diluted (1:10) standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 50 µL aflatoxin M₁ antibody into each well.
3. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-rabbit-IgG-HRP) into each well.
6. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 60 minutes at room temperature on a microtiter plate shaker (or 90 minutes without shaker).
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (0.5 M H₂SO₄) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

10. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in pg/mL on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of aflatoxin M₁ in pg/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. The diluted samples must be further converted by the appropriate dilution factor. The dilution factor for milk (powder) is 1, for cheese 25 and for yoghurt 5 according to the sample preparation procedure as described above.

11. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 0 pg/mL standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

Aflatoxin M ₁ (pg/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
10	90
50	84
100	78
500	47
1000	34

12. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Aflatoxin M₁ test** is ranging from 22-38 pg/mL depending on sample matrix.

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Aflatoxin M₁ test** is ranging from 46-110 pg/mL depending on sample matrix.

Recovery

The recovery of spiked samples was determined to 78% for milk, 60% for cheese and 108% for yoghurt.

Intra-assay Precision

The intra-assay variation of the aflatoxin M₁ test was determined to 6.4-7.7%.

Cross-reactivity relative to aflatoxin M₁ (=100%)

Aflatoxin B ₁	57 %
Aflatoxin G ₁	6 %
Aflatoxin B ₂	39 %
Aflatoxin G ₂	21 %

13. REFERENCES

1. C. Schlatter, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*, **1990**, 10, 138-144:
Past and future in mycotoxin toxicology research.
2. H. S. el-Nezami, G. Nicoletti, G. E. Neal, D.C. Donohue, J. T. Ahokas, *Food Chem Toxicol.*, **1995**, 33, 173-179:
Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand.
3. I. Aman, *Zentralbl Veterinärmed. [B]* **1992**, 39, 692-694:
Reduction of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus heat treatment.
4. W. Horwitz, R. Albert, S. Nesheim, *J AOAC Int.* **1993**, 76, 461-491:
Reliability of mycotoxin assays - an update.
5. H. P. van Egmond, *Food Addit Contam.* **1995**, 12, 321-330:
Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials.
6. P. Markaki, E. Melissari, *Food Addit Contam.* **1997**, 14, 451-456:
Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC.
7. P. M. Scott, M. W. Trucksess, *J AOAC Int.* **1997**, 80, 941-949:
Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis.
8. L. Sibanda, S. De Saeger, C. Van Peteghem, *Int J Food Microbiol.* **1999**, 48, 203-209:
Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M₁ in milk.
9. E.K. Kim, D.H. Shon, D. Ryu, J.W. Park, H.J. Hwang, Y.B. Kim, *Food Addit Contam.* **2000**, 17, 59-64:
Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC.
10. F. Galvano, V. Galofaro, A. Ritieni, M. Bognanno, A. De Angelis, G. Galvano, *Food Addit Contam.*, **2001**, 18, 644-646:
Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation.

Empfindlichkeit	22-38 pg/mL
Wiederfindung (Milch)	78 %
Wiederfindung (Käse)	83 %
Wiederfindung (Joghurt)	108 %
Inkubationszeit	140 min

1. ALLGEMEINES

Aflatoxine gehören zur Klasse der Mykotoxine. Chemisch handelt es sich um Difuranocyclopentanocumarine oder Difuranopentanolidocumarine, d.h. die Aflatoxine bestehen aus einem Dihydro- bzw. Tetrahydrofuranring, an den ein substituiertes Cumarinsystem ankondensiert ist. Von den etwa 20 bekannten Aflatoxinen werden ausschließlich B₁, B₂, G₁ und G₂ von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* produziert, während es sich bei allen anderen Aflatoxinen um Metabolite dieser vier handelt. Die Metabolite werden von Menschen, Tieren, Mikroorganismen oder durch Umwelteinflüsse gebildet.

Aflatoxin M₁ war der erste Metabolit von Aflatoxin B₁, der eindeutig von Allcroft und Carnaghan im Jahre 1963 in der Milch von Kühen nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde dieses erste Derivat Aflatoxin M₁ (=Milch) genannt. Wie weitere Untersuchungen ergaben, scheiden aber auch andere Säugetiere Aflatoxin M₁ in der Milch, im Kot und im Urin aus. Kontaminationen von Milch und Milchprodukten können für den Menschen schädlich sein, da Aflatoxin M₁ in seiner akuten Hepatotoxizität dem Aflatoxin B₁ vergleichbar ist. Aflatoxin M₁ ist lediglich weniger karzinogen.

Um den Menschen vor aflatoxinbedingten Krankheiten zu schützen, bedarf es neben geeigneten Lagerbedingungen einer qualitativen und quantitativen Kontrolle gefährdeter Lebensmittel. Der **Aflatoxin M₁ Test** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 140 Minuten im Doppelsatz bestimmt werden.

2. TESTPRINZIP

Der **Aflatoxin M₁ Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Aflatoxin-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Aflatoxin M₁ enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Aflatoxin M₁-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen festphasengebundenem Aflatoxin und Aflatoxin M₁ der Probe um die freien Bindungsstellen des Antikörpers statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein gegen den Aflatoxin M₁-Antikörper gerichtetes Konjugat wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Aflatoxin M₁-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.
5. Aflatoxine sind sehr giftige Substanzen. Sie sind toxisch beim Einatmen, Verschlucken oder bei Hautkontakt und können Krebs oder irreversible Schäden in der genetischen Substanz hervorrufen. Geeignete Sicherheitskleidung tragen!

5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB** **MT** **Mikrotiterplatte** mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Aflatoxin-Konjugat.
2. **CAL** **1 – 6** **10x** **Aflatoxin M₁-Standards**: 6 Fläschchen mit je 0,5 mL (0; 100; 500; 1000; 5000; 10000 pg/mL) als 10x-Konzentrat in Methanol. Gebrauchslösung: 1+9 mit Proben/Standard-Verdünner verdünnen. **Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die 10x-konzentrierten Standards.**
3. **Ab** **Anti-Aflatoxin M₁ Antikörper** (Kaninchen): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **ENZ** **CONJ** **Konjugat** (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. **SUB** **TMB** **Substratlösung** (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **STOP** **SOLN** **Stopp-Lösung** (0.5 M H₂SO₄) 15 mL, gebrauchsfertig.
7. **SAM** **DIL** **Proben/Standard-Verdünner** (PBS), 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
8. **WASH** **SOLN** **10x** **Waschlösung** (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. **Arbeitsanleitung.**

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 50, 100, 500 und 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messkolben
- Mixer
- Horizontalschüttler, Magnetrührer
- Zentrifuge
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.

Reagenzien

- Methanol
- Hexan
- Bidestilliertes Wasser

7. PROBENVORBEREITUNG

Milch

- 5 mL einer frischen Milchprobe (Vollmilch oder fettarme Milch) werden in ein Reagenzröhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen.
- Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. 450 µL des klaren Milchserums werden nach Entfernen der oberen Fettschicht mit 50 µL Methanol versetzt und gemischt.
- Diese klare Flüssigkeit kann nun direkt im ELISA eingesetzt werden.

Milchpulver

- 9,1 g Magermilchpulver bzw. 12,5 g Vollmilchpulver werden mit bidestilliertem Wasser rekonstituiert, so dass das Gesamtvolumen 100 mL beträgt, auf ca. 50°C erwärmt und durch Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers homogenisiert und anschließend entsprechend der Probenvorbereitung für Milch behandelt.

Käse

- Eine repräsentative Käseprobe wird in einem Mixer ohne Zugabe von Flüssigkeit zerkleinert.
- Von dieser Probe werden 2 g Käse mit 10 mL eines Gemisches aus Hexan, Methanol und bidest. Wasser (50:30:20) vermischt und 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei 125/Minute extrahiert.
- Die Flüssigkeit wird dekantiert und 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert.
- Die untere wässrig-methanolische Phase wird mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen, 1:10 mit Proben/Standard-Verdünner verdünnt und anschließend im ELISA eingesetzt.

Joghurt

- 1 g Probe wird mit 5 mL Methanol gemischt.
- Die Mischung wird kräftig geschüttelt oder gevortext und anschließend 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert.
- 0,25 mL der geklärten Probe werden in braune Glasfläschchen überführt und bei 40°C unter einem Luft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft.
- Eine 10%ige Lösung von Methanol in Probenverdünner wird vorbereitet (z.B. 9 mL Probenverdünner + 1 mL Methanol).
- Der Rückstand der eingedampften Probe wird in 0,25 mL der Probenverdünner/Methanol-Mischung gelöst. Die Lösung wird für 1 Minute kräftig geschüttelt oder gevortext und anschließend im ELISA eingesetzt.

8. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Da die Standards als 10x-Konzentrat vorliegen, müssen sie mit Proben/Standard-Verdünner 1:10 (z.B. 50 µL Standard + 450 µL Verdünner) vor Einsatz im Test verdünnt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL verdünnte (1:10) Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Aflatoxin M₁ Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (1 N saure Lösung) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

5. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
6. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in pg/mL (x-Achse) aufgetragen.
7. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in pg/mL für Aflatoxin M₁ abgelesen.
8. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift beträgt der Faktor für Milch(pulver) 1 und für Käse 25.

11. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 pg/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Aflatoxin M ₁ (pg/mL)	OD-% von 0 pg/mL
0	100
10	90
50	84
100	78
500	47
1000	34

12. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze (LOD) des **Aflatoxin M₁ Tests** liegt in Abhängigkeit von der Probenmatrix bei 22-38 pg/mL.

Die untere Bestimmungsgrenze (LOQ) des **Aflatoxin M₁ Tests** liegt in Abhängigkeit von der Probenmatrix bei 46-110 pg/mL.

Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 78% für Milch, 83% für Käse und 108% für Yoghurt bestimmt.

Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Aflatoxin M₁-Tests wurde mit 6,4 – 7,7% bestimmt.









Kreuzreaktionen relativ zu Aflatoxin M₁ (=100%)

Aflatoxin B ₁	57 %
Aflatoxin G ₁	6 %
Aflatoxin B ₂	39 %
Aflatoxin G ₂	21 %

13. LITERATUR

1. C. Schlatter, J Environ Pathol Toxicol Oncol., **1990**, 10, 138-144: Past and future in mycotoxin toxicology research.
2. H. S. el-Nezami, G. Nicoletti, G. E. Neal, D.C. Donohue, J. T.Ahokas, Food Chem Toxicol., **1995**, 33, 173-179: Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand.
3. I. Aman, Zentralbl Veterinärmed. [B] **1992**, 39, 692-694: Reduction of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus heat treatment.
4. W. Horwitz, R. Albert, S. Nesheim, J AOAC Int. **1993**, 76, 461-491: Reliability of mycotoxin assays - an update.
5. H. P. van Egmond, Food Addit Contam. **1995**, 12, 321-330: Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials.
6. P. Markaki, E.Melissari, Food Addit Contam. **1997**, 14, 451-456: Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC.
7. P. M. Scott, M. W. Trucksess, J AOAC Int. **1997**, 80, 941-949: Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta