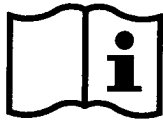


Product information

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



User's Manual

Aflatoxin B₁ ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Aflatoxin B₁ in food



DEAB1E01



96

Sensitivity	5 pg/mL
Recovery (spiked samples)	>80%
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.

Aflatoxins belong to the strongest mycotoxins, which act primarily in a hepatotoxic and carcinogenic way. The four main aflatoxins show a different toxicity. B₁ is without doubt the most toxic aflatoxin, followed by G₁, B₂ and G₂. Aflatoxin B₁, however, does not show a direct toxic action. In the process of biotransformation in the liver, the lipophilic toxin is epoxidated and transformed into an active derivative, the so-called aflatoxin B₁-2,3-epoxid. This highly reactive epoxid is able to react with nucleophilic regions of macromolecules. Amongst other this metabolite of aflatoxin B₁ binds covalently to the N-7 atom of the guanine bases of DNA. This covalent bond causes an inhibition of the DNA replication, the RNA synthesis and mutations.

Both chronic and acute intoxications are effected by aflatoxins. There are only few documented reports about acute intoxications, which are caused by uptake of mycotoxins. Of special importance for human beings are the chronic intoxications by aflatoxins. To the diseases, which develop after such chronic intoxications, belong primary liver carcinoma, hepatitis, Reye's syndrome and Kwashiorkor. Besides the generation of primary liver carcinoma, aflatoxins are presumably also responsible for other sorts of tumors, like intestinal cancer.

Contaminations with aflatoxins occur mostly with nuts and grain. In most cases aflatoxins penetrate the human body via the food. Aflatoxins are stable to heat and are only partly destroyed by boiling. In order to protect people against aflatoxin-induced diseases, there is a need for the quantitative and qualitative control of endangered foodstuff, besides appropriate hygienic precautions, which avoid the formation of aflatoxins. The **Aflatoxin B₁ ELISA** is a quick, economical and sensitive method to detect aflatoxin B₁ in food. After an appropriate sample preparation, 40 samples can be tested in duplicate within 140 minutes.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Aflatoxin B₁** 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 B₁ containing samples or standards and an antibody directed against aflatoxin B₁ are given into the wells of the microtiter plate. Immobilized and free aflatoxin B₁ 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 B₁ 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 (micro-pipets, 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. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with aflatoxin conjugate.
2. Aflatoxin B₁ Standards (0; 100; 400; 1000; 4000; 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. Anti-Aflatoxin B₁ Antibody (rabbit): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. Conjugate (anti-rabbit-IgG-HRP): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
5. Substrate Solution (TMB): 15 mL; ready-to-use.
6. Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL; ready-to-use.
7. Sample/Standard Diluent (PBS): 60 mL, ready-to-use.
8. 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. Two plastic foils to cover the strips during the incubation.
10. Plastic bag to store unused microtiter strips.
11. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 50, 100, 500 and 1000 µL-micropipets
- Microtiter plate shaker
- ELISA reader (450 nm)
- Mortar or mixer
- Horizontal shaker or magnetic stirrer
- Centrifuge

Reagents

- Methanol
- Double-distilled water

7. SAMPLE PREPARATION

- An appropriate amount of grain or nuts is crushed in a mortar or mixer to produce a fine to medium-fine powder. If flour is used, the first step can be omitted.
- 2 g of this powder are extracted with 10 mL methanol / double-distilled water (70/30 v/v). This mixture is agitated for 30 minutes on a horizontal shaker (120 / minute). Alternatively also a magnetic stirrer can be used.
- The mixture is centrifuged afterwards for 5 minutes at 3000 g.
- The aqueous phase is diluted 1:10 in standard/sample diluent, before being assayed in the **Aflatoxin B₁ ELISA**.

Alternatively also immunoaffinity columns (Cat.-No.: DEAFBA01) can be employed for the extraction. When using such columns care must be taken, that the eluate which is given into the **Aflatoxin B₁ ELISA** does not contain more than 5% organic solvent (methanol, acetone). In that case, the eluate must be further diluted with sample diluent.

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 B₁ 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 (1 N acidic solution) 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 B₁ 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 (50 for the above described extraction). The factor is dependent on the sample preparation procedure employed.

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 B ₁ (pg/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
10	90
40	85
100	70
400	40
1000	25

12. PERFORMANCE

Sensitivity

The sensitivity of the **Aflatoxin B₁ ELISA** is 5 pg/mL (based on the standard curve).

Recovery

The recovery of spiked samples was determined to >80%.

Intra-assay Precision

The intra-assay variation of the aflatoxin B₁ test was determined to 3%.

Cross-reactivity relative to aflatoxin B₁ (=100%)

Aflatoxin G1	26 %
Aflatoxin B2	6 %
Aflatoxin G2	3 %
Aflatoxin M1	2 %
Sterigmatocystin	0.02 %

13. REFERENCES

1. H. P. van Egmond, P. J. Wagstaffe, *Food Addit Contam.* **1990**, *7*, 239-251: Aflatoxin B₁ in compound-feed reference materials: an intercomparison of methods.
2. R. W. Beaver, M. A. James, T. Y. Lin, *J Assoc Off Anal Chem.* **1991**, *74*, 827-829: Comparison of an ELISA-based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn.
3. W. Horwitz, R. Albert, S. Nesheim, *J AOAC Int.* **1993**, *76*, 461-491: Reliability of mycotoxin assays - an update.
4. *Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie, 2. Auflage* (Eds.: E. Teuscher, U. Lindequist), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1994**.
5. J. A. Beti, T. W. Phillips, E. B. Smalley, *J Econ Entomol.* **1995**, *88*, 1776-1782: Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* in stored corn.
6. S. Vasanthi, R.V. Bhat, *Indian J Med Res.* **1998**, *108*, 212-224: Mycotoxins in foods--occurrence, health & economic significance & food control measures.
7. J. K. Gathumbi, E. Usleber, E. Märtlbauer, *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *32*, 349-351: Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B₁.
8. H. Otteneder, P. Majerus, *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* **2001**, *97*, 334-338: Mykotoxine, Lebensmittel-Kontaminanten Nr. 1? - Versuch einer Standortbestimmung.

Empfindlichkeit	5 pg/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	> 80 %
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.

Aflatoxine gehören den stärksten Mykotoxinen, die vor allem hepatotoxisch und carcinogen wirken. Die vier Haupt-Aflatoxine weisen eine unterschiedliche Toxizität auf. B₁ ist das toxischste Aflatoxin, gefolgt von G₁, B₂ und G₂. Aflatoxin B₁ zeigt jedoch keine direkte toxische Wirkung. Im Verlauf der Biotransformation in der Leber wird das lipophile Toxin epoxidiert und in ein aktives Derivat, das sogenannte Aflatoxin B₁-2,3-Epoxid, überführt. Dieses hochreaktive Epoxid reagiert mit nukleophilen Regionen von Makromolekülen. U.a. bindet dieser Metabolit von Aflatoxin B₁ kovalent an das N-7-Atom der DNA-Base Guanin. Diese kovalente Bindung verursacht die Hemmung der DNA-Replikation. Vor allem chronische Vergiftungen werden von Aflatoxinen verursacht. Es gibt wenige Berichte über akute Vergiftungen durch Aufnahme von Mykotoxinen. Von besonderer Bedeutung für den Menschen ist die chronische Intoxikation von Aflatoxin B₁. Zu den Krankheiten, die nach chronischer Aufnahme auftreten, gehören vor allem Leberkrebs, Hepatitis, das Rye-Syndrom und Kwashiorkor. Neben der Bildung von Leberkarzinomen sind Aflatoxine auch für die Bildung von anderen Tumoren wie Darmkrebs verantwortlich.

Kontaminationen mit Aflatoxinen treten vor allem bei Nüssen und Getreiden auf. In den meisten Fällen gelangen Aflatoxine über die Nahrung in den Körper. Aflatoxine sind hitzestabil und werden beim Kochen nur teilweise zerstört. Um den Menschen vor aflatoxinbedingten Krankheiten zu schützen, bedarf es neben geeigneten Lagerbedingungen einer quantitativen und qualitativen Kontrolle gefährdeter Lebensmittel. Der **Aflatoxin B₁ Test** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Aflatoxin B₁ in Nahrungsmitteln nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 140 Minuten im Doppelansatz bestimmt werden.

2. TESTPRINZIP

Der **Aflatoxin B₁ Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Aflatoxin-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Aflatoxin B₁ enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Aflatoxin B₁-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen festphasengebundenem Aflatoxin und Aflatoxin B₁ 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 B₁-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 B₁-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 (20-25 °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. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Aflatoxin-Konjugat.
2. Aflatoxin B₁-Standards: 6 Fläschchen mit je 0,5 mL (0; 100; 400; 1000; 4000; 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. Anti-Aflatoxin B₁ Antikörper (Kaninchen): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Proben/Standard-Verdünner (PBS), 60 mL, gebrauchsfertig.
8. 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. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
10. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
11. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 50, 100, 500 und 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mörser oder Mixer
- Horizontalschüttler oder Magnetrührer
- Zentrifuge

Reagenzien

- Methanol
- Bidestilliertes Wasser

7. PROBENVORBEREITUNG

- Eine geeignete Menge Getreide oder Nüsse wird in einem Mörser oder Mixer zu einem mittelfeinen Pulver gemahlen. Wird Mehl getestet, kann dieser Schritt ausgelassen werden.
- 2 g des Pulvers werden mit 10 mL Methanol / bidest. Wasser (70/30 v/v) extahiert. Die Mischung wird 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler (120 / Minute) geschüttelt. Alternativ kann ein Magnetührer eingesetzt werden.
- Anschließend wird die Mischung 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wird 1:10 in Proben/ Standard-Verdünner verdünnt und im **Aflatoxin B₁ ELISA** getestet.

Alternativ können für die Aufreinigung Immunaффinitätssäulen verwendet werden (Best.-Nr.: DEAF-BA01). Werden solche Säulen eingesetzt, muss darauf geachtet werden, dass die im **Aflatoxin B₁ ELISA** pipettierte Lösung nicht mehr als 5% organisches Lösungsmittel (Methanol, Aceton) enthält. Das Eluat muss entsprechend in Proben/Standard-Verdünner verdünnt werden.

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 B₁ 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

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. 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.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in pg/mL für Aflatoxin B₁ abgelesen.
4. 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 50.

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 B ₁ (pg/mL)	OD-% von 0 pg/mL
0	100
10	90
40	85
100	70
400	40
1000	25

12. TECHNISCHE DATEN**Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Aflatoxin B₁ Tests** beträgt 5 pg/mL bezogen auf die Standardkurve.

Wiederfindung

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit >80% bestimmt.

Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Aflatoxin B₁-Tests wurde mit 3% bestimmt.

Kreuzreaktionen relativ zu Aflatoxin B₁ (=100%)

Aflatoxin G ₁	26 %
Aflatoxin B ₂	6 %
Aflatoxin G ₂	3 %
Aflatoxin M ₁	2 %
Sterigmatocystin	0.02 %

13. LITERATUR

1. H. P. van Egmond, P. J. Wagstaffe, Food Addit Contam. **1990**, 7, 239-251: Aflatoxin B₁ in compound-feed reference materials: an intercomparison of methods.
2. R. W. Beaver, M. A. James, T. Y. Lin, J Assoc Off Anal Chem. **1991**, 74, 827-829: Comparison of an ELISA-based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn.
3. W. Horwitz, R. Albert, S. Nesheim, J AOAC Int. **1993**, 76, 461-491: Reliability of mycotoxin assays - an update.
4. Biogene Gifte - Biologie, Chemie, Pharmakologie, 2. Auflage (Eds.: E. Teuscher, U. Lindequist), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1994**.
5. J. A. Beti, T. W. Phillips, E. B. Smalley, J Econ Entomol. **1995**, 88, 1776-1782: Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* in stored corn.
6. S. Vasanthi, R.V. Bhat, Indian J Med Res. **1998**, 108, 212-224: Mycotoxins in foods--occurrence, health & economic significance & food control measures.
7. J. K. Gathumbi, E. Usleber, E. Märtlbauer, Lett. Appl. Microbiol. **2001**, 32, 349-351: Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B₁.
8. H. Otteneder, P. Majerus, Dtsch. Lebensm. Rdsch. **2001**, 97, 334-338: Mykotoxine, Lebensmittel-Kontaminanten Nr. 1? - Versuch einer Standortbestimmung.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità