

RIDASCREEN® Aflatoxin M1

REF R1121

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Aflatoxin M1

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of aflatoxin M1

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA[®], RIDASCREEN[®] und RIDASOFT[®]
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®], RIDASCREEN[®] and RIDASOFT[®]
are registered trademarks of R-Biopharm AG.
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 (R1121) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M1 in Milch und Milchpulver.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für max. 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	Milch.....entfetten
	Milchpulver.....lösen und entfetten

Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben)
	Milch..... ca. 20 min
	Milchpulver..... ca. 1 Std.
	Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 Std. 15 min

Nachweisgrenze:	Milch5 ng/l (ppt)
	Milchpulver5 ng/l
	(bezogen auf gelöste Milch)
	Milchpulver50 ng/kg
	(bezogen auf g-Einwaage)

Wiederfindungsrate:	in künstlich kontaminierten Proben
(bezogen auf die	Milch 100 %
Standardsubstanz)	Milchpulver..... 104 %

Spezifität:	Aflatoxin M1 100 %
	Aflatoxin M2..... <10 %

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin M1 Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Werten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDASCREEN® FAST Aflatoxin M1 (R5812)
Trilogy® Liquid Standard Aflatoxin M1 (TSL-143-2)
Trilogy® Dried Standard Aflatoxin M1 (TS-130-2)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M1 in Milch und Milchpulver.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind karzinogene und hochtoxische Stoffwechselprodukte der Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin M1, das sog. Milch-Aflatoxin, entsteht als Metabolit des Aflatoxins B1. Es wird nach Verfütterung Aflatoxin B1-haltiger Futtermittel an laktierende Kühe mit der Milch ausgeschieden.

Da Aflatoxin M1 relativ stabil gegenüber dem Pasteurisierungsprozess ist, ist nicht nur eine routinemäßige umfangreiche Kontrolle der zu verarbeitenden Rohstoffe nötig, sondern auch die Kontrolle der Endprodukte.

Seit dem 1. Januar 1999 gelten EU-weite einheitliche Höchstgehalte für Aflatoxine. Für Aflatoxin M1 wurde als Höchstwert 0,05 µg/l (50 ppt) in Milch festgelegt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin M1-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden anti-Aflatoxin M1-Antikörper, die von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden werden. Nach einem Inkubations- und Waschschrift werden Standards bzw. Probelösungen hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit nachfolgendem Waschschrift wird das

enzymmarkierte Aflatoxin M₁ (Enzymkonjugat) zugefügt. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ konkurrieren um die Aflatoxin M₁-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Aflatoxin M₁-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate K Mikrotiterplatte K	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Sample buffer Probenpuffer	Transparent	Gebrauchsfertig		60 ml
Standard 1 Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 ng/l	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	5 ng/l	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	10 ng/l	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	20 ng/l	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	40 ng/l	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	80 ng/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
Antibody Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig		11 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Waage
- Messpipetten
- Rührer / Schüttler (für Milchpulverproben)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Pasteurpipetten
- Mikropipetten für 100 µl und 250 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Die Standards enthalten Aflatoxin M1, besondere Vorsicht ist geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe verwenden).

Die Dekontamination von Glasgeräten und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Aflatoxine sind lichtempfindlich, deshalb vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf der Testkit nicht mehr verwendet werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Milch

- Milchproben zur Entfettung zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
(ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, muss die Milch vor dem Zentrifugieren auf 10 °C abgekühlt werden)
- Nach dem Zentrifugieren die obere Sahneschicht vollständig entfernen, z. B. durch Absaugen mit einer Pasteurpipette
- Fettarme Milch (= entfetteter Überstand) direkt im Test einsetzen (100 µl pro Kavität)

9.2. Milchpulver

Die Probenmenge kann angepasst werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Milchpulverprobe repräsentativ ist und das Verhältnis von Probe zu dest. Wasser konstant gehalten wird.

- 10 g Milchpulver einwiegen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen
- Durch Rühren oder Schütteln das Milchpulver vollständig suspendieren
- Anschließend mit der Aufarbeitung für Milch fortfahren (unter Kapitel 9.1 beschrieben)

Anmerkungen

Falls eine weitere Verdünnung erforderlich ist, diese mit Probenpuffer (siehe Kapitel 4.) vornehmen.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Der **Waschpuffer** (PBS-Tween-Puffer) ist aus dem beiliegenden Waschpuffersalz herzustellen (siehe Kapitel 4.). Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Puffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2 Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und (Milch-)Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Bei Milchpulvertestungen nicht mehr als 4 Streifen (32 Wells) in Einzelbestimmung verwenden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl Antikörper in die entsprechend benötigten Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl Standard bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen

Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.

6. Je 100 µl Konjugat in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
8. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
9. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET** (Z9996FF), erhältlich. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) entnommen werden.

Die Auswertung erfolgt mittels Cubic Spline-Funktion.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Aflatoxin M1-Konzentration [ng/l] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Aflatoxin M1-Konzentration in ng/l (ng/kg) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Milch	1
Milchpulver (bezogen auf gelöste Milch)	1
Milchpulver (bezogen auf g-Einwaage).....	10

13. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für Butter
- Probenaufarbeitung für verschiedene Käsesorten

Für weitere Produktinformationen und Applikationsanfragen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2011-10-21	Freigabeversion
2020-05-08	Generelle Überarbeitung
2021-02-02	Generelle Überarbeitung 9.2 Bezeichnung „Probenverdünnungs- Puffer“ durch korrekte Bezeichnung „Probenpuffer“ ersetzt

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM)



Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® Aflatoxin M1

Brief information

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 (R1121) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M1 in milk and milk powder.

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for max. 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	milk.....degreasing
	milk powder.....dissolving and degreasing

Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)
	milk approx. 20 min
	milk powder approx. 1 h
	test implementation (incubation time)..... 1 h 15 min

Limit of detection:	milk5 ng/l (ppt)
(corresponding to the	milk powder5 ng/l
standard substance)	(referring to dissolved milk)
	milk powder (referring to g-weight).....50 ng/kg

Recovery rate:	in spiked samples
(corresponding to the	milk 100 %
standard substance)	milk powder..... 104 %

Specificity:	aflatoxin M1..... 100 %
	aflatoxin M2..... < 10 %

Further information is contained in the validation report.

The specificity of the RIDASCREEN® Aflatoxin M1 test was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the

respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA analyses with them. The manual can be retrieved, printed and downloaded from www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDASCREEN® FAST Aflatoxin M1 (R5812)

Trilogy® Liquid Standard Aflatoxin M1 (TSL-143-2)

Trilogy® Dried Standard Aflatoxin M1 (TS-130-2)

1. Intended use

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 (R1121) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M1 in milk and milk powder.

2. General information

Aflatoxins are carcinogenic, highly toxic metabolites of the mold fungus varieties *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin M1 is produced as a metabolite of aflatoxin B1. It is secreted with the milk after feeding of aflatoxin B1 containing feed to lactating cows. As aflatoxin M1 is relatively stable towards the pasteurizing process, not only a comprehensive routine check of the raw materials to be processed is required, but also of the final products.

Since the first of January 1999 EU-wide uniform residue limits for aflatoxins exist. For aflatoxin M1 in milk the limit has been fixed at 0.05 µg/l (50 ppt).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin M1 antibodies. Anti-aflatoxin M1 antibodies are added which are bound by the immobilized capture antibodies. After incubation and washing step, standards or samples are added. After a further incubation with a subsequent washing step, the aflatoxin M1 enzyme conjugate is added. Free and enzyme conjugated aflatoxin M1 compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. The

substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product.

The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm and the absorption is inversely proportional to the aflatoxin M1 concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for max. 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate K	-	Ready to use		96 wells
Sample buffer	Transparent	Ready to use		60 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 ng/l	1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	5 ng/l	1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	10 ng/l	1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	20 ng/l	1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	40 ng/l	1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	80 ng/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Dissolve the salt		
Conjugate	Red	Ready to use		11 ml
Antibody	Black	Ready to use		11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Balance
- Graduated pipettes
- Stirrer / shaker (for milk powder samples)
- Centrifuge + centrifugal vials
- Pasteur pipettes
- Micropipettes for 100 µl and 250 µl
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

5.2 Reagents

- Distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

This test should be carried out only by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

The standard solutions contain aflatoxin M1, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and toxin-content solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

This kit may contain hazardous substances. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Aflatoxins are light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

The reddish substrate/chromogen is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to addition in the wells
- Extinction less than 0.8 ($E_{450\text{ nm}} < 0.8$) for zero standard

9. Sample preparation

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1 Milk

- Centrifuge milk samples for degreasing: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F) (if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to 10 °C (50 °F) prior to centrifugation)
- After centrifugation, remove upper cream layer completely by aspirating through a pasteur pipette
- Use the skimmed milk (= defatted supernatant) directly in the test (100 µl per well)

9.2 Milk powder

The amount of sample can be adjusted. It should be noted that the sample has to be representative and that the ratio of sample to distilled water remains the same.

- Weigh in 10 g milk powder and fill up to 100 ml with distilled water
- Suspend completely by shaking or stirring
- Continue with the preparation of milk as described in capture 9.1

Remarks

If a further dilution is required, use sample buffer (see capture 4.) for the dilution.

10. Test procedure

10.1 Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

As **washing buffer**, a PBS tween buffer is needed. Please use the wash buffer salt (see capture 4.) contained in the kit. Dissolve the entire wash buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Unused reagents should be immediately stored at 2 - 8 °C.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow wells to dry between work steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions. Do not use more than 4 strips (32 wells) at a time when testing milk powder in single determination.
2. Pipette 100 µl of antibody in duplicate to the wells, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all wells with 250 µl wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
4. Pipette 100 µl standard or prepared sample to separate duplicate wells. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see capture 10.1) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
6. Pipette 100 µl of conjugate. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see capture 10.1) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
8. Pipette 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

9. Pipette 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 15 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A specific software, the **RIDASOFT® Win.NET** (Z9996FF), is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

The calculation should be done by use of a cubic spline function.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the aflatoxin M1 concentration [ng/l].

12. Result interpretation

In order to obtain the aflatoxin M1 concentration in ng/l (ng/kg) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

milk	1
milk powder (referring to dissolved milk).....	1
milk powder (referring to g-weight)	10

13. Further application notes

- Sample preparation for butter
- Sample preparation for cheese

Further product information and application requests, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2011-10-21	Release version
2020-05-08	General revision
2021-02-02	General revision 9.2 Change of component name of „sample dilution buffer“ into corrected name „sample buffer“

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321