

# AFLACARD TOTAL

Product Code: P38

Qualitative screening test for the detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2.  
For *in vitro* use only.

P38/V15/16.12.15

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



# Contents

	Page
Test Principle.....	3
Kit Components.....	3
Reagents Not Provided.....	3
Accessory Products.....	3
Recommended Methods and Application Notes.....	4
Hazards.....	4
Decontamination.....	4
Storage & Shelf Life.....	4
Sampling.....	4
Sample Preparation.....	5
• Cereal and Nuts.....	5
• Spices.....	6
Method.....	7
Reading the Test Results.....	7
Notes.....	7
Quality.....	8
Technical Support.....	8
Warranty.....	8

## Test Principle

The kit is based on monoclonal antibody technology which has the advantage of being highly specific and sensitive while the test format is rapid and simple to perform. The screening procedure is intended to serve as an indicator of the presence of toxins at various screening levels according to international legislation.

The toxins are extracted from the sample, filtered and passed through a clean-up column before being diluted and applied to the card. The conjugate is applied to the membrane and unbound conjugate is then removed by washing. A colourless substrate is added and the card is incubated for five minutes. Finally a stop solution is applied to the membrane. A purple spot must appear at the control site to indicate that the test is valid. A purple spot at the sample site shows that the contamination is less than the cut off value of the card. No colour at the sample site indicates contamination at a higher level than the cut off of the card.

The assay takes approximately 10 minutes to perform.

## Kit Components

- 10 Cards (20 Determinations)
- 20 Clean-Up Columns
- 20 Filtrate Collection Tubes
- 20 Graduated Dilution Tubes
- 20 x 3 ml of Sample Diluent Buffer
- 2.5 ml of Ready-to-use Conjugate (red label)
- 4 ml of Wash Buffer (green label)
- 4 ml of Substrate (blue label)
- 4 ml of Stop Solution (yellow label)

## Reagents Not Provided

- Distilled / Deionised Water (suitable for use with HPLC, e.g. MilliQ)
- Methanol

## Accessory Products

- Whatman No. 113 or No. 4 Filter Paper

## Recommended Methods and Application Notes

Methods are available for all matrices covered by legislation as well as additional commodities. Deviation from the methods described in our Instructions For Use and Application Notes may not result in optimum results. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

## **Hazards**

Mycotoxins are very hazardous substances. Only laboratories equipped to handle toxic materials and solvents should perform analyses. Suitable protective clothing, including gloves, safety glasses and lab coats should be worn throughout the analysis.

Flammable solvents should be stored in an explosion-proof cabinet. Use a chemical hood and protective equipment as applicable.

Contact your local R-Biopharm distributor for a Material Safety Data Sheet for further information if required.

## **Decontamination**

Prior to disposal, excess standard solutions should be treated with at least one-tenth their volume of 5 % sodium hypochlorite. Labware and contaminated waste should be immersed in 5 % sodium hypochlorite solution for 30 minutes followed by the addition of 5 % acetone for 30 minutes. Flush with copious amounts of water before disposal. After decontamination labware should be thoroughly washed. Incinerate waste if regulations permit.

## **Storage & Shelf Life**

The cards have an expiry of 10 months from date of manufacture if stored at 2 - 8 °C. Do not freeze.

## **Sampling**

A representative sample should be obtained by following one of the officially recognised sampling procedures. It is recommended that a minimum of 1 kg of representative sample is finely ground and a portion (10 - 50 g dependent on method used) of this is removed and extracted.

## Sample Preparation

### • Cereal and Nuts

This method has been tested on a number of commodities including wheat, barley, maize, pistachio nuts, peanuts, almonds, Brazil nuts, hazelnuts and macadamia nuts.

1. Weigh 50 g of ground sample into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 100 ml of 80 % methanol and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Pass 5 ml of the filtrate through the solid phase clean-up column by applying pressure with the plunger and collect the cleaned-up filtrate in a filtrate collection tube. If the cleaned-up filtrate is clear it is ready for analysis. If it is cloudy it should be passed through the same clean-up column again before analysis.
5. Dependent on the screening level required add the appropriate volume of filtrate to a dilution tube containing the correct volume of 80 % methanol according to the table below.

Screening Level	Volume of Filtrate	Volume of 80 % Methanol
2 ppb	1 ml	0 ml
4 ppb	1 ml	1 ml
5 ppb	1 ml	1.5 ml
8 ppb	1 ml	3 ml
10 ppb	1 ml	4 ml
12 ppb	1 ml	5 ml
15 ppb	1 ml	6.5 ml
20 ppb	1 ml	9 ml
30 ppb	0.5 ml	7 ml

6. Add 1 ml of diluted filtrate to one of the vials containing 3 ml of sample diluent buffer.
7. The cleaned up solution is now ready for analysis. Please refer to Method section.

## Sample Preparation

### • Spices

This method has been tested on a number of spices including paprika, turmeric, black pepper, white pepper, nutmeg and chilli powder.

1. Weigh 50 g of ground sample into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 100 ml of 80 % methanol and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the extract through a Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dependent on the screening level required add the appropriate volume of filtrate to a dilution tube containing the correct volume of 80 % methanol according to the table below.

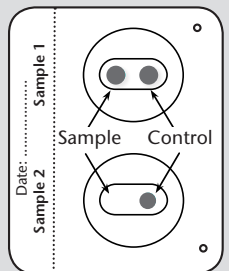
Screening Level	Volume of Filtrate	Volume of 80 % Methanol
2 ppb	1 ml	0 ml
4 ppb	1 ml	1 ml
5 ppb	1 ml	1.5 ml
8 ppb	1 ml	3 ml
10 ppb	1 ml	4 ml
12 ppb	1 ml	5 ml
15 ppb	1 ml	6.5 ml
20 ppb	1 ml	9 ml
30 ppb	0.5 ml	7 ml

5. Add 1 ml of the diluted filtrate to one of the vials containing 3 ml of sample diluent buffer.
6. Pass the contents of the vial through the solid phase clean-up column by applying pressure with the plunger and collect the cleaned-up filtrate in a filtrate collection tube. If the cleaned-up filtrate is clear it is ready for analysis. If it is cloudy it should be passed through the same clean-up column again before analysis.
7. The cleaned up solution is now ready for analysis. Please refer to Method section.

## Method

1. Remove the kit from the refrigerator and leave at room temperature for a minimum of 30 minutes before using the test.
2. Apply 500 µl of cleaned sample onto the port and let it pass through the membrane. This should take no more than 5 minutes.
3. Once the sample has passed through the membrane apply 100 µl of ready-to-use conjugate (red label) and let it pass through the membrane.
4. Once the conjugate has passed through the membrane apply 100 µl of wash buffer (green label). Allow the wash buffer to pass through the membrane and wipe around the port with a paper tissue.
5. Apply 100 µl of substrate (blue label) to the membrane and allow the colour to develop for 5 minutes (start the timer when the substrate is added).
6. After the required incubation apply 100 µl of stop solution (yellow label) and read results immediately after the stop solution has passed through the membrane.

## Reading the Test Results

	<b>Negative Result</b>	The sample should be considered negative (below the cut-off point) when the sample and the control spot both have a clearly visible colour development.
	<b>Positive Result</b>	The sample should be considered positive (above the cut-off point) when the sample spot fails to develop a detectable colour.

The control spot must develop a clearly visible purple colour in order to have a valid test result. The colour in the sample and the control spot does not need to be of the same intensity. If doubt arises regarding the presence of a spot it is advised to hold the card at arm's length (against a dark background). If the spot can be clearly seen then it can be considered as being present.

## Notes

- The unused card has two light blue coloured spots on each port which will disappear during the course of the assay. Ensure these are visible before starting the analysis. Note: these may be faint in appearance.
- Remember: It is possible to analyse two samples on one card, one sample per port. Each port has its own internal control.
- The second port must be used within 8 hours of the first port.
- Do not use reagents from one batch number in conjunction with reagents from a different batch. Do not substitute reagents from other manufacturers.
- Always ensure that there are no air bubbles in the substrate drops.
- Use of incubation times other than those specified may give inaccurate results.
- Always allow reagents to be completely absorbed before adding the next reagent.

## Quality

RBR products are developed, manufactured, tested and dispatched under an ISO 9001 and ISO 13485 registered Quality Management System, guaranteeing a consistent product, which always meets our performance specifications. Our products have been used in many collaborative studies to develop standard European and International Methods and are widely used by key institutions, food companies and government laboratories. Customer references for RBR products are available on request.

## Technical Support

RBR understand that from time to time users of our products may need assistance or advice. Therefore, we are pleased to offer the following services to our customers:

- Analysis of problem samples.
- Application notes for difficult samples.
- References from the RBR library.
- Installation and support of the KOBRA® CELL.
- Advice on detection parameters.
- Advice on preparation and handling of standards.
- Updates on legislation, sampling and other news by e-mail.
- Provision of spiked samples.

Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

## Warranty

R-Biopharm Rhône Ltd makes no warranty of any kind, express or implied, except that all products made by R-Biopharm Rhône Ltd are made with materials of suitable quality. If any materials are defective, R-Biopharm Rhône Ltd will provide a replacement product. The user assumes all risk and liability resulting from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products and procedures. R-Biopharm Rhône Ltd shall not be liable for any damages, including special or consequential damages, loss or expense arising directly or indirectly from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products or procedures.



# AFLACARD TOTAL

Art. Nr.: RBRP38

Testkarte zum qualitativen Nachweis von Gesamtaflatoxin.  
Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Inhalt	Seite
Testprinzip .....	10
Inhalt des Kits .....	10
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien .....	10
Zubehörprodukte .....	10
Empfohlene Methoden und Applikationen .....	10
Gefahren .....	11
Dekontamination .....	11
Lagerung und Haltbarkeit .....	11
Probennahme .....	11
Vorbereitung der Probe .....	12
• Getreide und Nüsse .....	12
• Gewürze .....	13
Methode .....	14
Auswertung der Testergebnisse .....	14
Hinweise .....	14
Qualität .....	15
Technische Unterstützung .....	15
Garantie .....	15

## Testprinzip

Das Kit basiert auf einer monoklonalen Antikörpertechnologie, die den Vorteil hat, hochspezifisch und sensitiv zu sein. Der Test ist zudem schnell und einfach durchzuführen. Das Screening-Verfahren dient zur Ermittlung des Vorkommens von Toxinen bei verschiedenen Screening-Leveln gemäß internationaler Gesetzgebung.

Die Toxine werden aus der Probe extrahiert, filtriert und über eine Clean-up-Säule gegeben, bevor sie verdünnt und auf die Karte aufgetragen werden. Das Konjugat wird auf die Membran aufgetragen und ungebundenes Konjugat wird anschließend durch einen Waschschrift wieder entfernt. Nach der Aufgabe eines farblosen Substrats wird die Karte fünf Minuten lang inkubiert. Abschließend wird eine Stopplösung auf die Membran aufgetragen. Im Kontrollfeld muss ein lilafarbener Punkt erscheinen, der die Funktionstüchtigkeit der Testkarte bestätigt. Ein lilafarbener Punkt im Probenfeld zeigt an, dass die Kontamination geringer als der Cut-off-Wert der Karte ist. Keine Farbe im Probenfeld bedeutet, dass der Toxingehalt über dem Cut-off-Wert der Karte liegt.

Die Analyse dauert insgesamt ca. 10 Minuten.

## Inhalt des Kits

- 10 Karten mit je 20 Bestimmungen
- 20 Clean-up-Säulen
- 20 Filter Röhrchen
- 20 graduierte Verdünnungsröhrchen
- 20 Röhrchen mit 3ml Probenverdünnungspuffer
- 1 Röhrchen mit 2,5 ml gebrauchsfertiges Konjugat (rotes Etikett)
- 1 Röhrchen mit 4 ml Waschpuffer (grünes Etikett)
- 1 Röhrchen mit 4ml Substrat (blaues Etikett)
- 1 Röhrchen mit 4ml Stopplösung (gelbes Etikett)

## Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die HPLC, z. B. MilliQ)
- Methanol

## Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier

## Empfohlene Methoden und Applikationen

Methoden sind für alle Matrices verfügbar, die von der Gesetzgebung abgedeckt sind. Gleichzeitig bietet R-Biopharm AG auch zusätzliche Methoden für andere Probenmatrices an. Das Abweichen von Methoden welche in unseren TKBs beschrieben werden, kann zu nicht optimalen Ergebnissen führen. Bitte wenden Sie sich an Ihren regionalen R-Biopharm Distributor, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

## **Gefahren**

Mykotoxine sind sehr gefährliche Stoffe. Analysen sollten nur von Laboren durchgeführt werden, die über die entsprechende Ausrüstung zur Handhabung toxischer Substanzen und Lösungsmittel verfügen. Während der Analyse ist geeignete Schutzkleidung einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosions sicheren Schrank aufbewahrt werden. Je nach Anwendung ist eine Abdeckhaube und Schutzausrüstung zu verwenden.

Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG, wenn Sie ein Sicherheitsdatenblatt erhalten möchten.

## **Dekontamination**

Überschüssige Standardlösungen müssen vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumens mit einer 5 %igen Natriumhypochloritlösung behandelt werden. Laborzubehör und kontaminierter Abfall sollte 30 Minuten lang in eine 5 % Natriumhypochloritlösung eingetaucht werden, gefolgt von der Zugabe einer 5 % Acetonlösung für 30 Minuten. Vor der Entsorgung mit unbedingt mit reichlich Wasser nachspülen. Laborzubehör sollte nach einer Dekontamination gründlich gewaschen werden. Abfall verbrennen, wenn die Vorschriften es zulassen.

## **Lagerung und Haltbarkeit**

Die Karten haben eine Mindesthaltbarkeit von 10 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Nicht einfrieren.

## **Probennahme**

Eine repräsentative Probe sollte durch Befolgung einer der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren entnommen werden. Es wird empfohlen, dass mindestens 1 kg einer repräsentativen Probe fein gemahlen und ein Teil (10 - 50 g abhängig von der verwendeten Methode) hiervon abgenommen und extrahiert wird.

## **Verfügbare Applikationen**

Methoden sind für alle Matrices verfügbar, die von der Gesetzgebung abgedeckt sind. Gleichzeitig bietet R-Biopharm AG auch zusätzliche Methoden für andere Probenmatrices an. Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

## Vorbereitung der Probe

### • Getreide und Nüsse

Diese Methode wurde an verschiedenen Getreidesorten und Nüssen, darunter Weizen, Gerste, Mais, Pistazien, Erdnüsse, Mandeln, Paranüsse, Haselnüsse und Macadamia-Nüsse, getestet.

1. 50 g gemahlene Probe in einen lösungsmittelresistenten Becher (Kapazität 1 L) einwiegen.
2. 100 ml 80 % Methanol zugeben und 2 min bei hoher Geschwindigkeit mischen.
3. Die Probe filtrieren (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder bei 4.000 U/min 10 min zentrifugieren.
4. 5 ml Filtrat über die SPE-Clean-up-Säule geben, mit dem Kolben Druck ausüben und das gereinigte Filtrat in einem Filtrat-Sammelröhrchen auffangen (wenn das gereinigte Filtrat klar ist, kann es direkt im Test eingesetzt werden; wenn es noch trüb ist, die Säulenreinigung wiederholen).
5. Je nach erforderlichem Screening-Level das entsprechende Filtratvolumen in ein Verdünnungsröhrchen geben, dass das korrekte Volumen von 80 % Methanol entsprechend der nachstehenden Tabelle enthält.

Screening-Level	Filtratvolumen	Volumen von 80 % Methanol
2 ppb	1 ml	0 ml
4 ppb	1 ml	1 ml
5 ppb	1 ml	1.5 ml
8 ppb	1 ml	3 ml
10 ppb	1 ml	4 ml
12 ppb	1 ml	5 ml
15 ppb	1 ml	6.5 ml
20 ppb	1 ml	9 ml
30 ppb	0.5 ml	7 ml

6. 1 ml verdünntes Filtrat in eines der Röhrchen geben, das 3 ml Probenverdünnungspuffer enthält.
7. Die Lösung im Test einsetzen (siehe Abschnitt „Methode“ für weitere Informationen).

## Vorbereitung der Probe

### • Gewürze

Diese Methode wurde an verschiedenen Gewürzen, darunter Paprika, Kurkuma, schwarzer Pfeffer, weißer Pfeffer, Muskatnuss und Chilipulver, getestet.

1. 50 g gemahlene Probe in einen lösungsmittelresistenten Becher (Kapazität 1 L) einwiegen.
2. 100 ml 80 % Methanol zugeben und 2 min bei hoher Geschwindigkeit mischen.
3. Die Probe filtrieren (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder bei 4.000 U/min 10 min zentrifugieren.
4. Je nach erforderlichem Screening-Level das entsprechende Filtratvolumen in ein Verdünnungsröhrchen geben, dass das korrekte Volumen von 80 % Methanol entsprechend der nachstehenden Tabelle enthält.

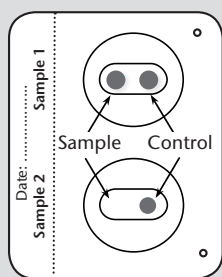
Screening-Level	Filtratvolumen	Volumen von 80 % Methanol
2 ppb	1 ml	0 ml
4 ppb	1 ml	1 ml
5 ppb	1 ml	1.5 ml
8 ppb	1 ml	3 ml
10 ppb	1 ml	4 ml
12 ppb	1 ml	5 ml
15 ppb	1 ml	6.5 ml
20 ppb	1 ml	9 ml
30 ppb	0.5 ml	7 ml

5. 1 ml verdünntes Filtrat in eines der Röhrchen geben, das 3 ml Probenverdünnungspuffer enthält.
6. Den Inhalt des Röhrchens über die SPE-Clean-up-Säule geben, mit dem Kolben Druck ausüben und das gereinigte Filtrat in einem Filtrat-Sammelröhrchen auffangen (wenn das gereinigte Filtrat klar ist, kann es direkt im Test eingesetzt werden; wenn es noch trüb ist, die Säulenreinigung wiederholen).
7. Die Lösung im Test einsetzen (siehe Abschnitt „Methode“ für weitere Informationen).

## Methode

1. Das Kit aus dem Kühlschrank nehmen und mind. 30 min vor Verwendung des Tests bei Raumtemperatur stehen lassen.
2. 500 µl der gereinigten Probe auf das Probenfeld auftragen und durch die Membran laufen lassen. Dies sollte nicht mehr als 5 min dauern.
3. Sobald die Probe durch die Membran gelaufen ist, 100 µl rekonstituiertes Konjugat (rotes Etikett) auftragen und durch die Membran laufen lassen.
4. Sobald das Konjugat durch die Membran gelaufen ist, 100 µl Waschpuffer (grünes Etikett) auftragen und durch die Membran laufen lassen; mit einem Papiertuch vorsichtig um den Rand des Probenfelds wischen.
5. 100 µl Substrat (blaues Etikett) auf die Membran auftragen und die Farbe 5 min entwickeln lassen (Zeitschaltuhr starten, wenn das Substrat zugegeben wurde).
6. Nach 5 min 100 µl Stopplösung (gelbes Etikett) zugeben und Ergebnisse sofort ablesen, nachdem die Stopplösung durch die Membran gelaufen ist.

## Auswertung der Testergebnisse



Negatives  
Ergebnis

Die Probe ist negativ (< dem Cut-off-Wert), wenn das Proben- und Kontrollfeld eine klar sichtbare Farbentwicklung zeigen.

Positives  
Ergebnis

Die Probe ist positiv (> dem Cut-off-Wert), wenn sich im Probenfeld keine erkennbare Farbe entwickelt.

Das Kontrollfeld muss eine klar sichtbare lila Farbe entwickeln, um ein gültiges Testergebnis zu bestätigen. Die Farbe im Proben- und Kontrollfeld müssen nicht von der gleichen Intensität sein. Falls Zweifel auftreten ob eine Farbentwicklung stattgefunden hat, empfehlen wir die Karte um eine Armlänge gegen einen dunklen Hintergrund zu halten um das Ergebnis deutlicher zu machen.

## Hinweise

- Die unbenutzte Karte hat in jedem der zwei Testareale zwei hellblaue Punkte, die im Verlauf der Analyse verschwinden. Vergewissern Sie sich, dass Sie diese sehen, bevor Sie mit der Analyse beginnen.
- Bitte denken Sie daran, dass es möglich ist, zwei Proben auf einer Testkarte (eine Probe pro Areal) zu analysieren. Jedes Testareal hat eine eigene interne Kontrolle.
- Das zweite Testareal muss innerhalb von 8 h nach Gebrauch des ersten Areals verwendet werden.
- Keine Reagenzien von einer Chargen-Nummer mit Reagenzien von einer anderen Charge verwenden. Nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern ersetzen.
- Immer darauf achten, dass in den Substrattropfen keine Luftblasen sind.
- Die Verwendung anderer als der angegebenen Inkubationszeiten kann ungenaue Ergebnisse liefern.
- Reagenzien immer vollständig adsorbieren lassen, bevor das nächste Reagenz zugegeben wird.

## Qualität

RBR-Produkte werden unter einem ISO 9001- und ISO 13485-registrierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, hergestellt, getestet und ausgeliefert, wodurch ein konsistentes Produkt gewährleistet wird, das stets unsere Leistungsspezifikationen erfüllt. Unsere Produkte wurden in vielen kollaborativen Studien eingesetzt, um europäische und internationale Standardmethoden zu entwickeln, und werden von vielen Schlüsselinstitutionen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Laboren verwendet. Kundenreferenzen für RBR-Produkte sind auf Anfrage erhältlich.

## Technische Unterstützung

RBR versteht, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Hilfe oder Beratung benötigen. Wir freuen uns daher, unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen anbieten zu können:

- Analyse problematischer Proben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Referenzen aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Unterstützung der KOBRA® CELL.
- Beratung zu Detektionsparametern.
- Beratung zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Aktuelle Informationen zur Gesetzgebung, Probenentnahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung gespikter Proben.

Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

## Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd gibt keine Garantie gleich welcher Art, weder ausdrücklich noch stillschweigend, mit Ausnahme der, dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte mit Materialien von geeigneter Qualität hergestellt sind. Sollten Materialien fehlerhaft sein, stellt R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt bereit. Der Benutzer übernimmt sämtliche Risiken und Haftung, die sich aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten und Verfahren ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd haftet für keinerlei Schäden, einschließlich spezieller oder Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die direkt oder indirekt aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten oder Verfahren entstehen.

