

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin Total**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Aflatoxinen

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
aflatoxins

Art. No.: R4701

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
[orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA<sup>®</sup> and RIDASCREEN<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Aflatoxin Total (Art. Nr.: R4701) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxinen in Getreide und Futtermitteln.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten.

Der Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Getreide und Futtermittel: extrahieren, filtrieren und verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)  
Getreide und Futtermittel: ..... ca. 30 min  
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

Nachweisgrenze: Getreide und Futtermittel: ..... ca. 1,75 ppb  
(bezogen auf die Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: ca. 85 %  
(bezogen auf die mittlere Variationskoeffizient: 15 %  
Standardsubstanz)

Spezifität: Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin Total wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen im Puffersystem ermittelt.

Aflatoxin B<sub>1</sub>..... 100 %  
Aflatoxin B<sub>2</sub>.....ca. 48 %  
Aflatoxin G<sub>1</sub> .....ca. 75 %  
Aflatoxin G<sub>2</sub> .....ca. 18 %

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Aflatoxin Total ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxinen in Getreide und Futtermitteln.

## 2. Allgemeines

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*. Diese Pilzarten kommen in feuchten tropischen Gebieten vor und die Kontamination der pflanzlichen Lebensmittel erfolgt in den Anbauländern. Aflatoxine gehören zu den stärksten natürlich vorkommenden kanzerogenen Substanzen.

Aflatoxin B<sub>1</sub>, das fast immer gemeinsam mit Aflatoxin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> vorkommt, ist das Aflatoxin mit der größten toxischen Bedeutung. Man findet es vor allem in Mais, Erdnüssen, Paranüssen, Baumwollsamensamen und Pistazien.

Aufgrund der Toxizität dieser Mykotoxine gelten EU-weite Höchstmengen von 2 ppb für Aflatoxin B<sub>1</sub> und 4 ppb für Gesamtaflatoxin in Getreide.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probenlösungen, enzymmarkiertes Aflatoxin (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin konkurrieren um die Aflatoxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes enzymmarkiertes Aflatoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat-/Chromogenlösung. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um.

Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin-Konzentration in der Probe.

## 4. Packungsinhalt

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

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)  
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 6 x Aflatoxin-Standards (je 1,3 ml)  
0 ppb (Nullstandard), 0,05 ppb, 0,15 ppb, 0,45 ppb, 1,35 ppb, 4,05 ppb  
Aflatoxin B<sub>1</sub> in Methanol/Wasser, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (6 ml) .....roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes Aflatoxin B<sub>1</sub>  
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Aflatoxin-Antikörper (6 ml) .....schwarzer Verschluss  
monoklonal, gebrauchsfertig
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) .....brauner Verschluss  
Substrat-/Chromogenlösung, rötlich gefärbt  
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) ..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffersalz (Waschpuffer)  
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH 7,4)  
enthält 0,05 % Tween 20

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Labor- oder Getreidemühle
- Schüttler
- Trichter und Filterpapier
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl- und 200 - 1000 µl-Mikropipetten

### 5.2. Reagenzien:

- Methanol
- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen
- destilliertes Wasser

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten Aflatoxin B<sub>1</sub>, 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).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

## 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.

Die rötlich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

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

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlichen Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1. Getreide und Futtermittel

Eine repräsentative Probe mit einer Labormühle zerkleinern oder zermahlen und gut durchmischen.

- 2 g Probe in ein Glasgefäß mit Schraubverschluss einwiegen
- 10 ml Methanol / Wasser (70/30; v/v) hinzufügen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Schüttler mischen
- den Extrakt über einen Papierfaltenfilter filtrieren
- 100 µl des Filtrats mit 600 µl dest. Wasser verdünnen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### **Anmerkung:**

**Werden Aflatoxingehalte von > 120 ppb erwartet, ist eine weitere Verdünnung notwendig. Hierzu muss dest. Wasser mit 10 % Methanol verwendet werden. (z. B. 9 ml dest. Wasser + 1 ml Methanol (100 %)). Alle Proben müssen in dest. Wasser mit 10%igem Methanolanteil eingesetzt werden!**

Das Filtrat kann im Kühlschrank (2 - 8 °C) zwei Wochen und im Gefrierschrank (-20 °C) zwei Monate aufbewahrt werden. Es sollten Glasgefäße verwendet werden (Braunglas) und die Lagerung sollte lichtgeschützt erfolgen.

Es können außer Getreide und Futtermitteln auch andere Lebensmittelproben eingesetzt werden. Unsere Erfahrungen haben allerdings gezeigt, dass z. B. Nüsse, Kräuter, Gewürze und Teeblätter ohne den Einsatz von Immunaффinitätssäulen für die Probenvorbereitung zu hohe Hintergrundwerte zeigen. Fordern Sie deshalb bitte für solche Proben die Produktinformation für die RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) an.

Auf Anfrage ist eine Applikation für Rohkaffee in Kombination mit RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) erhältlich.

**Bitte beachten Sie, dass bei den Probenaufarbeitungen mit RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) die entsprechenden Eluate mit dest. Wasser 1:10 verdünnt werden müssen. Für alle weiteren Verdünnungen ist es unbedingt erforderlich dest. Wasser mit 10 % Methanol zu verwenden.**

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer 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 (10fach Konzentrat) ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

### 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 Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper-Lösung 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 jeweils mit 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

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-Konzentration [ng/kg] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Aflatoxin-Konzentration in ng/kg zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt folgender Verdünnungsfaktor:

Getreide und Futtermittel ..... 35

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin Total

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin Total (Art. No.: R4701) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins in cereals and feed.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: cereals and feed: extraction, filtration and dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)  
cereals and feed ..... approx. 30 min  
test implementation (incubation time) ..... 45 min

Detection limit: cereals and feed: ..... approx. 1.75 ppb  
(corresponding to the standard substance)

Recovery rate: approx. 85 %  
(corresponding to the standard substance) coefficient of variation: 15 %

Cross reactivity: The specificity of the RIDASCREEN<sup>®</sup> Aflatoxin Total test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins in buffer system..

Aflatoxin B<sub>1</sub> ..... 100 %  
Aflatoxin B<sub>2</sub> ..... approx. 48 %  
Aflatoxin G<sub>1</sub> ..... approx. 75 %  
Aflatoxin G<sub>2</sub> ..... approx. 18 %

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Aflatoxin Total is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins in cereals and feed.

## 2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*. These fungi occur in humid tropical areas and the contamination of vegetable food takes place in the cultivable countries. Aflatoxins belong to the strongest natural occurring cancerogenic substances.

Aflatoxin B<sub>1</sub> which is mostly found together with the aflatoxins B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> is the one with the highest toxic importance. It is found above all in corn, peanuts, brazil nuts, cotton seed and pistachios.

Depending on the toxicity of these mycotoxins in the countries of the EU equal limits are valid for aflatoxins, 2 ppb for aflatoxin B<sub>1</sub> and 4 ppb for all aflatoxins in total in cereals.

## 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 antibodies. Standards or the sample solutions, aflatoxin-enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free and enzyme conjugated aflatoxin compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen solution 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; the absorption is inversely proportional to the aflatoxin concentration in the sample.

## 4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 wells each)  
coated with capture antibodies
- 6 x Aflatoxin standards (1.3 ml each)  
0 ppb (zero standard), 0.05 ppb, 0.15 ppb, 0.45 ppb, 1.35 ppb, 4.05 ppb  
aflatoxin B<sub>1</sub> methanol/water, ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml) .....red cap  
peroxidase conjugated aflatoxin B<sub>1</sub>  
ready to use
- 1 x Anti-aflatoxin antibodies (6 ml)..... black cap  
monoclonal, ready to use
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) ..... brown cap  
(Substrate/chromogen solution), stained red  
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) .....yellow cap  
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer salt (washing buffer)  
for preparation of a 10 mM Phosphate Buffer (pH 7.4)  
contains 0.05 % Tween 20

## 5. Materials required but not provided

### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- grinder (mill)
- shaker
- funnel and paper filter
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl- and 200 - 1000 µl-micropipettes

### 5.2. Reagents:

- methanol
- 70 % methanol solution: mix 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled water
- distilled water

## 6. Warnings and precautions for the users

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

The standard solutions contain aflatoxin B<sub>1</sub>, 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).

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

## 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 solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

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

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for the zero standard

## 9. Preparation of Samples

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

### 9.1. Cereals and feed

A representative sample is triturated and thoroughly mixed in a mixer.

- weigh 2 g of the ground sample into a screw cap glass vial
- add 10 ml of methanol / distilled water (70/30; v/v) and mix for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) using a shaker
- filter entire extract by using a paper filter
- dilute 100 µl of the filtrate with 600 µl distilled water
- employ 50 µl per well in the assay

#### Remark:

**If the aflatoxin concentration is expected to exceed 120 ppb, the further sample dilution has to be done in distilled water containing 10 % methanol (i.e. 9 ml distilled water + 1 ml methanol (100 %)). Any kind of sample being used in the assay has to be provided in distilled water with 10 % methanol.**

The filtrate can be stored at 2 - 8 °C for two weeks and at -20 °C for two months. Store well sealed in glass vials (brown-glass) and protected against light.

It is also possible to employ other food samples, but our experience shows that for example nuts, herbs, spices and tea leaves create too high background effects without immunoaffinity columns for sample preparation. For these food samples please order the product information of the RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) by your local distributor.

An application note for green coffee in combination with RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) is available on request. Please contact your local distributor.

**Please note, that for the sample preparations with RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column (R5001 / R5002) the respective eluates have to be diluted 1:10 with distilled water. For all further dilutions the use of distilled water with 10 % methanol is absolutely essential.**

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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 buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

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

## 10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of microtiter wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the enzyme conjugate to each well.
4. Add 50 µl of the antibody solution to each well. 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) 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.
7. Add 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 30 minutes after addition of stop solution.

## 11. Results

A special software, the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

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 concentration [ng/kg].

In order to obtain the aflatoxin concentration in 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 factor is as follows:

cereals and feed ..... 35

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.