



## Arbeitsanleitung

Aflatoxin M<sub>1</sub>

96 Tests

Enzymimmunoassay  
zur quantitativen  
Bestimmung von  
Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milch und  
Milchprodukten

Best.-Nr.: AM1-E01

Version: 20. Juli 2023

**Gold Standard Diagnostics  
Kassel GmbH**

Otto-Hahn-Str. 16  
D-34123 Kassel

Tel.: +49 (0) 561 491742-0  
Fax: +49 (0) 561 491742-20

[info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com)

[www.kassel.goldstandarddiagnostics.com](http://www.kassel.goldstandarddiagnostics.com)

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

### 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 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* produziert, während es sich bei allen anderen Aflatoxinen um Metabolite dieser vier handelt. Die Metabolite werden von Menschen, Tieren, Mikroorganismen oder durch Umwelteinflüsse gebildet.

Aflatoxin M<sub>1</sub> war der erste Metabolit von Aflatoxin B<sub>1</sub>, der eindeutig von Allcroft und Carnaghan im Jahre 1963 in der Milch von Kühen nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde dieses erste Derivat Aflatoxin M<sub>1</sub> (=Milch) genannt. Wie weitere Untersuchungen ergaben, scheiden aber auch andere Säugetiere Aflatoxin M<sub>1</sub> in der Milch, im Kot und im Urin aus. Kontaminationen von Milch und Milchprodukten können für den Menschen schädlich sein, da Aflatoxin M<sub>1</sub> in seiner akuten Hepatotoxizität dem Aflatoxin B<sub>1</sub> vergleichbar ist. Aflatoxin M<sub>1</sub> ist lediglich weniger karzinogen.

Um den Menschen vor aflatoxinbedingten Krankheiten zu schützen, bedarf es neben geeigneten Lagerbedingungen einer qualitativen und quantitativen Kontrolle gefährdeter Lebensmittel. Der **Gold Standard Diagnostics Aflatoxin M<sub>1</sub> Test** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milch und Milchprodukten nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 140 Minuten im Doppelansatz bestimmt werden.

### Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Aflatoxin M<sub>1</sub> Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Aflatoxin-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Aflatoxin M<sub>1</sub> enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Aflatoxin M<sub>1</sub>-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Competition zwischen festphasengebundenem Aflatoxin und Aflatoxin M<sub>1</sub> 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 M<sub>1</sub>-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 Zu-

gabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Aflatoxin M<sub>1</sub>-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

### Vorsichtsmaßnahmen

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

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipetenspitze 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.).

### 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 mög-

liche 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!

### 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 M<sub>1</sub>-Standards: 6 Fläschchen mit je 0,5 mL (0; 100; 500; 1000; 5000; 10000 pg/mL) als 10x-Konzentrat in Methanol.



Gebrauchslösung: 1+9 mit Proben/Standard-Verdüner verdünnen.

**Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die 10x-konzentrierten Standards.**

3. Anti-Aflatoxin M<sub>1</sub> 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 (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Proben/Standard-Verdüner (PBS), 60 mL, rot eingefärbt, 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.

### Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

#### Geräte

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

#### Reagenzien

- Methanol
- Hexan
- Bidestilliertes Wasser

### Probenvorbereitung

#### Milch

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

#### Milchpulver

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

#### Käse

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

#### Joghurt

- 1 g Probe wird mit 5 mL Methanol gemischt.

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

Alternativ können für die Aufreinigung Immunaффinitätssäulen verwendet werden (Best.-Nr.: AFM-A01). Werden solche Säulen eingesetzt, muss darauf geachtet werden, dass die im **Gold Standard Diagnostics Aflatoxin M<sub>1</sub> ELISA** pipettierte Lösung nicht mehr als 5% organisches Lösungsmittel (Methanol, Aceton) enthält. Das Eluat muss entsprechend in Proben/Standard-Verdünner verdünnt werden.

### 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.

### 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 M<sub>1</sub> 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 (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

### 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 M<sub>1</sub> 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 für Milch(pulver) 1, für Käse 25 und für Joghurt 5.

### Typische Standardkurve

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

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

## Technische Daten

### Empfindlichkeit

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

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

### Wiederfindung

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

### Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Aflatoxin M<sub>1</sub>-Tests wurde mit 6.4 - 7.7% bestimmt.

### Kreuzreaktionen relativ zu Aflatoxin M<sub>1</sub> (=100%)

Aflatoxin B <sub>1</sub>	57%
Aflatoxin G <sub>1</sub>	6%
Aflatoxin B <sub>2</sub>	39%
Aflatoxin G <sub>2</sub>	21%

## Literatur

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