

r-biopharm®



RIDASCREEN® Fumonisin ECO

REF R3411

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Fumonisin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of fumonisin

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



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

Auftragsannahme

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

R-Biopharm AG switchboard

Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-mail: orders@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® Fumonisin ECO (R3411) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Fumonisin in Mais und Futtermitteln. (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

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

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 10 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	Mais ca. 0,03 mg/kg (ppm) Futtermittel..... ca. 0,04 mg/kg (ppm)
Bestimmungsgrenze:	Mais ca. 0,04 mg/kg (ppm)
Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	in natürlich kontaminierten Proben (Ø) Mais ca. 113 % Futtermittel..... ca. 108 %
Spezifität:	Fumonisin B1 (Standardsubstanz).....ca. 100 % Fumonisin B2.....ca. 50 % Fumonisin B3.....ca. 70 %

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Fumonisin ECO 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Fumonisin

RIDASCREEN®FAST Fumonisin (Art. Nr. R5602)
RIDA®QUICK Fumonisin RQS ECO (Art. Nr. R5606)
Trilogy® Zertifiziertes Referenzmaterial (ISO 17034)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Fumonisin ECO ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Fumonisin-Kontaminationen in Mais und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Fumonisine sind karzinogene, neuro-, hepato- und pneumotoxische Stoffwechselprodukte von *Fusarium moniliforme*, einer wirtsspezifisch auf Mais wachsenden pathogenen Pilzart.

Die zur Auslösung toxischer Wirkungen erforderlichen Dosen an Fumonisin unterliegen starken tierartlichen Unterschieden. Bei Pferden wirken bereits Fumonisin-Konzentrationen von ca. 5 - 10 mg/kg (ppm) im Futter neurotoxisch. Bei Schweinen führt die Aufnahme von 4 - 16 mg/kg Körpergewicht zu Leberzirrhose und ab 16 mg/kg Körpergewicht zu pulmonären Ödemen. Hühnerküken und Jungmasthähnchen reagieren erst auf eine hohe Konzentration (ab 75 mg/kg) von Fumonisin im Futter. Rinder scheinen hingegen gegenüber hohen Fumonisin-Konzentrationen relativ unempfindlich zu sein.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fängerantikörpern gegen anti-Fumonisin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Fumonisin (Enzymkonjugat) und anti-Fumonisin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Fumonisin konkurrieren um die Fumonisin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Fumonisin-Antikörper von den immobilisierten Fängerantikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Fumonisin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Hinzugegeben wird Substrat/Chromogen, gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Fumonisin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate M Mikrotiterplatte M	-	Gebrauchsfertig	96 Kavitäten
ECO extractor ECO Extractor	Transparent	Konzentrat 10-fach	120 mL
Standard 1* Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/mL 1,3 mL
Standard 2* Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,025 µg/mL 1,3 mL
Standard 3* Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	0,075 µg/mL 1,3 mL
Standard 4* Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	0,222 µg/mL 1,3 mL
Standard 5* Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	0,666 µg/mL 1,3 mL
Standard 6* Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	2 µg/mL 1,3 mL
Wash buffer salt Tween Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig	7,5 mL
Antibody Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig	7,5 mL
Sample dilution buffer Probenverdünnungspuffer	Natur	Gebrauchsfertig	60 mL
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig	13 mL
Stop solution Stopplösung	Gelb	Gebrauchsfertig	14 mL

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 50, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können die Fumonisin-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Labor-/Getreidemühle, Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messzylinder (Kunststoff oder Glas) 100 ml
- (Horizontal-) Schüttler

- Vortexer
- Zentrifuge (mind. 3.000 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Variable 50 - 100 µl und 1000 µl Mikropipetten
- Optional: 8-Kanalpipette oder Multistepperpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) 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 Fumonisin. Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

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.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, siehe Kapitel 10.2. Testdurchführung) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

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).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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

Die Fumonisin-Standards und das Konjugat 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 das 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 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

9.1 Extraktionspuffer

Für die Extraktion wird der **verdünnte ECO Extractor** benötigt. Der ECO Extractor liegt als 10-fach Konzentrat vor und muss daher vor Gebrauch 1:10 (1 + 9) mit deionisiertem oder dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser).

Der verdünnte ECO Extractor ist eine Woche bei 2 - 8 °C haltbar. Beim Auftreten einer Trübung im verdünnten ECO Extractor (z. B. verursacht durch Kontaminationen) ist dieser zu verwerfen.

9.2 Extraktion für Mais und Futtermittel

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchführen.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahmevorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen (empfohlene Korngröße: 500 µm). Wir empfehlen bei unbekanntenen Proben ein zusätzliches Replikat herzustellen.

Anschließend wie folgt vorgehen:

- 5 g der zerkleinerten, homogenisierten Probe einwiegen und 25 ml verdünnten ECO Extractor *) hinzufügen
- Kurz vortexen bis die Probe vollständig durchnässt ist (ca. 10 s)
- 3 min bei Raumtemperatur kräftig schütteln (z. B. liegend, Horizontal-schüttler 420 rpm)
- Probe zentrifugieren: 3 min / ≥ 3000 g / Raumtemperatur
- Überstand 1:10 (1 + 9) mit Probenverdünnungspuffer verdünnen (z. B. 100 µl Überstand + 900 µl Probenverdünnungspuffer)
(Hinweis: falls vorhanden durch die oberste, fettige/trübe/partikelhaltige Schicht stechen.)
- 50 µl des verdünnten Überstands pro Kavität im Test einsetzen

*) Die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen des ECO Extractors angepasst werden, z. B. 10 g in 50 ml ECO Extractor.

Anmerkung: Der Probenverdünnungsfaktor beträgt hier 1. Bei Proben außerhalb des Messbereiches (> 2 mg/kg (ppm)) wird allerdings eine weitere Verdünnung des bereits verdünnten Überstandes mit Probenverdünnungspuffer empfohlen (z. B. 100 µl verdünnter Überstand + 900 µl Probenverdünnungspuffer). Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor von 10 (1:10 Verdünnung) ist bei der Kalkulation zu berücksichtigen (d. h. die Ergebnisse müssen mit 10 multipliziert werden).

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, dazu bitte das dem Kit beiliegende Puffersalz (siehe Kapitel 4.) benutzen. Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10-fach 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.

Es wird empfohlen das Konjugat, den Antikörper, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

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 Standards bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; jeweils eine neue Pipettenspitze verwenden.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörperlösung 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend

wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).

6. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 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 (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels *Cubic Spline* Funktion erfolgen. Der Verdünnungsfaktor von 50, der sich nach der Probenvorbereitung ergibt, ist bereits in der Software berücksichtigt.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem halblogarithmisch gegen die Fumonisin-Konzentration [µg/ml] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Ermittelte Werte in diesem Bereich sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ “< LoQ“ angegeben werden.

Ein Ergebnis unterhalb des LoD schließt nicht aus, dass eine Mykotoxin-Kontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt. Die

Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend $< \text{LoD (mg/kg)}$ formuliert werden.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450 \text{ nm}}$) $>$ Standard 6 sollten weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden.

13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird außerdem empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür können Mykotoxin-freie und Mykotoxin-haltige Proben verwendet werden.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt[®] / Bolt[™]) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-06-30	Freigabeversion
2022-12-01	Fehlerkorrekturen: <ul style="list-style-type: none">– Kurzinformation: Inkubationszeit von 45 min– 4. Packungsinhalt: Mikrotiterplatte M

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® Fumonisin ECO

Brief information

RIDASCREEN® Fumonisin ECO (R3411) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of fumonisin in corn and feed (see chapter 1. Intended use).

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

Sample preparation: homogenization and extraction

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

Limit of detection: Corn approx. 0.03 mg/kg (ppm)
(depending on matrix) Feed..... approx. 0.04 mg/kg (ppm)

Limit of quantification: Corn.....0.04 mg/kg (ppm)

Recovery rate: in naturally contaminated samples (Ø)
(corresponding to the Standard substance) Corn approx. 113 %
Feed..... approx. 108 %
Further information is contained in the validation report.

Specificity: Fumonisin B1 (standard substance)..... approx. 100 %
Fumonisin B2..... approx. 50 %
Fumonisin B3 approx. 70 %

The specificity of the RIDASCREEN® Fumonisin ECO 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 brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related product and accessories for fumonisin determination

RIDASCREEN®FAST Fumonisin (Art. No. R5602)

RIDA®QUICK Fumonisin RQS ECO (Art. No. R5606)

Trilogy® certified reference material (ISO 17034)

1. Intended use

RIDASCREEN® Fumonisin ECO (R3411) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of fumonisin in corn and feed.

2. General information

Fumonisin is a carcinogenic, neuro-, hepato-, and pneumotoxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, a mold fungus which grows host-specific on corn.

The dose of fumonisin for the release of toxic effects differs significantly depending on the animal species. A concentration of approx. 5 - 10 mg/kg (ppm) fumonisin in feed induces neurotoxic effects in horses. In pigs, the ingestion of 4 - 16 mg/kg body weight may result in liver cirrhosis and more than 16 mg/kg body weight may lead to pulmonary edema. Chickens tolerate higher concentrations of fumonisin in feed, up to 75 mg/kg. Cattle seem to be insensitive to high fumonisin concentrations.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-fumonisin antibodies.

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

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format	Volume
Microtiter plate M	-	Ready to use	96 wells
ECO extractor	Transparent	Concentrate 10fold	120 mL
Standard 1*	White	Ready to use	0 µg/mL 1.3 mL
Standard 2*	White	Ready to use	0.025 µg/mL 1.3 mL
Standard 3*	White	Ready to use	0.075 µg/mL 1.3 mL
Standard 4*	White	Ready to use	0.222 µg/mL 1.3 mL
Standard 5*	White	Ready to use	0.666 µg/mL 1.3 mL
Standard 6*	White	Ready to use	2 µg/mL 1.3 mL
Wash buffer salt Tween		Dissolve the salt	
Conjugate	Red	Ready to use	7.5 mL
Antibody	Black	Ready to use	7.5 mL
Sample dilution buffer	Nature	Ready to use	60 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen (Pro)	Brown	Ready to use	13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 mL

(* The dilution factor 50 for the sample preparation has already been considered. Therefore, the fumonisin concentrations (µg/ml) of samples can be read directly from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Graduated cylinder (plastic or glass) 100 mL
- (Horizontal) shaker
- Vortex mixer
- Centrifuge (at least 3,000 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Variable 50 - 100 µL and 200 - 1000 µL micropipettes

- If necessary: 8-channel or multistep pipette for 100 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

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

The standards contain fumonisin. Particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2.). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

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).

7. Storage instructions

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

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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).

Fumonisin standards and conjugate 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 test implementation
- Value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for zero standard

9. Sample preparation

9.1 Extraction buffer

The **diluted ECO extractor** is required for the extraction. ECO Extractor is available as a 10-fold concentrate and must therefore be diluted 1:10 (1 + 9) with deionized or distilled water before use (e. g. 100 mL concentrate + 900 mL dist. water).

The diluted ECO Extractor has a shelf life of one week at 2 - 8 °C. If turbidity occurs in the diluted ECO Extractor (e.g. caused by contamination), it must be discarded.

9.2 Extraction for corn and feed

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

Bring all reagents and samples to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use and perform the sample preparation at room temperature.

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure (recommended particle size: 500 µm).

Then proceed as follows:

- Weigh 5 g of ground and homogenized sample into a suitable container (e.g. 125 mL bottle) and add 25 mL of diluted ECO extractor *)
- Vortex briefly until the sample is completely soaked (approx. 10 s)

- Shake the sample vigorously for 5 min (manually or with (horizontal) shaker at 420 rpm)
- Centrifuge sample: 3 min / ≥ 3000 g / room temperature (20 - 25 °C; 36 - 46 °F)
- Dilute supernatant 1:10 (1 + 9) with sample dilution buffer (e.g., 100 μ L supernatant + 900 μ L sample diluent) (see chapter 4.)
(Note: if present, pierce through the top greasy/clouding/particle layer)
- Add 50 μ L of the diluted supernatant per well in the assay

*) The sample weight can be increased accordingly, but the volume of the ECO Extractor must be adjusted for this, e.g. 10 g in 50 mL ECO Extractor.

Note: The sample dilution factor here is 1. However, for samples outside the measuring range (> 2 mg/kg (ppm)), further dilution of the already diluted supernatant with sample dilution buffer is recommended (e.g. 100 μ L diluted supernatant + 900 μ L sample dilution buffer) (see chapter 4.). The resulting dilution factor of 10 (1:10 dilution) must be taken into account in the calculation (i.e. the results must be multiplied by 10).

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The fumonisin standards are provided ready to use. The dilution factor 50 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the fumonisin concentration of samples can be read directly from the standard curve.

As **wash buffer**, a PBS Tween buffer is needed; please use the enclosed buffer salt (see chapter 4.). To prepare the buffer, dissolve the entire contents of the pouch in 1 L distilled water. The dissolved wash buffer can be stored for approximately 4 to 6 weeks at 2 - 8 °C.

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 mL distilled water (10-fold concentrate). The solution can be stored for approximately 8 - 12 weeks at room temperature (20 - 25 °C). To prepare the ready-to-use solution, mix 1 part of the 10-fold concentrate with 9 parts of distilled water.

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

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

It is recommended to pipette the conjugate, the antibody, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore cover the microtiter plates.

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.
2. Pipette 50 µL of each standard or sample (prepared according to chapter 9.) into the corresponding wells as duplicates; use a new pipette tip for each.
3. Pipette each 50 µL conjugate into the corresponding wells.
4. Pipette 50 µL anti-fumonisin antibody solution into 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 out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
6. Add 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.
7. Pipette 100 µL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 15 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the *cubic spline* function. The dilution factor of 50 which results after sample preparation is already taken into account.

For the evaluation it should be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 semilogarithmic against the fumonisin concentration [$\mu\text{g/mL}$].

12. Result interpretation

Results between LoD and LoQ could indicate a low mycotoxin concentration in the sample. Calculated results show a high uncertainty in this area due to the method's higher variation below LoQ. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LoQ".

A result below the LoD does not exclude a mycotoxin contamination below the detection limit of the assay. The results should be reported < LoD accordingly.

A further dilution and new measurement of samples is recommended for absorbance values ($A_{450 \text{ nm}}$) > standard 6. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the fumonisin concentration.

13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicate. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.

- Carry along test controls for quality control. Mycotoxin-free and mycotoxin containing samples should be used.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

Further application notes are available on request.









For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2022-06-30	Release version
2022-12-01	Error correction: <ul style="list-style-type: none"> – 4. Reagents provided: microtiter plate M – Brief information: Incubation time of 45 min

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,
Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt HRB 8321