



RIDASCREEN®FAST Fumonisin ECO

REF R5603

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



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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

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

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

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

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

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

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

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Fumonisin ECO (Art. Nr. R5603) 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 48 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Extrahieren, zentrifugieren/filtrieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Mais und Futtermittel ca. 10 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 8 min

Nachweisgrenze: Mais < 0,25 mg/kg (ppm)
(bezogen auf die Futtermittel < 0,25 mg/kg (ppm)
Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: Mais ca. 103 %
(natürlich kontaminierte Futtermittel..... ca. 113 %
Proben - Trilogy®)

Spezifität: Fumonisin B1..... ca. 100 %
Fumonisin B2..... ca. 62 %
Fumonisin B3..... ca. 70 %

Die Spezifität des RIDASCREEN®FAST 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 www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Fumonisin

RIDASCREEN® Fumonisin ECO (Art. Nr. R3411)

RIDA® QUICK Fumonisin RQS ECO (Art. Nr. R5606)

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B1, B2 (Art. Nr. TAS-MM18LZ1-2)

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B1 (Art. Nr. TAS-M18LZ1-2)

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B2 (Art. Nr. TAS-M19LZ1-2)

TRILOGY® Dried Standard Fumonisin B1, B2 (Art. Nr. TAS-MM18DZ1-2)

1. Verwendungszweck

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

2. Allgemeines

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

Die zur Auslösung toxischer Wirkungen erforderlichen Dosen an Fumonisin sind starken tierartlichen Unterschieden unterworfen. Beim Pferd wirken bereits Fumonisin-Konzentrationen von ca. 5 - 10 mg/kg 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 dagegen 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 Stopp-Lösung 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. 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate M Mikrotiterplatte M	-	Gebrauchsfertig		48 Kavitäten
ECO extractor ECO Extraktor	Transparent	Konzentrat	10x	1x 120 ml
Dilution buffer Verdünnungspuffer	Transparent	Gebrauchsfertig		60 ml
Standard 1* Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 mg/l	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,25 mg/l	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	0,50 mg/l	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	1 mg/l	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	3 mg/l	1,3 ml
Standard 6* Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	9 mg/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		3 ml
Antibody Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig		3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

*)Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 50, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können 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)
- Getreidemühle, Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 25 ml
- Zentrifuge (mind. 3.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Alternativ: Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- (Horizontal)-Schüttler
- Vortexmischer
- Variable 20 - 200 μ l und 200 - 1000 μ l Mikropipetten
- Multistepper oder 8-Kanalpipette für 50, 100 und 300 μ l
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

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).

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

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

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.).

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.

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. Ausnahmen sind geprüft und explizit in der Durchführungsanweisung aufgeführt.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahmeverfahren gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen (empfohlene Korngröße: 500 µm).

9.1. Extraktionspuffer

Für die Extraktion wird der **gebrauchsfertige ECO Extractor** benötigt. Dieser liegt als 10-fach Konzentrat vor und muss 1:10 (1 + 9) mit destilliertem/deionisiertem Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml ECO Extractor + 900 ml dest. Wasser). Der gebrauchsfertige ECO Extractor ist eine Woche bei 2 - 8 °C haltbar. Beim Auftreten einer Trübung im gebrauchsfertigen ECO Extractor (z. B. verursacht durch Kontaminationen) ist dieser zu verwerfen. Der ECO Extractor ist chargen- und produktübergreifend einsetzbar.

9.2. Extraktion für Mais und Futtermittel

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

- 5 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe einwiegen (z. B. in 50 ml verschließbares Gefäß) und 25 ml gebrauchsfertigen ECO Extractor hinzufügen.
(Alternative Möglichkeit: 10 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe (z. B. in 125 ml HDPE-Flasche) einwiegen und 50 ml gebrauchsfertigen ECO Extractor hinzufügen.)
- Probe vortexen bis vollständig durchnässt.
- 5 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Horizontalschüttler bei 420 rpm).
- 5 min bei 3.500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C) zentrifugieren oder filtrieren.
- Überstand 1:10 (1 + 9) mit Verdünnungspuffer verdünnen, z. B. 100 µl Überstand + 900 µl Verdünnungspuffer.
- 50 µl des verdünnten Überstandes pro Kavität im Test einsetzen.

Anmerkung: Proben, die oberhalb von Standards 6 (> 9 mg/kg (ppm)) gemessen werden, können mit Probenverdünnungspuffer 1:10 bis mindestens 1:64 weiter verdünnt werden. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor ist bei der Kalkulation zu berücksichtigen.

Hinweis: Der extrahierte Analyt ist vor und nach Verdünnung im Probenverdünnungspuffer mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur stabil.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und den Test bei Raumtemperatur durchführen.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt. Bitte benutzen Sie dazu das beiliegende Puffersalz (siehe Kapitel 4. Packungsinhalt). Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 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 (10-fach Konzentrat) ist ca. 8 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 komplettes Eintrocknen der Kavitäten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Daher sollte die Abarbeitung zügig erfolgen. Für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist ein gleichmäßiges Waschen der Kavitäten erforderlich. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

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 benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.

3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 5 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 sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen, die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
6. 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 3 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 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.

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.

Bitte beachten Sie, dass für die Auswertung folgende Methode verwendet werden muss: RidawinFF.NET\FOOD\Mycotoxins FAST\R5603 FAST Fumonisin ECO.met.

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 halblogarithmisch gegen die Fumonisin-Konzentration [mg/kg] auftragen. Die Fumonisin-Konzentration in mg/kg kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Kalibrationskurve abgelesen werden.

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 der LoD schließt nicht aus, dass eine Mykotoxinkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt. Die Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend formuliert werden.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 6 können 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.

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ± 1 % gegeben.

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 vorspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Mykotoxin-freie und Mykotoxin-haltige Proben zu verwenden.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-10-14	Freigabeversion

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®FAST Fumonisin ECO

Brief information

RIDASCREEN®FAST Fumonisin ECO (Art. No. R5603) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis 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 maximum of 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Extraction, centrifugation/filtration, dilution

Time requirement: Sample preparation (for 10 samples)
Corn and feed approx. 10 min
Test implementation (incubation time)...approx. 8 min

Limit of detection: Corn < 0.25 mg/kg (ppm)
(corresponding to the Standard substance) Feed..... < 0.25 mg/kg (ppm)

Recovery rate: Corn approx. 103 %
(naturally contaminated samples - Trilogy®) Feed approx. 113 %

Specificity: Fumonisin B1 approx. 100 %
Fumonisin B2 approx. 62 %
Fumonisin B3 approx. 70 %

The specificity of the RIDASCREEN®FAST 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 manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA analyses with them. The

manual can be retrieved, printed and downloaded from www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related product and accessories for fumonisin determination

RIDASCREEN® Fumonisin ECO (Art. No. R3411)

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

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B1, B2 (Art. No. TAS-MM18LZ1-2)

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B1 (Art. No. TAS-M18LZ1-2)

TRILOGY® Liquid Standard Fumonisin B2 (Art. No. TAS-M19LZ1-2)

TRILOGY® Dried Standard Fumonisin B1, B2 (Art. No. TAS-MM18DZ1-2)

1. Intended use

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

2. General information

Fumonisin are carcinogenic, neuro-, hepato- and pneumotoxic metabolites of *Fusarium moniliforme*, a mould fungi, which grows host-specific on corn. The toxic concentrations of fumonisin differ significantly depending on the animal species. A concentration of approx. 5 - 10 mg/kg fumonisin in feed induces neuro-toxic 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 bw. 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 maximum of 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate M	-	Ready to use		48 wells
ECO extractor	Transparent	Concentrate	10x	1x 120 mL
Dilution buffer	Transparent	Ready to use		60 mL
Standard 1*	White	Ready to use	0 mg/L	1.3 mL
Standard 2*	White	Ready to use	0.25 mg/L	1.3 mL
Standard 3*	White	Ready to use	0.50 mg/L	1.3 mL
Standard 4*	White	Ready to use	1 mg/L	1.3 mL
Standard 5*	White	Ready to use	3 mg/L	1.3 mL
Standard 6*	White	Ready to use	9 mg/L	1.3 mL
Wash buffer salt Tween		Dissolve the salt		
Conjugate	Red	Ready to use		3 mL
Antibody	Black	Ready to use		3 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 mL
Stop Solution	Yellow	Ready to use		14 mL

*) The dilution factor 50 for the sample has already been considered. Therefore, the fumonisin concentrations (mg/kg or mg/L) 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)
- Grinder (mill), laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Graduated cylinder: (plastic or glass) 250 mL
- Centrifuge (at least 3,500 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Alternative option: Filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- (Horizontal) shaker

- Vortex mixer
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- Multi stepper or 8-channel pipette for 50, 100 and 300 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

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

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

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

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

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.).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (36 - 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 (36 - 46 °F).

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. Exceptions are checked and explicitly listed in the instructions for use.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Sample preparation

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

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).

9.1. Extraction buffer

For extraction, the **ready-to-use ECO extractor** is needed. To obtain the ready-to-use ECO extractor, dilute the ECO Extractor (10x concentrate) 1:10 (1 + 9) with distilled or deionized water. The ready-to-use ECO Extractor is stable for one week at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). If turbidity occurs in the ready-to-use ECO extractor (possibly caused by contamination), discard or do not use it. The ECO extractor is interchangeable between RIDASCREEN® Mycotoxin ELISA lots and products.

9.2. Extraction of corn and feed

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

- Weigh 5 g of ground and homogenized sample into a suitable container (e.g. 50 mL tube) and add 25 mL of ready-to-use ECO extractor. (Alternative possibility: Weigh 10 g of the ground and homogenized sample and 50 mL of diluted ECO Extractor.)
- Vortex the sample until completely soaked.

- Shake the sample vigorously for 5 minutes (manually or with shaker at 420 rpm).
- Centrifuge for 5 min at 3,500 g and room temperature (20 - 25 °C / 36 - 46 °F) or filtrate.
- Dilute supernatant 1:10 (1 + 9) with dilution buffer (e.g. 100 µL supernatant + 900 µL dilution buffer).
- Add 50 µL of the diluted supernatant per well in the assay.

Note: Samples measured above of standard 6 (> 9 mg/kg (ppm)) are recommended to be further diluted 1:10 to at least 1:64 with dilution buffer. The resulting dilution factor must be taken into account in the calculation.

Remark: The extracted analyte is stable for at least 6 h at room temperature before and after dilution in dilution buffer.

10. Test implementation

10.1 Preliminary comments

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

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

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

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow wells to dry between work steps. Accurate washing is very important. Do not allow microwells to dry up totally and avoid prolonged intervals between the working steps. Reproducibility in

any ELISA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the ELISA test procedure.

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. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 μ L of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 μ L of conjugate to each well.
4. Add 50 μ L of antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 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 in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Wash each well with 250 μ L wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat the washing step two more times (a total of three wash cycles).
6. Add 100 μ L of substrate/chromogen to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 3 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Pipette 100 μ L of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 10 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 Cubic Spline function.

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.

Please note that the following method must be used for the evaluation: RidawinFF.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5603 FAST Fumonisin ECO.met.

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 semilogarithmic against the fumonisin concentration [mg/kg]. The fumonisin concentration in mg/kg corresponding to the extinction of each sample can be read from the calibration curve.

12. Result interpretation

Results between LoD and LoQ indicate a low mycotoxin concentration in the sample. Calculated result show a high uncertainty in this area due to the method's high 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 result should be reported accordingly.

A further dilution and new detection 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 mycotoxin 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.

An incorrect weight of the sample to be analyzed will have a 1:1 effect on the measurement result (e.g. a 10 % higher concentration is measured with a weigh in of +10 %). A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max ± 1 %.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. 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 prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Mycotoxin-free and mycotoxin containing samples should be used.

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
2022-10-14	Release version

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