

RIDASCREEN[®] Zearalenon

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Zearalenon

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
zearalenone

Art. No.: R1401

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

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

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Zearalenon (Art. Nr.: R1401) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zearalenon in Getreide, Futtermitteln, Bier, Serum und Urin.

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
 Bier: entgasen und verdünnen
 Serum und Urin: chromatographische Aufreinigung mittels RIDA® C18 column (Art. Nr.: R2002)

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
 Getreide und Futtermittel..... ca. 20 min
 Bier..... ca. 10 min
 Serum und Urin ca. 3,5 h
 Testdurchführung (Inkubationszeit)2,5 h

Nachweisgrenze: Getreide und Futtermittel..... ca. 1750 ppt
(bezogen auf die Bier..... ca. 250 ppt
Standardsubstanz) Serum und Urin ca. 50 ppt

Wiederfindungsrate: in künstlich kontaminierten Getreide- und
(bezogen auf die Futtermittelprobenca. 80 %
Standardsubstanz) (mittlerer Variationskoeffizient von 15 %)

Spezifität: Die Spezifität des RIDASCREEN® Zearalenon-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen ermittelt.
 Zearalenon100 %
 α-Zearalenol..... ca. 41,6 %
 Zeranol (Zearalanol)..... ca. 27,7 %
 β-Zearalenol ca. 13,8 %

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Zearalenon ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zearalenon-Rückständen in Getreide, Futtermitteln, Bier, Serum und Urin.

2. Allgemeines

Zearalenon, ein Mykotoxin, wird von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Zearalenon ist ein Phytohormon und hat, neben seiner anabolen Wirkung, hauptsächlich östrogene Wirkung. Als östrogen wirkende Substanz kann Zearalenon bei Tieren zu Fertilitätsstörungen und zum klinischen Erscheinungsbild des Hyperöstrogenismus führen. Ein Krankheitsbild, das vor allem bei weiblichen Schweinen häufig beschrieben ist, aber auch bei anderen Tierspezies wie Kühen, Pferden und Schafen auftreten kann.

Eine potentielle Gefährdung des Menschen durch dieses Mykotoxin, das über Nahrungsmittel pflanzlichen und tierischen Ursprungs aufgenommen werden kann, wird intensiv diskutiert.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen Zearalenon beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Proben sowie enzymmarkiertes Zearalenon (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes Zearalenon konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Zearalenon wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das farblose 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 Zearalenon-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 Antikörpern gegen Zearalenon
- 6 x Standardlösungen (je 1,3 ml)
0 ppt (Nullstandard), 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt, 4050 ppt
Zearalenon in wässriger Lösung
- 1 x Konjugat (0,7 ml) roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes Zearalenon
Konzentrat
- 1 x Substrat (7 ml) grüner Verschluss
enthält Harnstoffperoxid
- 1 x Chromogen (7 ml) blauer Verschluss
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffer 1 (50 ml)weißer Verschluss
Proben- und Konjugatverdünnungspuffer

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Labor- oder Getreidemühle
- Schüttler
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (100 ml) aus Glas
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- Zentrifuge
- Rotationsverdampfer oder andere Abdampfvorrichtung
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl- und 200 - 1000 µl-Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

–Methanol p. a.

Zusätzlich für die Aufarbeitung von Serum/Urin:

- Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Merck, Art. Nr.: 4114)
- 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,8
- 20 mM Tris-Puffer, pH 8,5 / Methanol (80/20 ; v/v)
- RIDA[®] C18 column (Art. Nr.: R2002)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten Zearalenon, 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.

Zearalenon ist lichtempfindlich, deshalb die Zearalenon-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Die farblose 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 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.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml Methanol/Wasser (70/30) hinzufügen *)
- 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt zentrifugieren: 10 min / 3500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C) oder durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren
- Überstand oder Filtrat 1:7 (1+6) mit Probenverdünnungspuffer (Puffer 1) verdünnen (z.B. 100 µl Überstand oder Filtrat + 600 µl Puffer 1) **)
- 50 µl des verdünnten Extraktes pro Kavität im Test einsetzen

*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen von Methanol/Wasser angepasst werden z. B. 10 g in 50 ml Methanol/Wasser (70/30)

**) Bei Weizenproben kann nach der Verdünnung mit Puffer eine Trübung auftreten, die unter Umständen zu einer erniedrigten Wiederfindungsrate führen kann. Daher empfehlen wir, den verdünnten Extrakt hochtourig (3 min / 20000 g / Raumtemperatur (20 – 25 °C)) zu zentrifugieren und 50 µl des klaren Überstandes im Test einzusetzen.

Anmerkung:

Der methanolische Extrakt (Filtrat oder Überstand) 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.

Sind höhere Zearalenon-Konzentrationen zu erwarten, müssen die Proben in Probenverdünnungspuffer (Puffer 1) weiter verdünnt werden.

9.2. Bier

- ausreichendes Volumen einer Bierprobe entgasen (Kohlensäure weitgehend reduzieren, bis keine Blasenbildung mehr sichtbar ist, z.B. durch rühren oder filtrieren)
- die entgaste Bierprobe 1:5 (1+4) mit Probenverdünnungspuffer (Puffer 1) verdünnen (z.B. 100 µl Probe + 400 µl Puffer 1)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Bei trüben Bierproben (z.B. Hefeweizen) muss die Probe nach dem Entgasungsschritt sterilfiltriert werden, bevor sie im Test eingesetzt wird!

9.3. Serum und Urin

Vorbereitung nur für Urin:

- 0,5 ml Urin mit 3 ml 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,8 verdünnen
- 8 µl Glucuronidase/Arylsulfatase Helix pomatia hinzufügen
- 3 h bei 37 °C inkubieren

3,5 ml Urin-Hydrolysat bzw. 0,5 ml Serum (ohne Vorbereitung) werden mittels RIDA® C18 column (Art. Nr.: R2002) folgendermaßen gereinigt:

- Tropfgeschwindigkeit 1 Tropfen/sec
- Kartuschen mit 3 ml Methanol (100 %) waschen
- equilibrieren mit 2 ml 20 mM Tris-Puffer, pH 8,5 / Methanol (80/20 ; v/v)
- 3,5 ml Urin-Hydrolysat oder 0,5 ml Serum auftragen
- mit 2 ml 20 mM Tris-Puffer, pH 8,5 / Methanol (80/20 ; v/v) waschen
- mit 3 ml Methanol (40 %) waschen
- Säule durch Durchsaugen oder Durchpressen von Luft (1 min) trocknen
- Probe langsam (15 Tropfen pro min) mit 1 ml Methanol (80 %) eluieren
- Eluat evaporieren, bei maximal 60 °C (möglichst unter schwachem Stickstoff-Strom unter dem Abzug)
- den trockenen Rückstand in 50 µl Methanol lösen, 450 µl Probenverdünnungspuffer (Puffer 1) zugeben und gründlich mischen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Auf Anfrage sind zusätzliche Applikationen für Fleisch- und Milchproben erhältlich.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das Zearalenon-Enzymkonjugat (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat mit Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Konjugat-Verdünnungspuffer (siehe 4.) verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

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 vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 2 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl destilliertem Wasser waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. 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® ELISA-Tests entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Wir empfehlen für Einzelbestimmungen die Auswertung mit Logit/log und für Doppel- oder Mehrfachbestimmungen sollte Cubic Spline verwendet werden.

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 Zearalenon-Konzentration [ng/kg] auftragen.

Die der Extinktion der jeweiligen Proben entsprechende Zearalenon-Konzentration in ng/kg aus der Eichkurve ablesen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Zearalenon-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 gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Getreide und Futtermittel	35
Bier.....	5
Serum und Urin	1

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[®] Zearalenon

Brief information

RIDASCREEN[®] Zearalenon (Art. No.: R1401) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of zearalenone in cereals, feed, beer, serum and urine.

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
beer: removing of CO₂ and dilution
serum and urine: chromatographic purification by means of RIDA[®] C18 column (Art. No.: R2002)

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
Cereals and feed..... approx. 20 min
beer..... approx. 10 min
serum and urine approx. 3.5 h
test implementation (incubation time)2.5 h

Detection limit: cereals and feed..... approx. 1750 ppt
(corresponding to the beer..... approx. 250 ppt
standard substance) serum and urine approx. 50 ppt

Recovery rate: in spiked cereals and
(corresponding to the feed samples..... approx. 80 %
standard substance) (mean coefficient of variation of 15 %)

Specificity: The specificity of the RIDASCREEN[®] Zearalenon test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins.

Zearalenone 100 %
 α -Zearalenol..... approx. 41.6 %
Zeranol (Zearalanol)..... approx. 27.7 %
 β -Zearalenol approx. 13.8 %

1. Intended use

RIDASCREEN® Zearalenon is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of zearalenone residues in cereals, feed, beer, serum and urine.

2. General

The mycotoxin zearalenone is formed by fungi of the genus *Fusarium*.

Zearalenone is a phytohormone which displays, apart from its anabolic properties, mainly estrogenic effects. Because of its estrogenic properties, zearalenone may induce fertility disorders in animals with clinical signs of hyperestrogenism - an aspect of a disease which although reported mainly in hogs, is described in other species such as cow, horse and sheep, too.

The potential health risk for man induced by this mycotoxin, which is taken up with foods of vegetable or animal origin, is extensively discussed.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with specific antibodies against zearalenone. Zearalenone standards or sample solutions and enzyme conjugate are added. Free and enzyme conjugated zearalenone compete for the zearalenone antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the colorless 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 zearalenone 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 antibodies against zearalenone
- 6 x Standard solutions (1.3 ml each)
0 ppt (zero standard), 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt, 4050 ppt
zearalenone in aqueous solution
- 1 x Conjugate (0.7 ml).....red cap
peroxidase conjugated zearalenone
concentrate
- 1 x Substrate (7 ml)green cap
contains urea peroxide
- 1 x Chromogen (7 ml) blue cap
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer 1 (50 ml)white cap
sample and conjugate dilution buffer

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- grinder (mill)
- shaker
- glassware for preparing sample extract: filter funnel and 100 ml flask
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- centrifuge
- rotary evaporator or another equipment for evaporation of solvents
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

–methanol p.a.

additional for the preparation of serum/urine samples:

- Glucuronidase/arylsulfatase of *Helix pomatia* (Merck, Art. No.: 4114)
- 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.8
- 20 mM Tris buffer, pH 8.5 / methanol (80/20)
- RIDA[®] C18 column (Art. No.: R2002)

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 zearalenone, 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 and reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Zearalenone is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The colorless chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see 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 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 5 g of ground sample into a suitable container and add 25 ml of methanol/water (70/30) *)
- shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- centrifuge the extract: 10 min / 3500 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) or filter the extract through Whatman No. 1 filter
- dilute the supernatant or filtrate 1:7 (1+6) with sample dilution buffer (buffer 1) (e.g. 100 µl supernatant or filtrate + 600 µl buffer 1) **)
- use 50 µl of the diluted extract per well in the test

*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g. 10 g in 50 ml of methanol/water (70/30)

**) Diluted extracts of wheat samples may get turbid which can sometimes lead to a reduced recovery rate. Therefore we recommend to centrifuge the diluted extract at high speed (3 min / 20000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)) and use 50 µl of the cleared supernatant in the test.

Remark:

The methanolic extract (supernatant or filtrate) can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 2 weeks and at -20 °C (- 4 °F) for 2 months. Store the extract well sealed in glass vials (brown glass) and protected against light.

If results with higher zearalenone concentrations are expected, the sample solution has to be diluted further with sample dilution buffer (buffer 1).

9.2. Beer

- use a sufficient volume of beer sample and remove CO₂ until no formation of bubbles is visible (by stirring or filtration)
- then dilute the sample 1:5 (1+4) with sample dilution buffer (buffer 1) (e.g. 100 µl sample + 400 µl buffer 1)
- use 50 µl per well in the assay

Remark:

In the case of cloudy samples a sterile filtration of the sample is recommended before the sample is used in the assay!

9.3. Serum and urine

Preparation only for urine:

- dilute 0.5 ml urine with 3 ml 50 mM acetate buffer, pH 4.8
- add 8 µl of glucuronidase/arylsulphatase from *Helix pomatia*
- incubate the solution for 3 h at 37 °C (98 °F)

3.5 ml hydrolyzed urine or 0.5 ml serum (without preparation) are purified by means of RIDA[®] C18 column (Art. No.: R2002):

- flow rate 1 drop/sec
- rinse the column with 3 ml methanol (100 %)
- equilibrate the column with 2 ml 20 mM Tris buffer, pH 8.5 / methanol (80/20; v/v)
- apply 3.5 ml hydrolyzed urine or 0.5 ml serum sample
- rinse the column with 2 ml 20 mM Tris buffer, pH 8.5 / methanol (80/20; v/v)
- rinse the column with 3 ml methanol (40 %)
- dry the column by an air or nitrogen-stream for 1 min
- elute sample slowly (flow rate 15 drops per min) with 1 ml methanol (80 %)
- evaporate eluate to dryness at maximum 60 °C (140 °F) (possibly under a weak nitrogen-stream under a chemical hood)
- redissolve the dried residue with 50 µl methanol, then add 450 µl sample dilution buffer (buffer 1) and mix thoroughly
- use 50 µl per well in the test

Remark:

Additional application notes for meat and milk are available on request. Please contact your local distributor.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The zearalenone enzyme conjugate (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted enzyme conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the enzyme conjugate should be shaken carefully. For reconstitution, the concentrate is diluted 1:11 (1+10) in buffer 1 (bottle with white cap, e.g. 200 µl concentrate + 2.0 ml buffer, sufficient for 4 microtiter strips).

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 diluted enzyme conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 2 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
4. 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 distilled water and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
5. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen 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.
6. 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[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

For single determinations we recommend logit/log evaluation and for double or multiple determinations cubic spline should be used.

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 zearalenone concentration [ng/kg].

The zearalenone concentration in ng/kg corresponding to the absorbance of each sample can be read from the calibration curve.

In order to obtain the zearalenone 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 factors are as follows:

cereals and feed.....	35
beer.....	5
serum and urine	1

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.