

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> T-2 / HT-2 Toxin**

**Art. No. R3805**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von T-2 und HT-2 Toxin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of T-2 und HT-2 Toxin

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin (Art. Nr.: R3805) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 und HT-2 Toxin in Hafer, Mais, Gerste und Weizen.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: extrahieren, filtrieren und verdünnen

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

Nachweisgrenze: Mais.....ca.12 ppb (12 µg/kg)  
(bezogen auf die Hafer..... ca.16 ppb (16 µg/kg)  
Standardsubstanz) Weizen..... ca. 21 ppb (21 µg/kg)  
Gerste.....ca.33 ppb (33 µg/kg)

Wiederfindungsrate: natürlich kontaminierte Haferproben.....ca. 105 %  
Trilogy® Referenzmaterial (Weizen, Mais).....ca. 105 %  
dotierte Weizen-, Gerste-, Maisproben .....ca. 95 %  
dotierte Haferproben .....ca. 75 %

Spezifität: Die Spezifität des RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten 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.

HT-2 Toxin..... 100 %  
T-2 Toxin .....ca. 85 %  
T-2 Triol ..... < 0,5 %  
T-2 Tetraol..... < 0,5 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. 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](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## **Produktangebot**

RIDA<sup>®</sup> QUICK T-2 / HT-2 Toxin RQS (R5304)

RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST T-2 Toxin (R5302)

RIDASCREEN<sup>®</sup> T-2 Toxin (R3801)

EASI-EXTRAKT<sup>®</sup> T-2 / HT-2 (RBRP43; RBRP43B)

TRILOGY<sup>®</sup> Liquid and Dried Standard T-2 (TSL-314; TS-314)

TRILOGY<sup>®</sup> Liquid and Dried Standard HT-2 (TSL-333; TS-333)

## **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN<sup>®</sup> T-2 / HT-2 Toxin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 und HT-2 Toxin in Hafer, Mais, Gerste und Weizen.

## **2. Allgemeines**

Die Mykotoxine T-2 und HT-2 Toxin gehören zur Gruppe der Trichothecene und werden von Pilzen der Fusarienarten gebildet. Man findet diese Toxine häufig in landwirtschaftlichen Produkten, wobei das Vorkommen und die Konzentrationen regional sehr unterschiedlich sind. Aufgrund der hohen zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkungen stellen T-2 und HT-2 Toxin ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar.

## **3. Testprinzip**

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes T-2 Toxin (Enzymkonjugat) und anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörper. Freies T-2 / HT-2 Toxin und enzymmarkiertes T-2 Toxin konkurrieren um die T-2 / HT-2 Toxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-

Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes T-2 Toxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat-/Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des 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 T-2 / HT-2 Toxin-Konzentration in der Probe.

#### 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate M</b> Mikrotiterplatte M	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>2x Extractor buffer oats</b> 2 x Extraktionspuffer Hafer	weiß	Konzentrat	10x	Je 120 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	1 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	6 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	12 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	36 µg/l	1,3 ml
<b>Wash buffer salt</b> Waschpuffer salz		Salz zum auflösen		
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfertig		6 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig		6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
<b>Stop Solution</b> Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Labormühle
- Zentrifuge
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

### 5.2. Reagenzien:

- Methanol (70 %)
- Methanol (35 %) zur Weiterverdünnung hoch kontaminierter Proben
- Destilliertes 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 HT-2 Toxin, 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).

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

## 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.

HT-2 Toxin ist lichtempfindlich, deshalb die HT-2 Toxin-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen 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 möglich.

## 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

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und gründlich mischen.

### 9.1. Hafer

Zur Aufarbeitung von Haferproben wird ein spezieller Extraktionspuffer eingesetzt. Das mitgelieferte Konzentrat des Extraktionspuffer Hafer 1:10 verdünnen (z.B. 10 ml + 90 ml destilliertes Wasser), um den gebrauchsfertigen Extraktionspuffer Hafer zu erhalten. Der gebrauchsfertige Puffer ist bei 2 - 8 °C für ca. 8 - 10 Wochen haltbar.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml des gebrauchsfertigen Extraktionspuffers Hafer hinzufügen \*)
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand 1:2 (1+1) mit Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v) verdünnen (z. B. 1 ml Überstand + 1 ml Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v))
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

\*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, dazu muss das Volumen des Extraktionspuffers Hafer angepasst werden, z.B. 25 g in 125 ml gebrauchsfertigem Extraktionspuffer Hafer oder 50 g in 250 ml

gebrauchsfertigem Extraktionspuffer Hafer. Der im Kit enthaltene Extraktionspuffer Hafer reicht dann für entsprechend weniger Haferproben.

## 9.2. Getreide (Mais, Gerste, Weizen)

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und in 25 ml Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v) lösen \*)
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 1 ml Überstand + 1 ml dest. Wasser)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

\*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, dazu muss das Volumen von Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v) angepasst werden z.B. 25 g in 125 ml Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v) oder 50 g in 250 ml Methanol/dest. Wasser (70/30; v/v)

### Anmerkung:

**Bei hohen T-2 / HT-2 Toxingehalten (> 360 ppb) muss der 1:2 verdünnte Extrakt weiter verdünnt werden (z. B. 1:10 (1+9) mit Methanol (35 %) entspricht 50 µl verdünnter Extrakt + 450 µl Methanol (35 %)). Daraus ergibt sich ein zusätzlicher Verdünnungsfaktor von 10.**

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Diese Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.



## 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 Standards bzw. die vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung 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 manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) 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 10.1.) waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die entsprechenden 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 30 min nach Zugabe des Stopp-Lösung messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigegeführten 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 T-2 / HT-2 Toxin-Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche T-2 und HT-2 Toxin-Konzentration in  $\mu\text{g/kg}$  zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Hafer und Getreide (Mais, Gerste, Weizen) ..... 10 (bzw. 100\*)

\*siehe 9. Probenvorbereitung, Anmerkung

Der Messbereich der Standardkurve liegt somit zwischen 10 und 360  $\mu\text{g/kg}$  (ppb) T-2 / HT-2 Toxin für Hafer und Getreide (bzw. zwischen 100 und 3600  $\mu\text{g/kg}$  (ppb)).

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

# RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin

## Brief information

RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin (Art. No.: R3805) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of T-2 and HT-2 toxin in oats, corn/maize, barley and wheat.

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: extraction, filtration and dilution

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

Detection limit: Maize/corn.....approx.. 12 ppb (12 µg/kg)  
(corresponding Oats..... approx. 16 ppb (16 µg/kg)  
to standard substance) Wheat.....approx. 21 ppb (21 µg/kg)  
Barley.....approx. 33 ppb (33 µg/kg)

Recovery rate: naturally contaminated oats samples ..... approx. 105 %  
Trilogy® reference material  
(wheat, corn/maize)..... approx. 105 %  
spiked wheat, barley, corn/maize samples .... approx. 95 %  
spiked oats samples..... approx. 75 %

Specificity: The specificity of the RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins 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.

HT-2 toxin.....	100 %
T-2 toxin .....	approx. 85 %
T-2 triol .....	< 0,5 %
T-2 tetraol.....	< 0,5 %

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website [www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

### **Related products**

RIDA<sup>®</sup> QUICK T-2 / HT-2 Toxin RQS (R5304)

RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST T-2 Toxin (R5302)

RIDASCREEN<sup>®</sup> T-2 Toxin (R3801)

EASI-EXTRAKT<sup>®</sup> T-2 / HT-2 (RBRP43; RBRP43B)

TRILOGY<sup>®</sup> Liquid and Dried Standard T-2 (TSL-314; TS-314)

TRILOGY<sup>®</sup> Liquid and Dried Standard HT-2 (TSL-333; TS-333)

### **1. Intended use**

RIDASCREEN<sup>®</sup> T-2 / HT-2 Toxin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of T-2 and HT-2 toxin in oats, corn/maize, barley and wheat.

### **2. General**

T-2 and HT-2 toxin belong to the trichothecene group of mycotoxins and are formed by fungi of the genus *Fusarium*. T-2 and HT-2 toxin are often found in agricultural commodities, although the incidence and the concentrations found show a broad regional variation. Due to their high cytotoxic and immunosuppressive mode of action T-2 / HT-2 toxins are a threat for human and animal health.

### **3. Test principle**

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-T-2 / HT-2 toxin antibodies. Standards or sample solutions, T-2 toxin enzyme conjugate and anti-T-2 / HT-2 toxin antibodies are added. Free T-2 / HT-2 toxin and T-2 toxin enzyme conjugate

compete for the T-2 / HT-2 toxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-T-2 / HT-2 toxin 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 T-2 / HT-2 toxin concentration in the sample.

#### 4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
<b>Microtiter plate M</b>	-	Ready to use		96 wells
<b>2x Extractor buffer oats</b>	White	Conzentrare	10x	120 ml each
<b>Standard 1</b>	White	Ready to use	0 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	White	Ready to use	1 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	White	Ready to use	3 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	White	Ready to use	6 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	White	Ready to use	12 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 6</b>	White	Ready to use	36 µg/l	1.3 ml
<b>Wash buffer salt</b>		Dissolve the salt		
<b>Conjugate</b>	Red	Ready to use		6 ml
<b>Antibody</b>	Black	Ready to use		6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
<b>Stop Solution</b>	Yellow	Ready to use		14 ml

#### 5. Materials required but not provided

##### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- grinder (mill)
- centrifuge
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

## 5.2. Reagents:

- methanol (70 %)
- methanol (35 %) for further dilution of high contaminated samples
- distilled or deionized water

## 6. Warnings and precautions for the users

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

The standards contain HT-2 toxin, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

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

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

## 7. Storage instructions

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

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

HT-2 toxin is light sensitive; therefore, avoid exposure of standards to direct light.

The reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

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

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

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen 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 from light.

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

### 9.1. Oats

For preparation of oat samples, a special extraction buffer is needed. Please use the extraction buffer oats concentrate contained in the kit and dilute it 1:10 (e.g. 10 ml + 90 ml distilled water) to obtain ready-to-use extraction buffer oats. Ready-to-use extraction buffer oats should be stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) and expires after approx. 8 - 10 weeks.

- weigh 5 g of ground sample and add 25 ml of ready-to-use extraction buffer oats \*)
- shake the sample for 10 min (overhead)
- centrifuge: 10 min / 3000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute the supernatant 1:2 (1+1) with methanol/distilled water (70/30; v/v), (e. g. 1 ml supernatant + 1 ml of methanol/distilled water (70/30; v/v))
- use 50 µl per well in the assay

\*) sample size may be increased if required, but the volume of ready-to use extraction buffer oats must be adapted accordingly, e.g.: 25 g in 125 ml ready-to-use extraction buffer oats or 50 g in 250 ml ready-to-use extraction buffer oats. Buffer contained in the kit will then be sufficient for a lower number of oat samples, respectively.

### 9.2. Grain (corn/maize, barley, wheat)

- weigh 5 g of ground sample and dissolve with 25 ml of methanol/distilled water (70/30; v/v) for extraction \*)
- shake the extract for 10 min (overhead)
- centrifuge: 10 min / 3000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute the supernatant 1:2 (1+1) with dest. water (e. g. 1 ml supernatant + 1 ml of dest. water)
- use 50 µl per well in the assay

\*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/distilled water (70/30; v/v) must be adapted accordingly, e.g.: 25 g in 125 ml methanol/distilled water (70/30; v/v) or 50 g in 250 ml methanol/distilled water (70/30; v/v).

## Remark:

At high T-2 / HT-2 toxin concentrations (> 360 ppb) the 1:2 diluted extract solution must be further diluted (e. g. 1:10 (1+9) with methanol (35 %) means 50 µl of the diluted extract solution + 450 µl methanol (35 %)). This results in an additional dilution factor of 10.

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**; please use the wash buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the total content of the pouch in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks, stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

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

### 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 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 standard or prepared sample to separate duplicate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.



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. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

## 11. Results

A special software, the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> enzyme immunoassays.

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

Remark for the calculation without software:

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

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the T-2 / HT-2 toxin concentration [µg/l].

In order to obtain the T-2 and HT-2 toxin concentration in µg/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:

Oats, corn/maize, barley, wheat ..... 10 (or 100\*)

\* see 9. sample preparation, remark

Therefore, the measurement range of the test is 10 to 360 µg/kg (ppb) T-2 / HT-2 toxin for oats and grain (or in the range of 100 to 3600 µg/kg (ppb)).

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. 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. Defective products will be replaced. 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.

**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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321