

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

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

Enzyme immunoassay for the analysis of  
T-2 and HT-2 toxin

Art. No.: R3805

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](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Warenzeichen 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: ca. 30 ppb (30 µg/kg)  
(bezogen auf die  
Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: in natürlich kontaminierten Getreideproben  
Trilogy® Referenz-Material.....105 % ± 15 %  
in dotierten Proben .....95 % ± 15 %

Spezifität: Die Spezifität des RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen im Puffersystem ermittelt.

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

## **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN® 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 gehört zur Gruppe der Trichothecene und werden von Pilzen der Fusarienarten gebildet. Man findet diese Toxine häufig in landwirtschaftlichen Produkten, wobei die Kontamination 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-/Chromogenlösung. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das 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 der T-2 / HT-2 Toxin-Konzentrationen 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 Fänger-Antikörpern
- 6 x Standardlösungen, je 1,3 ml  
0 ppb (Nullstandard), 1 ppb, 3 ppb, 6 ppb, 12 ppb, 36 ppb  
HT-2 Toxin in methanolischer Lösung  
gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml) ..... roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes T-2 Toxin  
Konzentrat
- 1 x Anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörper (0,7 ml) ..... schwarzer Verschluss  
Konzentrat
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml) ..... brauner Verschluss  
rötlich gefärbt  
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) ..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Waschpuffer (Salz)  
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers, pH 7,4  
enthält 0,05 % Tween 20

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

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

### 5.2. Reagenzien:

- Methanol (70 %)
- Methanol (35 %) zur Weiterverdünnung hoch kontaminierter Proben

## 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 toxinhaltigen 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.

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

Die rötlich gefärbte Substrat-/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 möglich.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlichen Substrat-/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.

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

### 9.1. Hafer und 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 / RT(20 - 25 °C)
- den Überstand 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 µl Überstand + 100 µl 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 %)).**

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

Das **T-2-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat mit Puffer (Waschpuffer, siehe 4.) 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 Waschpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Die **anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörper** (Flasche mit schwarzem Verschluss) liegen als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Antikörperlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Antikörper-Konzentrat mit Puffer (Waschpuffer, siehe 4.) verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Antikörper-Konzentrat vor Entnahme gut mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Waschpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (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 Standardlösung bzw. die vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl des verdünnten Enzymkonjugats in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl der verdünnten anti-T-2 / HT-2 Toxin-Antikörperlösung 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/Chromogenlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.



7. 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® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

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 T-2 / HT-2 Toxin-Konzentration [µg/kg] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche T-2 und HT-2 Toxin-Konzentration in µg/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:

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

Der Messbereich der Standardkurve liegt somit zwischen 10 und 360 µg/kg (ppb) T-2 / HT-2 Toxin für Getreide (bzw. zwischen 100 und 3600 µg/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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen 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, 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: approx. 30 ppb (30 µg/kg)  
(corresponding to the  
standard substance)

Recovery rate: in natural contaminated cereal samples  
Trilogy® reference material ..... approx. 105 % ± 15 %  
In spiked samples ..... approx. 95 % ± 15 %

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.

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

## **1. Intended use**

RIDASCREEN® T-2 / HT-2 Toxin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of T-2 and HT-2 toxin in oats, corn, 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 solution 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:

- 1 x Microtiter plate 96 well (12 strips with 8 removable wells each)  
coated with capture antibodies
- 6 x Standard solutions, 1.3 ml each  
0 ppb (zero standard), 1 ppb, 3 ppb, 6 ppb, 12 ppb, 36 ppb  
HT-2 toxin in methanolic solution  
ready to use
- 1 x Conjugate (0.7 ml).....red cap  
peroxidase conjugated T-2 toxin  
concentrate
- 1 x Anti-T-2 / HT-2 toxin antibody (0.7 ml).....black cap  
concentrate
- 1 x Substrate/chromogen (10 ml)..... brown cap  
stained red  
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) ..... yellow cap  
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Washing buffer (salt)  
for preparation of a 10 mM phosphate buffer, pH 7.4  
contains 0.05 % tween 20

## 5. Materials required but not provided

### 5.1. Equipment:

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

### 5.2. Reagents:

- methanol (70 %)
- methanol (35 %) for further dilution of high contaminated samples

## 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).

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, 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 solution 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 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.

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

## 9.1. Oats and grain (corn, 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 (over head)
- 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. 100 µl supernatant + 100 µl 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 %)).**

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

The **T-2 enzyme conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in washing buffer (see 4. / e. g. 200 µl conjugate concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

The anti **T-2 / HT-2 toxin antibody** (bottle with black cap) is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody concentrate should be shaken thoroughly. For reconstitution, the antibody concentrate is diluted 1:11 (1+10) in washing buffer (see 4. / e. g. 200 µl antibody concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

A PBS-Tween buffer is needed as **washing buffer**, please use the washing 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 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 washing 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 washing 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 diluted enzyme conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of the diluted anti-T-2 / HT-2 toxin 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 washing 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. Z9999), 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 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ].

In order to obtain the T-2 and HT-2 toxin concentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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 and grain (corn, barley, wheat) ..... 10 (100)

Therefore, the standard curve is in the range of 10 to 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) T-2 / HT-2 toxin for grain (or in the range of 100 to 3600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb)).

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.