

RIDASCREEN[®] FAST DON

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Deoxynivalenol

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
deoxynivalenol

Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de
deoxinivalenol (vomitoxina)

Art. No.: R5901 (96 wells)

Art. No.: R5902 (48 wells)



Federal Grain Inspection Services
CERTIFICATE NO. FGIS 2002 - 105

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Almacenar entre 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.

RIDA[®] y RIDASCREEN[®]
son marcas registradas de la empresa R-Biopharm AG
Fabricante: R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG está certificada por el ISO 9001.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST DON (Art. Nr.: R5901, 96 Kavitäten / R5902, 48 Kavitäten) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol in Getreide, Malz und Futtermitteln. Weizen, Gerste, Gerstenmalz, Hafer und Mais wurden nach dem Performance Tested Method Program vom AOAC Research Institute und nach dem FGIS (Federal Grain Inspection Services) Programm der zuständigen Behörde des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums (USDA, GIPSA) validiert.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 96 bzw. 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Für die Durchführung des Tests ist keine spezielle über die eines Laboranten / Technikers hinausgehende Ausbildung erforderlich. Falls erforderlich, wird jedoch auf Anfrage eine kostenlose Einarbeitung angeboten.

Probenvorbereitung: extrahieren und filtrieren

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

Nachweisgrenze: < 0,2 mg/kg (ppm)

Bestimmungsgrenze: 0,2 mg/kg (ppm) / Hafer: 0,36 mg/kg (ppm)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST DON ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol in Getreide, Malz und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Deoxynivalenol, ein Mykotoxin aus der Gruppe der Trichothecene, wird von Feldpilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Deoxynivalenol ist in pflanzlichen Produkten, vor allem in Getreide, nachzuweisen. Von den mehr als 150 bekannten Trichothecenen ist in Europa und Nordamerika Deoxynivalenol das vorherrschende Toxin, daneben sind noch 3-Acetyl- bzw. 15-Acetyldeoxynivalenol von Bedeutung. Die Toxingehalte insbesondere in Weizen, Mais oder Reis liegen häufig im ppm-Bereich und stellen aufgrund der hohen zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkungen dieser Toxine ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fängerantikörpern gegen anti-Deoxynivalenol-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Deoxynivalenol (Enzymkonjugat) und anti-Deoxynivalenol-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Deoxynivalenol konkurrieren um die Deoxynivalenol Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Deoxynivalenol-Antikörper von den immobilisierten Fängerantikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Deoxynivalenol wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Hinzugegeben wird Substrat/Chromogen, 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 zur Deoxynivalenol Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können bis zu 91 (R5901) bzw. 43 (R5902) Bestimmungen durchgeführt werden (plus 5 Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 bzw. 48 Kavitäten
(12, R5901 bzw. 6 Streifen, R5902 à 8 Kavitäten, teilbar),
beschichtet mit Fängerantikörpern gegen anti-Deoxynivalenol-Antikörper
- 5 x Deoxynivalenol-Standards *), je 1,3 ml
0 ppm (Nullstandard), 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm, 6 ppm
Deoxynivalenol in Wasser, gebrauchsfertig

- 1 x Konjugat (6 ml, R5901 bzw. 3 ml, R5902).....roter Verschluss
 Peroxidase-konjugiertes Deoxynivalenol
 gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Deoxynivalenol-Antikörperschwarzer Verschluss
 (6 ml, R5901 bzw. 3 ml, R5902)
 gebrauchsfertig
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml).....brauner Verschluss
 rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml)..... gelber Verschluss
 enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffersalz (Waschpuffer)
 zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH 7,4)
 enthält 0,05 % Tween 20

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können Deoxynivalenol-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml, 1 Liter
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (50 ml) aus Glas
- Labor- oder Getreidemühle
- Ultra-Turrax oder Vergleichbares
- optional: Schüttler
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten Deoxynivalenol, 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).

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.

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.

Der Test kann bei entsprechender Lagerung mindestens bis zum Verfallsdatum (angegeben auf der Kitpackung) für eine ordnungsgemäße Analyse eingesetzt werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

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 mischen.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 100 ml destilliertes Wasser *) hinzufügen
 - die Probe 2 min mit einem Ultra-Turrax (oder Vergleichbarem) homogenisieren oder 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
 - den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren
 - 50 µl Filtrat pro Kavität im Test einsetzen
- *) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen des Wassers angepasst werden z. B. 25 g in 500 ml dest. Wasser oder 50 g in 1000 ml dest. Wasser

USDA/GIPSA Extraktionsmethode

- 50 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 250 ml dest. Wasser hinzufügen
- die Probe 2 min mit einem Ultra-Turrax (oder Vergleichbarem) homogenisieren oder 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren
- den filtrierten Probenextrakt 1:4 (1+3) mit dest. Wasser verdünnen (z.B. 1 ml Extrakt + 3 ml dest. Wasser)
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
2. Die spezifische Reaktion startet erst mit der Zugabe des spezifischen Antikörpers. Wenn eine einfache Pipette eingesetzt wird, sollten trotzdem nicht mehr als drei Streifen pro Testansatz eingesetzt werden. Bis zu 6 Streifen können bei Verwendung von Multistep-Pipetten eingesetzt werden.
3. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

Die **Deoxynivalenol Standards** liegen gebrauchsfertig vor. Der Verdünnungsfaktor 20 für die Proben wurde beim Etikettieren der Standardfläschchen bereits berücksichtigt. Deshalb kann die Deoxynivalenol-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter 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). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Die Lösung (10fach Konzentrat) ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Der Waschpuffer wird nur für Proben aus Weizen und Weizenprodukten benötigt. Der Puffer kann aber für alle Probenarten verwendet werden.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Kavitäten ab. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten 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 Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 50 µl der anti-Deoxynivalenol-Antikörperlösung (schwarzer Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 5 min (+/- 1) 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 Hilfe einer Waschflasche oder Multikanal-Pipette (250 µl pro Kavität) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser (bei Weizenproben mit Waschpuffer, siehe 10.1.) waschen, die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 3 min (+/- 0,5) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 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 (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 Deoxynivalenol-Konzentration [mg/kg] auftragen.

Die Deoxynivalenol-Konzentration in mg/kg kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Eichkurve abgelesen werden.

12. Sensitivität

12.1. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (NG) wurde für unterschiedliche Proben durch wiederholte Messung der Nullmatrix bestimmt (n = 10).

NG = mittlere Konzentration + 2 x Standardabweichung der Messung

Die entsprechende Bestimmungsgrenze (BG) wurde kalkuliert als die mittlere Konzentration + 10 x Standardabweichung der Messung.

Ergebnisse (ppb), n = 10	Weizen	Gerste	Gerstenmalz	Hafer	Mais
Mittelwerte	26,3	4,6	30,7	78,0	27,6
Standardabweichung	14,1	3,8	15,9	28,2	11,5
NG	54	12	62	134	51
BG	167	42	190	360	143

Alle Nachweisgrenzen wurden unter 0,2 ppm bestimmt. Die Bestimmungsgrenze kann mit 0,2 ppm (Standard 2) festgelegt werden. Für Hafer liegt sie bei 0,36 ppm.

13. Spezifität

1. Zeitbedarf für die Testdurchführung (Inkubationszeit): 8 Minuten
2. Messbereich: 0,2 - 6,0 ppm
3. validierte Matrices: Weizen, Gerste, Gerstenmalz, Hafer und Mais
4. zusätzlich validierte Matrices: Weizenmehl, Weizenkleie, Hirse, Soyaflocken, Soyamehl und Mischfutter
5. Spezifität: der Test unterscheidet nicht zwischen DON und 3-Acetyl-DON (Kreuzreaktion: 213 %), und hat eine vernachlässigbare bzw. keine Kreuzreaktion zu anderen verwandten Substanzen wie Nivalenol, 15-Acetyl-DON, Triacetyl-DON, Triacetyl-Nivalenol, Tetraacetyl-DON und Fusarenon X

Genauigkeits- und Präzisionswerte mit dotierten Weizenproben (n = 90 je Dotierung)

Dotierung (ppm)	0,5	1,0	2,5	5,0
Mittelwert (ppm)	0,526	1,0	2,4	4,1
Stand.-Abweichung (ppm)	0,095	0,224	0,240	0,435

Vergleichsuntersuchungen von natürlich belasteten Weizenproben mit HPLC (Referenz-Methode)

ELISA	Mittelwert	0,841	4,020	2,302
(n = 30)	Std.-Abweichung	0,156	0,328	0,147
HPLC	Mittelwert	0,6	3,88	2,28
(n = 5)	Std.-Abweichung	0,116	0,503	0,16

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[®]FAST DON

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST DON (Art. No.: R5901, 96 wells / R5902, 48 wells) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of deoxynivalenol in cereals, malt and feed. Wheat, barley, malted barley, oats and corn are approved by AOAC Research Institute according to the Performance Tested Method Program and FGIS (Federal Grain Inspection Services) program of the Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration of the United States Department of Agriculture (USDA/GIPSA).

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 or 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Technicians need no specialized training to perform the RIDASCREEN[®]FAST DON test, however, free support is offered by the distributor on request, if necessary.

Sample preparation:	extraction and filtration
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) cereals and feedapprox. 10 min test implementation (incubation time) 8 min
Limit of detection:	< 0.2 mg/kg (ppm)
Limit of quantification:	0.2 mg/kg (ppm) / oats: 0.36 mg/kg (ppm)

1. Intended use

RIDASCREEN[®]FAST DON is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of DON in cereals, malt and feed.

2. General

Deoxynivalenol belongs to the trichothecene group of mycotoxins and is formed by fungi of the genus *Fusarium*. Deoxynivalenol often occurs in plant products particularly in cereals. Of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyl- and 15-acetyl-deoxynivalenol are the toxins most frequently occurring in Europe and Northern America. The toxin concentrations found in wheat, corn or rice are often in the ppm range. Due to their high cytotoxic and immunosuppressive properties these toxins pose a risk to 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-deoxynivalenol antibodies. Deoxynivalenol standards or sample solutions, deoxynivalenol enzyme conjugate and anti-deoxynivalenol antibodies are added. Free deoxynivalenol and deoxynivalenol enzyme conjugate compete for the deoxynivalenol antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-deoxynivalenol 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 deoxynivalenol concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for as many as 91 (R5901) or 43 (R5902) analyses (plus 5 standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 96 or 48 wells
(12, R5901 or 6 strips, R5902 resp., with 8 removable wells each)
coated with capture antibodies against anti-deoxynivalenol antibodies
- 5 x Deoxynivalenol standard solutions *), 1.3 ml each
0 ppm (zero standard), 0.222 ppm, 0.666 ppm, 2 ppm, 6 ppm
deoxynivalenol in water, ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml, R5901 and 3 ml, R5902)red cap
peroxidase conjugated deoxynivalenol
ready to use

- 1 x Anti-deoxynivalenol antibody..... black cap
(6 ml, R5901 and 3 ml, R5902)
ready to use
- 1 x Substrate/chromogen (10 ml) brown cap
stained red
- 1 x Stop solution (14 ml)yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer salt (washing buffer)
for preparation of a 10 mM Phosphate Buffer (pH 7.4)
contains 0.05 % Tween 20

*) The dilution factor 20 for the sample has already been considered. Therefore, the deoxynivalenol concentrations of samples can be read directly from the standard curve.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- graduated cylinder: (plastic or glass) 100 ml, 1 l
- glassware for preparing sample extract: filter funnel and 50 ml flask
- grinder (mill)
- Ultra-Turrax or equivalent
- optional: shaker
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

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

Decontamination of the glassware and deoxynivalenol 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).

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

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

The test kit can be regularly used at least up to the expiry date (indicated on the kit package), if stored correctly.

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 from light.

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

- weigh 5 g of ground sample into a suitable container and add 100 ml of distilled water *)
- blend the sample by ultra-turrax (or equivalent) for two minutes or shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through Whatman No. 1 filter (or equivalent)
- use 50 µl of the filtrate per well in the test

*) sample size may be increased if required, but the volume of water must be adapted accordingly, e.g.: 25 g in 500 ml of distilled water or 50 g in 1000 ml of distilled water

USDA/GIPSA extraction method

- weigh 50 g of ground sample into a suitable container and add 250 ml of distilled water
- blend the sample by ultra-turrax (or equivalent) for two minutes or shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through Whatman No. 1 filter (or equivalent)
- dilute the filtered sample extract 1:4 (1+3) with distilled water (e.g. 1 ml of the extract + 3 ml of distilled water)
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. The specific reaction starts with the addition of the specific antibody. Nevertheless, not more than three strips should be applied to the test, when a single step pipette is used. More strips (up to 6) could be applied, when a multistep pipette is used.
3. Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

The deoxynivalenol standards are provided ready to use. The dilution factor 20 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the deoxynivalenol concentration of samples can be read directly from the standard curve.

As **washing buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt 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).

Alternative: Dissolve the contents of the envelope in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

The 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

The washing buffer is required only for wheat samples and wheat product samples. However, other samples may be processed also using washing buffer.

10.2. Test procedure

Accurate washing is very important. Do not allow microwells to dry up totally and avoid prolonged intervals between the working steps. Reproducibility in any EIA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the EIA test procedure.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore covering the microtiter plates is recommended.

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 µl of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to each well.
4. Add 50 µl of anti-deoxynivalenol antibody solution (black cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C; 68 - 77 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Using a wash bottle or multichannel pipette, fill the wells (250 µl per well) with distilled or deionized water (washing buffer for wheat samples, see 10.1.). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 3 min (+/- 0.5) at room temperature (20 - 25 °C; 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate 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 deoxynivalenol concentration [mg/kg].

The deoxynivalenol concentration in mg/kg corresponding to the extinction of each sample can be read from the calibration curve.

12. Sensitivity

12.1. Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) values were investigated with repeated measurements (n = 10) of blank samples of various commodities.

LOD = mean concentration + 2 x standard deviation of the measurement

The corresponding limit of quantification (LOQ) values were calculated as

LOQ = mean conc. + 10 x standard deviation of the measurement.

values (ppb), n = 10	wheat	barley	malted barley	oats	corn
mean	26.3	4.6	30.7	78.0	27.6
s.d.	14.1	3.8	15.9	28.2	11.5
LOD	54	12	62	134	51
LOQ	167	42	190	360	143

All LOD values were found well below 0.2 ppm. LOQ can be set as to 0.2 ppm (standard 2) except for oats (0.36 ppm).

13. Specificity

1. time required for performing the test (incubation time): 8 minutes
2. measuring range: 0.2 - 6.0 ppm
3. approved matrices: wheat, barley, malted barley, oats, corn
4. additionally validated matrices: wheat flour, wheat midds, wheat bran, sorghum, soya flakes, soya meal, mixed animal feed
5. specificity: the test can not differentiate between DON and 3-acetyl-DON (cross reactivity: 213 %), and has a negligibly low or no cross reactivity to other related substances such as Nivalenol, 15-acetyl-DON, Triacetyl-DON, Triacetyl-Nivalenol, Tetraacetyl-DON, and Fusarenon X

Accuracy and precision data with spiked wheat samples (n = 90, each level)

fortification (ppm)	0.5	1.0	2.5	5.0
mean (ppm)	0.526	1.0	2.4	4.1
s.d. (ppm)	0.095	0.224	0.240	0.435

Comparative testing of incurred wheat samples with HPLC (reference method)

ELISA	mean	0.841	4.020	2.302
(n = 30)	s.d.	0.156	0.328	0.147
<hr/>				
HPLC	mean	0.6	3.88	2.28
(n = 5)	s.d	0.116	0.503	0.16

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.

RIDASCREEN®FAST DON

Informacion breve

El RIDASCREEN®FAST DON (Art. No.: R5901, 96 pocillos / R5902, 48 pocillos) es un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de deoxinivalenol (vomitoxina) en cereales, malta y piensos. Tanto trigo, cebada, cebada malteada, avena y trigo están aprobados por el Performance Tested Method Program (programa de métodos verificados por el instituto de investigación del AOAC research institute) y FGIS (Servicio federal de inspección de granos) programa de la Inspección de Grano, Empaquetadores y Administración de los Corrales de Ganado de la Sección de Estados Unidos de Agricultura (USDA/GIPSA).

Todos los reactivos requeridos para el inmunoensayo enzimático - incluyendo los estándares - están contenidos en el kit.

Un kit alcanza para realizar 96 o 48 determinaciones (incluyendo estándares), Para cuantificar se requiere un espectrofotómetro (lector de ELISA).

No se necesita una formación especializada para la ejecución del test RIDASCREEN®FAST DON. Sin embargo el distribuidor ofrece un soporte técnico gratuito.

Preparación de muestra: extracción y filtración

Tiempo requerido: preparación de muestra (para 10 muestras)
cereales y piensos aprox. 10 min
implementación del test
(tiempo de incubación)..... ..8 min

Límite de detección: < 0,2 mg/kg (ppm)

Límite de cuantificación: 0,2 mg/kg (ppm) / avena: 0,36 mg/kg (ppm)

1. Fin del uso

El RIDASCREEN®FAST DON es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de deoxinivalenol en cereales, malta y piensos.

2. Generalidades

Deoxinivalenol, una micotoxina del grupo de los tricotecenos, es producida por hongos del género *Fusarium*.

Deoxinivalenol se encuentra en productos vegetales, sobre todo en cereales. De los más de 150 tricotecenos conocidos, deoxinivalenol es la toxina más importante en Europa y Norteamérica, 3-acetil- o bien 15-acetildeoxinivalenol también poseen una cierta importancia. El contenido de toxina sobre todo en trigo, maíz y arroz alcanza frecuentemente valores en el orden de los ppm y representa debido a su efecto citotóxico e inmunosupresivo un riesgo para la salud humana y animal.

3. Fundamento del test

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-deoxinivalenol. Se agregan estándares de deoxinivalenol o la solución de las muestras, conjugado deoxinivalenol-enzima y anticuerpos anti-deoxinivalenol a los pocillos. El deoxinivalenol libre y el conjugado deoxinivalenol-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-deoxinivalenol (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-deoxinivalenol se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado deoxinivalenol-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El substrato / cromógeno es agregado a los pocillos e incubado. El conjugado deoxinivalenol-enzima unido a los pocillos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución stop provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de deoxinivalenol en la muestra.

4. Contenido del kit

Con los reactivos de un kit se pueden realizar 91 (R5901) o bien 43 (R5902) determinaciones (+ determinación de los 5 estándares). Cada kit contiene:

- 1 x Placa con 96 o 48 pocillos
(12, R5901 o 6 tiras, R5902 cada una de 8 pocillos separables)
recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-deoxinivalenol
- 5 x Estándares ^{*}), 1,3 ml cada uno
0 ppm (estándar cero), 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm, 6 ppm
de deoxinivalenol en agua, listo para su uso
- 1 x Conjugado (6 ml, R5901 o 3 ml, R5902)tapon rojo
conjugado deoxinivalenol-peroxidasa
listo para su uso
- 1 x Anticuerpo anti-deoxinivalenol..... tapon negro
(6 ml, R5901 o 3 ml, R5902)
listo para su uso
- 1 x Solución de substrato/cromógeno (10 ml) tapón marrón
rojiza
- 1 x Solución stop (14 ml)..... tapón amarillo
contiene una solución de ácido sulfúrico 1 N
- 1 x sal de tampón (tampón de lavado)
para la preparación de una solución tampón de fosfatos 10 mM (pH 7,4)
contiene 0,05 % de Tween 20

- *) El factor de dilución 20 que se produce durante la preparación de las muestras ya fue tomado en cuenta en la indicación de las concentraciones. De esta forma se puede leer directamente la concentración de deoxinivalenol (vomitoxina) de las muestras a partir de la curva de los estándares.

5. Reactivos adicionales y accesorios requeridos

5.1. Equipo:

- espectrofotometro para placas portapocillos (450 nm)
- probeta graduada de 100 ml y 1 l de plástico o de vidrio
- para la preparación de las muestras: embudo de filtrado y un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml
- molino para desmenuzar las muestras

- Ultra-Turrax (liquadora) o equivalente
- opcional: agitador
- papel de filtro: Whatman n. 1 o equivalente
- micropipetas variables de 20 µl - 200 µl y 200 - 1000 µl

5.2. Reactivos:

- agua destilada

6. Precauciones

Los estándares contienen deoxinivalenol, tenga particularmente cuidado con su manejo. Evite contacto cutáneo (utilice guantes).

La descontaminación del material de vidrio y de las soluciones que contienen deoxinivalenol se realiza incubando éstas durante la noche en una solución de hipoclorito de sodio (10 % (v/v)), (regular el pH de la solución con HCl hasta pH = 7).

La solución stop contiene ácido sulfúrico 1 N (R36/38, S2-26).

7. Almacenaje de reactivos

Almacene los reactivos entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F), no los congele.

Guarde los pocillos no utilizados dentro del envase original, séllelo junto con el desecador provisto y continúe con el almacenamiento a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

La solución rojiza del substrato/cromógeno es sensible a la luz, evite por lo tanto su exposición directa.

Después del vencimiento de la fecha de caducidad (vea la etiqueta exterior del kit bajo "Exp.") no se asume más la garantía de calidad.

El test puede ser utilizado normalmente por lo menos hasta la fecha de caducidad (indicada sobre la caja del kit), si es almacenado correctamente.

No intercambie reactivos individuales entre ensayos de diferentes lotes.

8. Indicios de inestabilidad o deterioro de reactivos

- una coloración azulada del substrato/cromógeno rojizo anterior a su adición a los pocillos
- un valor de absorbancia menor a 0.6 unidades ($E_{450\text{ nm}} < 0.6$) para el estándar cero

9. Preparación de las muestras

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz. Una muestra representativa (de acuerdo con la técnica de muestreo aceptada) debe ser molida y mezclada.

- pese 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 100 ml de agua destilada *)
- la muestra puede ser liquada en un Ultra-Turrax (liquadora) o equivalente durante 2 minutos o agitada vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador)
- filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman n. 1 (o equivalente)
- utilice 50 μ l del filtrado por pocillo para su análisis en el test

*) la cantidad de la muestra puede ser aumentada siempre y cuando el volumen del agua destilada se aumente respetando el factor de dilución dado, por ejemplo: 25 g en 500 ml de agua destilada o 50 g en 1000 ml de agua destilada

Método de extracción del USDA/GIPSA

- pese 50 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 250 ml de agua destilada
- la muestra puede ser liquada en un Ultra-Turrax (liquadora) o equivalente durante 2 minutos o agitada vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador)
- filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman n. 1 (o equivalente)
- diluya el filtrado 1:4 (1+3) con agua destilada (p.ej. 1 ml del extracto + 3 ml de agua)
- utilice 50 μ l del filtrado diluido por pocillo para su análisis en el test

10. Procedimiento

10.1. Preparativo

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de su uso.
2. La reacción comienza con la adición del anticuerpo específico. Sin embargo, no se deberían utilizar más de tres tiras por test si se trabaja con una pipeta monocanal. Es posible analizar hasta 6 tiras al mismo tiempo utilizando una pipeta repetidora (multistep).
3. Devuelva todos los reactivos a una temperatura entre 2 - 8 °C (36 - 46 °F) inmediatamente después de ser utilizados.

Los estándares de deoxinivalenol (vomitoxina) se encuentran listos para su uso. El factor de dilución 20 de las muestras ya fue considerado durante el etiquetado de los estándares, por lo tanto la concentración de deoxinivalenol (vomitoxina) en la muestra puede ser leída directamente de la curva de estándares.

Como **tampón de lavado** es necesario un tampón PBS-Tween. Por favor utilice para ello la sal de tampón adjunta (vea 4.). Para la preparación del tampón se disuelve el contenido completo del sobre en un litro de agua destilada. El tampón disuelto se mantiene estable entre 4 y 6 semanas a una temperatura de 2 a 8 °C (36 a 46 °F).

Alternativa: Disolver el contenido del sobre en 100 ml de agua destilada (10 veces concentrado). Para preparar la disolución lista para el empleo se mezcla 1 parte del concentrado (de 10 veces) con 9 partes de agua destilada.

La solución (10 veces concentrado) es estable de 8 a 12 semanas a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

El tampón de lavado se requiere sólo para muestras de trigo (harinas y afrechos). Otro tipo de muestras también pueden ser procesadas utilizando esta solución.

10.2. Procedimiento

Un lavado exhaustivo es muy importante. No permita que los pocillos se sequen completamente. Evite intervalos prolongados entre los pasos de trabajo. La reproducibilidad de los resultados depende en gran parte de un lavado uniforme de los pocillos. Siga cuidadosamente la secuencia de lavado descrita en el procedimiento.

Cubra los pocillos durante los períodos de incubación evitando así la exposición directa a la luz del sol.

1. Coloque suficientes pocillos en el marco portapocillos para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
2. Agregue 50 μ l de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
3. Agregue 50 μ l del conjugado de oxinivalenol-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Agregue 50 μ l de anticuerpo anti-deoxinivalenol (tapón negro) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 5 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
5. Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos (250 μ l por pocillo) con agua destilada (tampón de lavado para muestras de trigo, vea 10.1.) utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más.
6. Agregue 100 μ l de substrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 3 minutos (+/- 0,5) en la oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
7. Agregue 100 μ l de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

11. Resultados

Para la evaluación y análisis de los resultados se puede obtener de R-Biopharm ó de su distribuidor local un software especial el RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999) para los RIDASCREEN[®] inmunoensayos enzimático.

Para determinaciones individuales recomendamos hacer el análisis usando Logit/log y para determinaciones duplicadas ó múltiples usar Cubic Spline.

El trazado de la curva de estándares se puede ver en el Certificado de Aseguramiento de la Calidad incluido en el ensayo.

Anotación para el cálculo sin el software:

$$\frac{\text{absorbancia estándar (ó muestra)}}{\text{absorbancia estándar cero}} \times 100 = \% \text{ absorbancia}$$

De esta forma, el estándar cero es igual a 100 % y los demás valores de absorción se indican en porcentaje. Los valores calculados para los estándares son aplicados a un sistema de coordenadas en papel semilogarítmico contra la concentración de deoxinivalenol (vomitoxina) [mg/kg].

La concentración de deoxinivalenol (vomitoxina) en [mg/kg] correspondiente a la absorción de cada muestra puede ser leída directamente de la curva de calibrado.

12. Sensibilidad

12.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Los valores del límite de detección (LOD) fueron investigados repitiendo mediciones (n = 10) de diferentes tipos de muestras blancos.

LOD = promedio de la concentración + 2 x la desviación de la medición (s.d.).

Y los valores del límite de cuantificación (LOQ) como a continuación:

LOQ = promedio de la concentración + 10 x la desviación de la medición

valores (ppb), n = 10	trigo	cebada	cebada malta ada	avena	maíz
Promedio	26,3	4,6	30,7	78,0	27,6
s.d.	14,1	3,8	15,9	28,2	11,5
LOD	54	12	62	134	51
LOQ	167	42	190	360	143

Todos los valores LOD fueron encontrados por debajo de 0,2 ppm. El valor para LOQ puede ser fijado a 0,2 ppm con excepción de avena (0,36 ppm).

13. Especificaciones del test

1. tiempo requerido para realizar el test (tiempo de incubacion): 8 minutos
2. rango de medicion: 0,2 - 6,0 ppm
3. mátrices aprovadas: trigo, cebada, cebada malta ada, avena, trigo
4. matrices validadas adicionalmente: harina de trigo, afrecho de trigo, salvado de trigo, sorgo, ojuelas de soya (soja), pasta de soya, piensos
5. especificidad: una diferenciación entre DON y 3-acetil-DON (actividad cruzada 213 %) no puede ser realizada; la actividad cruzada con otras substancias de esta clase tales como Nivalenol, 15-acetil-DON, Triacetil-DON, Triacetil-Nivalenol, Tetraacetil-DON y Fusarenol X es negligible o no existente

Datos de precisión y exactitud con muestras de trigo fortificadas (n = 90)

Fortificación (ppm)	0,5	1,0	2,5	5,0
Promedio (ppm)	0,526	1,0	2,4	4,1
s.d. (ppm)	0,095	0,224	0,240	0,435

Test comparativo con HPLC (método de referencia) en muestras de trigo naturalmente contaminadas

ELISA	promedio	0,841	4,020	2,302
(n = 30)	s.d.	0,156	0,328	0,147
<hr/>				
HPLC	promedio	0,6	3,88	2,28
(n = 5)	s.d	0,116	0,503	0,16

R-Biopharm no brinda garantía de ningún tipo, expresa o implícita, excepto que los materiales de los cuales sus productos son hechos corresponden a las normas estándares de calidad. Si algún material es defectuoso, R-Biopharm va a proceder al reemplazo del mismo. Quedan expresamente fuera de esta garantía la comerciabilidad de este producto, los daños directos o indirectos producidos por su uso indebido o por ser usados para propósitos no previstos en su diseño, los deterioros producidos por defectos de almacenaje, así como también los daños producidos como consecuencia de su utilización para otros fines.