

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Fumonisin**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Fumonisin

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
fumonisin

Art. No.: R3401

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® Fumonisin (Art. Nr.: R3401) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Fumonisin in Mais und Maisprodukten. Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten.

Der Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	extrahieren, filtrieren und verdünnen
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....45 min
Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz)	25 ppb
Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	von künstlich kontaminierten Maisgrießproben 50 und 500 µg/kg (ppb):.....ca. 60 % mittlerer Variationskoeffizient: .....ca. 8 %
Spezifität:	Die Spezifität des RIDASCREEN® Fumonisin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen im Puffersystem ermittelt.  Fumonisin B <sub>1</sub> ..... 100 % Fumonisin B <sub>2</sub> .....ca. 40 % Fumonisin B <sub>3</sub> .....ca. 100 %

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Fumonisin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Fumonisin in Mais und Maisprodukten.

## 2. Allgemeines

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

Die zur Auslösung toxischer Wirkungen erforderlichen Dosen an Fumonisin sind starken tierartlichen Unterschieden unterworfen. Beim Pferd wirken bereits Fumonisin-Konzentrationen von ca. 5 - 10 mg/kg im Futter neurotoxisch. Bei Schweinen führt die Aufnahme von 4 - 16 mg/kg Körpergewicht zu Leberzirrhose und ab 16 mg/kg Körpergewicht zu pulmonären Ödemen. Hühnerküken und Jungmasthähnchen reagieren erst auf eine hohe Konzentration (ab 75 mg/kg) von Fumonisin im Futter. Rinder scheinen dagegen gegenüber hohen Fumonisin-Konzentrationen relativ unempfindlich zu sein.

## 3. Testprinzip

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

## 4. Packungsinhalt

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

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Kavitäten, teilbar), beschichtet mit Fängerantikörpern
- 6 x Fumonisin-Standards <sup>\*)</sup>, je 1,3 ml  
0 ppm (Nullstandard), 0,025 ppm, 0,074 ppm, 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm Fumonisin in Methanol/Wasser, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (6 ml) .....roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes Fumonisin  
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-Fumonisin-Antikörper (6 ml).....schwarzer Verschluss  
gebrauchsfertig
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml).....brauner Verschluss  
rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml)..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure

\*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 70, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können die Fumonisin-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) 250 ml
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (300 ml) aus Glas
- Labor- oder Getreidemühle
- Ultra-Turrax
- optional: Schüttler
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

### 5.2. Reagenzien:

- Methanol
- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen
- 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 Fumonisin, besondere Vorsicht ist geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe verwenden).

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

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

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

Die 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 rötlich gefärbten 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 – Maisgrieß und Maismehl können direkt verwendet werden.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml 70 % Methanol \*) hinzufügen
- die Probe 2 min mit einem Ultra-Turrax homogenisieren oder 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren
- den filtrierten Probenextrakt 1:14 (1+13) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (z. B. 100 µl Extrakt + 1,3 ml dest. Wasser)
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

\*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen des Methanol/Wasser Gemisches angepasst werden, z. B. 50 g in 250 ml 70 % Methanol

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

**Die Fumonisin-Standardlösungen** liegen gebrauchsfertig vor. Der Verdünnungsfaktor 70 für die Proben wurde beim Etikettieren der Standardfläschchen bereits berücksichtigt. Deshalb kann die Fumonisin-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

### 10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

4. 50 µl der anti-Fumonisin-Antikörperlösung (schwarzer Verschluss) 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 saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl destilliertem Wasser waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min 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.

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 Fumonisin-Konzentration [mg/kg] auftragen. Die Fumonisin-Konzentration in mg/kg kann entsprechend der Extinktion jeder Probe direkt aus der Eichkurve abgelesen werden.

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<sup>®</sup> Fumonisin

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Fumonisin (Art. No.: R3401) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of fumonisin in corn and corn products.

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: 25 ppb  
(corresponding to the standard substance)

Recovery rate: in spiked semolina of corn samples  
(corresponding to the standard substance) 50 and 500 µg/kg (ppb): ..... approx. 60 %  
mean coefficient of variation: ..... approx. 8 %

Specificity: The specificity of the RIDASCREEN<sup>®</sup> Fumonisin test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins in buffer system.

Fumonisin B<sub>1</sub> ..... 100 %  
Fumonisin B<sub>2</sub> ..... approx. 40 %  
Fumonisin B<sub>3</sub> ..... approx. 100 %

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Fumonisin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of fumonisin in corn and corn products.

## 2. General

Fumonisin is a carcinogenic, neuro, hepato and pneumo toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, a mould fungus which grows host-specific on corn.

The dose of fumonisin for the release of toxic effects differs significantly depending on the animal species. A concentration of approx. 5 - 10 mg/kg fumonisin in feed induces neuro toxic effects in horses. In pigs the ingestion of 4 - 16 mg/kg body weight may result in liver cirrhosis and more than 16 mg/kg body weight may lead to pulmonary edema. Chickens tolerate higher concentrations of fumonisin in feed, up to 75 mg/kg. Cattle seem to be insensitive to high fumonisin concentrations.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-fumonisin antibodies.

Fumonisin standards or sample solutions, fumonisin enzyme conjugate and anti-fumonisin antibodies are added. Free fumonisin and fumonisin enzyme conjugate compete for the fumonisin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-fumonisin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the fumonisin concentration in the sample.

## 4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 removable wells each)  
coated with capture antibodies
- 6 x Fumonisin standard solutions <sup>\*)</sup>, 1.3 ml each  
0 ppm (zero standard), 0.025 ppm, 0.074 ppm, 0.222 ppm, 0.666 ppm, 2 ppm  
fumonisin in methanol/water, ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml) .....red cap  
peroxidase conjugated fumonisin  
ready to use
- 1 x Anti-fumonisin antibody (6 ml) ..... black cap  
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

\*) The dilution factor 70 for the sample has already been considered. Therefore, the fumonisin 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) 250 ml
- glassware for preparing sample extract: filter funnel and 300 ml flask
- grinder (mill)
- Ultra-Turrax
- optional: shaker
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

### 5.2. Reagents:

- methanol
- 70 % methanol solution: prepare 70 % methanol solution by mixing 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled water
- distilled (or deionized) water

## 6. Warnings and precautions for the users

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

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

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

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

## 7. Storage instructions

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

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

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

The 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 from light.

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure – semolina of corn and corn meal could be used directly.

- weigh 5 g of ground sample into a suitable container and add 25 ml of 70 % methanol \*)
- blend the sample by Ultra-Turrax for 2 minutes or shake vigorously for 3 minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through Whatman No. 1 filter
- dilute the filtered sample extract 1:14 (1+13) with distilled or deionized water (e. g. 100 µl extract + 1.3 ml water)
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

\*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g.: 50 g in 250 ml of 70 % methanol

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

**The fumonisin standards** are provided ready to use. The dilution factor 70 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the fumonisin concentration of samples can be read directly from the standard curve.

### 10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of microtiter wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to each well.

4. Add 50 µl of anti-fumonisin antibody solution (black cap) 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 distilled water and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) 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 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 the 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 fumonisin concentration [mg/kg].

The fumonisin concentration in mg/kg corresponding to the absorbance of each sample can be read directly from the calibration curve.

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.