

RIDASCREEN[®] T-2 Toxin

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
T-2 Toxin

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
T-2 toxin

Art. No.: R3801

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

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

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® T-2 Toxin (Art. Nr.: R3801) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 Toxin in Getreide und Futtermitteln. 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)..... 1 h 30 min
Nachweisgrenze:	< 5 ppb (ca. 3,5 µg/kg)
Wiederfindungsrate:	in künstlich kontaminierten Getreideproben 90 % ± 10 %
Spezifität:	Die Spezifität des RIDASCREEN® T-2 Toxin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen ermittelt. T-2 Toxin 100 % Acetyl T-2 Toxin ca. 114 % HT-2 Toxin ca. 7 % Iso T-2 Toxin ca. 2 %

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® T-2 Toxin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 Toxin in Getreide und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Das Mykotoxin T-2 Toxin gehört zur Gruppe der Trichothecene und wird von Pilzen der Fusarienarten gebildet. Man findet dieses Toxin häufig in landwirtschaftlichen Produkten, wobei die Kontamination und die Konzentrationen regional sehr unterschiedlich sind. Aufgrund der hohen zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkungen stellt T-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 Toxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes T-2 Toxin (Enzymkonjugat) und anti-T-2 Toxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes T-2 Toxin konkurrieren um die T-2 Toxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-T-2 Toxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes T-2 Toxin wird anschließend in einem Waschschriff wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und 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 T-2 Toxin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 6 x Standardlösungen, je 1,3 ml
0 ppb (Nullstandard), 0,1 ppb, 0,2 ppb, 0,4 ppb, 0,8 ppb, 1,6 ppb
T-2 Toxin in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (5 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes T-2 Toxin
gebrauchsfertig
- 1 x Anti-T-2 Toxin-Antikörper (5 ml)schwarzer Verschluss
monoklonal, gebrauchsfertig
- 1 x Substrat (7 ml)grüner Verschluss
enthält Harnstoffperoxid
- 1 x Chromogen (7 ml)blauer Verschluss
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Probenverdünnungspuffer (50 ml)

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

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

5.2. Reagenzien:

- Methanol
- zur Probenverdünnung (für Verdünnungen > Verdünnungsfaktor 35):
PBS-Puffer, pH 7,2: (0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g
NaCl auf 1000 ml Methanol/dest. Wasser 10/90 (v/v) auffüllen

Dieser Puffer muss 10 % Methanol enthalten, damit die Proben im Test immer in 10 % Methanol eingesetzt werden (siehe auch 9.1.).

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten T-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.

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

Die farblose Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

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

9.1. Getreide und Futtermittel

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und in 25 ml Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v) lösen *)
- 10 min auf dem Magnetrührer extrahieren
- den Extrakt über einen Papierfilter filtrieren oder zentrifugieren
- das Filtrat bzw. den Überstand 1:7 (1+6) mit Probenverdünnungspuffer (siehe 4.) verdünnen (z. B. 50 µl Filtrat oder Überstand + 300 µl Probenverdünnungspuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen (wenn T-2 Toxingehalte von weniger als 56 ppb erwartet werden)

*) 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 Toxingehalten (> 56 ppb) muss der 1:7 verdünnte Extrakt weiter verdünnt werden, z. B. 1:10 (1+9) mit PBS-Puffer, der 10 % Methanol enthält (siehe 5.2.), z. B. 50 µl verdünnter Extrakt + 450 µl PBS-Puffer mit 10 % Methanol.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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 Enzymkonjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl der anti-T-2 Toxin-Antikörperlösung in jede Kavität pipettieren (schwarzer Verschluss). Vorsichtig manuell mischen und 1 h 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 mit dest. Wasser waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 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 (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 T-2 Toxin-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

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

Getreide, Futtermittel.....35 (bzw. 350)

Der Messbereich der Standardkurve liegt somit zwischen 3,5 und 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) (bzw. zwischen 35 und 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)) T-2 Toxin für Getreide- und Futtermittelproben.

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 Toxin

Brief information

RIDASCREEN[®] T-2 Toxin (Art. No.: R3801) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of T-2 toxin in cereals and feed.

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) approx. 1 h 30 min

Detection limit: < 5 ppb (approx. 3.5 µg/kg)

Recovery rate: in spiked cereal samples approx. 90 % ± 10 %

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

T-2 toxin..... 100 %
Acetyl T-2 toxin approx. 114 %
HT-2 toxin approx. 7 %
Iso T-2 toxin approx. 2 %

1. Intended use

RIDASCREEN® T-2 Toxin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of T-2 toxin in cereals and feed.

2. General

T-2 toxin belongs to the trichothecene group of mycotoxins and is formed by fungi of the genus *Fusarium*. T-2 toxin is often found in agricultural commodities, although the incidence and the concentrations found show a broad regional variation. Due to its cytotoxic and immunosuppressive mode of action T-2 toxin is 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 toxin antibodies. T-2 toxin standards or sample solutions, T-2 toxin enzyme conjugate and anti-T-2 toxin antibodies are added. Free T-2 toxin and T-2 toxin enzyme conjugate compete for the T-2 toxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-T-2 toxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the 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 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 (12 strips with 8 removable wells each)
coated with capture antibodies
- 6 x Standard solutions, (1.3 ml each)
0 ppb (zero standard), 0.1 ppb, 0.2 ppb, 0.4 ppb, 0.8 ppb, 1.6 ppb
T-2 toxin in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (5 ml)red cap
peroxidase conjugated T-2 toxin
ready to use
- 1 x Anti-T-2 toxin antibody (5 ml) black cap
monoclonal, ready to use
- 1 x Substrate (7 ml)green cap
contains urea peroxide
- 1 x Chromogen (7 ml) blue cap
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml)yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Sample dilution buffer (50 ml)

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- grinder (mill)
- magnetic stirrer
- paper filter or centrifuge
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

–methanol

–for dilution of samples (for dilutions > dilution factor of 35):

PBS buffer, pH 7.2: (0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl; fill up to 1000 ml with methanol/distilled water 10/90 (v/v)

This buffer has to contain 10 % methanol in order to keep a 10 % methanol concentration of the samples used in the assay (also see section 9.1.).

6. Warnings and precautions for the users

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

Decontamination of the glassware and T-2 toxin 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).

T-2 toxin is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The colorless 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 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. Cereals and feed

- weigh 5 g of sample and dissolve with 25 ml of methanol/distilled water 70/30 (v/v) for extraction *)
- stir the extract for 10 min on a magnetic stirrer
- filter the extract over paper filter or centrifuge the extract
- dilute the filtrate or the supernatant 1:7 (1+6) with sample dilution buffer (see 4.), e. g. 50 µl of filtrate or supernatant + 300 µl of sample dilution buffer
- use 50 µl per well in the assay (if T-2 toxin concentrations less than 56 ppb are expected)

*) 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 toxin concentrations (> 56 ppb) the 1:7 diluted extract solution must be further diluted e. g. 1:10 (1+9) with PBS buffer containing 10 % methanol (see 5.2.), e. g. 50 µl of the diluted extract solution + 450 µl PBS buffer with 10 % methanol.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

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 enzyme conjugate (red cap) to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of the anti-T-2 toxin antibody (black cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h 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 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
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[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] 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 toxin concentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

In order to obtain the T-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:

cereals, feed.....35 (or 350)

Therefore, the standard curve is in the range of 3.5 to 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) (or in the range of 35 to 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)) T-2 toxin for cereal or feed samples.

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.