

r-biopharm®



RIDASCREEN® FAST Ochratoxin A

Art. No. R5402

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A

Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de ocratoxina A

In vitro Test / Prueba *in vitro*

Lagerung bei 2-8 °C

Storage at 2-8 °C

Almacenar a 2-8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Contacto para preguntas e información adicional:

Zentrale/Switchboard/Conmutador

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

Auftragsannahme/Order department/Departamento de pedidos

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

E-Mail/Correo electrónico: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales/Ventas y mercadotecnia

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

E-Mail/Correo electrónico: info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Marken 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 R-Biopharm AG
Fabricante: R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG cuenta con la certificación ISO 9001.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (Art. Nr. R5402) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Mais, Weizen, Gerste, Hafer (Körner) und Futtermitteln.

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

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

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer. Bitte beachten Sie, dass für die Auswertung folgende Methode verwendet werden muss: Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins FAST\R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met.

Probenvorbereitung: extrahieren, zentrifugieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Mais, Weizen, Gerste, Hafer ca. 20 min
Futtermittel ca. 20 min
Testdurchführung (Inkubationszeit) 8 min

Nachweisgrenze: Mais 1,3 µg/kg (ppb)
Weizen 1,5 µg/kg (ppb)
Gerste 1,5 µg/kg (ppb)
Hafer 2,0 µg/kg (ppb)
Futtermittel 2,8 µg/kg (ppb)

Wiederfindungsrate: Mais 100 +/- 30 %
(natürlich kontaminierte Proben - TRILOGY®) Weizen 100 +/- 30 %
Futtermittel 80 - 130 %

Wiederfindungsrate: Mais (FAPAS) 60 - 130 %
(dotierte Proben) Weizen (FAPAS) 60 - 100 %
Gerste (FAPAS) 60 - 100 %
Hafer (Körner) 60 - 130 %
Futtermittel (FAPAS) 100 +/- 30 %

Hinweis: Der Assay wurde mit natürlich kontaminierten Proben überprüft. Abweichungen in der Wiederfindung von dotierten Proben sind möglich.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittel-analytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDASCREEN® Ochratoxin A (R1312)

RIDA® Ochratoxin A column (R1303)

TRILOGY® Certified Liquid Standard Ochratoxin A (CTSL-520-5)

TRILOGY® Liquid Standard Ochratoxin A (TSL-504-5)

TRILOGY® Dried Standard Ochratoxin A (TS-503-5)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A Test ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Mais, Weizen, Gerste, Hafer (Körner) und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Das Mykotoxin Ochratoxin A wird von Pilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet. Neben der ausgeprägten Nephrotoxizität weist Ochratoxin A hepatotoxische, teratogene, kanzerogene und immunsuppressive Eigenschaften auf.

Eine Gesundheitsgefährdung des Menschen besteht nicht nur über die Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft, sondern auch über Lebensmittel tierischer Herkunft. So wurde Ochratoxin A in Schweineblut und -nieren nachgewiesen sowie in Menschenblut und Muttermilch.

3. Testprinzip

Grundlage des Enzymimmunoassays ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen Ochratoxin A beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probenlösungen sowie enzymmarkiertes Ochratoxin A (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes Ochratoxin A konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen

(kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Ochratoxin A wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Ochratoxin A-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können bis zu 42 Bestimmungen durchgeführt werden (plus 6 Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
ECO extractor ECO Extractor	transparent	Konzentrat 10fach		2 x 120 ml
Standard 1* Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	1 µg/L	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/L	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	10 µg/L	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	30 µg/L	1,3 ml
Standard 6* Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	100 µg/L	1,3 ml
Wash buffer salt Tween** Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits einen Verdünnungsfaktor von 10, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können Ochratoxin A-Konzentrationen in µg/kg bzw. in µg/L der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

**) Der gebrauchsfertige Waschpuffersalz Tween Puffer (Herstellung siehe 10.1) wird als Proben- und Waschpuffer verwendet.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Labor- oder Getreidemühle
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- Zentrifuge (≥ 3.500 g)
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- (Horizontal)-Schüttler
- Vortexmischer
- variable 50 μ l, 100 μ l und 1000 μ l Mikroliterpipetten

5.2. Reagenzien

- 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 Ochratoxin A, Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

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

Dieses Testkit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.com.

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 sollte direkte Lichteinwirkung vermieden werden.

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 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Extraktionspuffer

Für die Extraktion wird der verdünnte ECO Extractor benötigt. Um diesen herzustellen, verdünnen Sie bitte den ECO Extractor (10fach Konzentrat) 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser. Der verdünnte ECO Extractor ist eine Woche bei 2 - 8 °C haltbar. Beim Auftreten einer Trübung im verdünnten ECO Extractor (z.B. verursacht durch Kontaminationen) ist dieser zu verwerfen.

9.2. Extraktion für Mais, Weizen, Gerste, Hafer (Körner) und Futtermittel

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchführen.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahmeverfahren gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen (empfohlene Korngröße: 500 µm).

Wir empfehlen bei unbekanntem Proben ein zusätzliches Replikat herzustellen.

- 10 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe einwiegen (z.B. 125 ml HDPE-Flasche) und 50 ml verdünnten ECO Extractor hinzufügen
- Probe kurz vortexen (10 Sekunden)
- 5 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Horizontalschüttler bei 420 rpm)
- 5 min bei 3.500 g und Raumtemperatur (20 - 25 °C) zentrifugieren
- 1 ml des Überstandes mit 1 ml gebrauchsfertigem Waschpuffersalz Tween Puffer (Probenpuffer; siehe 10.1) verdünnen
- 50 µl des verdünnten Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung: Proben, die außerhalb des Messbereiches (> 100 µg/kg (ppb)) gemessen werden, empfehlen wir 1:10 bzw. maximal 1:20 mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (siehe 10.1.) weiter zu verdünnen. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor von 10 (1:10 Verdünnung) bzw. 20 (1:20 Verdünnung) ist bei der Kalkulation zu berücksichtigen (d.h. die Ergebnisse müssen noch mit 10 bzw. 20 multipliziert werden).

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und den Test bei Raumtemperatur durchführen.
2. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

Als **Waschpuffer** sowie Probenpuffer 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.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Daher sollte die Abarbeitung zügig erfolgen. Für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist ein gleichmäßiges Waschen der Kavitäten erforderlich. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten. Es dürfen nicht mehr als 3 Streifen pro Testlauf abgearbeitet werden.

Bei allen Inkubationsschritten direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Deshalb sollte die Mikrotiterplatte abgedeckt werden.

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 Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 5 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 3 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

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

Bitte beachten Sie, dass für die Auswertung folgende Methode Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins FAST\R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met verwendet werden muss.

Die Auswertung erfolgt mit Logit/log.

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 Ochratoxin A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

Die Ochratoxin A-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Standardkurve 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®FAST Ochratoxin A

Brief information

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (Art. No. R5402) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in corn, wheat, barley, oats (grains), and feed.

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

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

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification. Please note that the following method must be used for the evaluation: Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met.

Sample preparation: extraction, centrifugation, dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
Corn, wheat, barley, oatsapprox. 20 min
Feed.....approx. 20 min
Test implementation (incubation time).....8 min

Limit of detection: Corn 1.3 µg/kg (ppb)
Wheat..... 1.5 µg/kg (ppb)
Barley..... 1.5 µg/kg (ppb)
Oats 2.0 µg/kg (ppb)
Feed..... 2.8 µg/kg (ppb)

Recovery rate: Corn 100 +/- 30 %
(naturally contaminated samples - TRILOGY®) Wheat..... 100 +/- 30 %
Feed..... 80 -130 %

Recovery rate: Corn (FAPAS) 60 - 130 %
(spiked samples) Wheat (FAPAS)..... 60 - 100 %
Barley (FAPAS)..... 60 - 100 %
Oats (grains) 60 - 130 %
Feed (FAPAS)..... 100 +/- 30 %

Note: The assay was checked using naturally contaminated samples. Deviations in the recovery of spiked samples are possible.

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

Related products

RIDASCREEN® Ochratoxin A (R1312)

RIDA® Ochratoxin A column (R1303)

TRILOGY® Certified Liquid Standard Ochratoxin A (CTSL-520-5)

TRILOGY® Liquid Standard Ochratoxin A (TSL-504-5)

TRILOGY® Dried Standard Ochratoxin A (TS-503-5)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in corn, wheat, barley, oats (grains), and feed.

2. General

The mycotoxin ochratoxin A is formed by fungi of the species *Aspergillus* and *Penicillium*. Apart from a marked nephrotoxicity, ochratoxin A displays hepatotoxic, teratogenic, carcinogenic and immunosuppressive properties.

There is a risk to human health not only through the intake of contaminated foods of vegetable origin, but also through foods of animal origin. Ochratoxin A has been detected in pig blood and kidneys, as well as in human blood and mother's milk.

3. Test principle

The basis of the enzyme immunoassay is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with specific antibodies against ochratoxin A. Ochratoxin A standards or the sample solutions and enzyme conjugate are added. Free and enzyme-conjugated ochratoxin A compete for the ochratoxin A antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is 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 absorption is inversely proportional to the ochratoxin A concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for as many as 42 analyses (plus 6 standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
ECO extractor	transparent	Concentrate 10fold		2 x 120 ml
Standard 1*	white	Ready to use	0 µg/L	1.3 ml
Standard 2*	white	Ready to use	1 µg/L	1.3 ml
Standard 3*	white	Ready to use	3 µg/L	1.3 ml
Standard 4*	white	Ready to use	10 µg/L	1.3 ml
Standard 5*	white	Ready to use	30 µg/L	1.3 ml
Standard 6*	white	Ready to use	100 µg/L	1.3 ml
Wash buffer salt Tween**		Dissolve the salt		
Conjugate	red	Ready to use		3 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	yellow	Ready to use		14 ml

- *) The dilution factor 10 for the sample preparation has already been considered. Therefore, the ochratoxin A concentrations (µg/kg or µg/L) of samples can be read directly from the standard curve.
- ***) The ready-to-use wash buffer (see preparation 10.1) is used as sample and wash buffer.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment

- laboratory or grain mill
- graduated cylinder (plastic or glass) 100 ml
- centrifuge ($\geq 3,500$ g)
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- (horizontal) shaker
- Vortex mixer
- variable 50 μ l - 100 μ l and 1000 μ l micropipettes

5.2. Reagents

- 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 standards contain ochratoxin A. Particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

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

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

7. Storage instructions

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

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

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 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1. Extraction buffer

For extraction, the diluted ECO extractor is needed. To obtain the ready-to-use ECO extractor, dilute the ECO Extractor (10x Concentrate) 1:10 with distilled or deionised water. The diluted ECO Extractor is stable for one week at 2 - 8 ° C (36 – 46 °F). If turbidity occurs in the diluted ECO extractor (possibly caused by contamination), discard or do not use it.

9.2. Extraction of corn, wheat, barley, oats (grains) and feed

Bring all reagents and samples to room temperature (20 – 25 °C / 68 – 77 °F) before use and perform the sample preparation at room temperature.

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure (recommended particle size: 500 µm).

We recommend to produce an additional replica per unknown sample.

- Weigh 10 g of ground and homogenized sample into a suitable container (e.g. 125 ml bottle) and add 50 ml of diluted ECO extractor
- Vortex the sample briefly (10 seconds)
- Shake the sample vigorously for 5 minutes (manually or with shaker at 420 rpm)
- Centrifuge for 5 min at 3,500 g and room temperature (20 – 25 °C; 36 – 46 °F)
- Dilute 1 ml of the supernatant with 1 ml of ready-to-use wash buffer (sample buffer, see 10.1.)
- Add 50 µl of the diluted supernatant per well in the assay

Note: Samples measured outside the measurement range of > 100 µg/kg (ppb) are recommended to be further diluted 1:10 or maximum 1:20 with ready-to-use wash buffer (see 10.1.). The resulting dilution factor of 10 (1:10 dilution) or 20 (1:20 dilution) should be taken into account in the calculation (i.e. the results must still be multiplied by 10 and 20, respectively).

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use and perform the test at room temperature.
2. Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

As **wash buffer** and sample 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 wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks when stored 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. The 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks when stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

10.2. Test procedure

Accurate washing is very important. Do not allow microwells to dry up completely and avoid prolonged intervals between the working steps. Therefore, the processing should be done quickly. Carefully follow the recommended washing procedure as outlined in the test procedure. Reproducibility in any enzyme immunoassay is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. It may not be processed more than 3 strips per test run.

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. Pipette 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 conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 min at room temperature (20 – 25 °C / 68 – 77 °F) in the dark.
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 3 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 – 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µl of stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 15 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A specific software, the RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996), is available to evaluate the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

Please note that the following method Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met must be used for the evaluation.

The evaluation is done with logit/log.

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 ochratoxin A concentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

The ochratoxin A concentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponding to the extinction of each sample can be read from the calibration curve.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A

Información breve

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (REF. R5402) es un inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de Ocratoxina A en maíz, trigo, cebada, avena y piensos.

Todos los reactivos requeridos para el inmunoensayo enzimático, incluyendo los estándares, se suministran en el kit.

Un kit permite realizar 48 determinaciones (incluyendo estándares).

Para cuantificar se requiere un espectrofotómetro (lector de placas ELISA). Es necesario usar el siguiente método para la evaluación de resultados: Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met.

Preparación de la muestra: extracción, centrifugación, dilución

Tiempo requerido:	preparación de la muestra (para 10 muestras)
	Maíz, trigo, cebada, avenaaprox. 20 min
	Piensosaprox. 20 min
	Tiempo de incubación8 min

Límite de detección:	Maíz 1,3 µg/kg (ppb)
	Trigo..... 1,5 µg/kg (ppb)
	Cebada 1,5 µg/kg (ppb)
	Avena..... 2,0 µg/kg (ppb)
	Piensos 2,8 µg/kg (ppb)

Tasa de recuperación: (muestras naturalmente contaminadas – TRILOGY®)	Maíz 100 +/- 30 %
	Trigo..... 100 +/- 30 %
	Piensos 80 – 130 %

Tasa de recuperación: (muestras fortificadas)	Maíz (FAPAS) 60 - 130 %
	Trigo (FAPAS)..... 60 - 100 %
	Cebada (FAPAS) 60 - 100 %
	Avena..... 60 - 130 %
	Piensos (FAPAS) 100 +/- 30 %

Nota: La prueba fue verificada con muestras naturalmente contaminadas. Es posible que haya desviaciones en la recuperación de las muestras fortificadas.

Para aumentar la calidad de la evaluación al llevar a cabo procedimientos de ELISA, le aconsejamos consultar nuestro manual de prácticas recomendadas para ELISA (Good ELISA Practice (GEP) – Manual). En él se indican las condiciones generales cuando se utilizan kits de R-Biopharm AG y se realizan análisis de ELISA. El manual se puede consultar, imprimir y descargar del sitio web www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Productos relacionados

RIDASCREEN® Ochratoxin A (R1312)

RIDA® Ochratoxin A column (R1303)

TRILOGY® Certified Liquid Standard Ochratoxin A (CTSL-520-5)

TRILOGY® Liquid Standard Ochratoxin A (TSL-504-5)

TRILOGY® Dried Standard Ochratoxin A (TS-503-5)

1. Utilización

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de Ocratoxina A en maíz, trigo, cebada, avena y piensos.

2. Información general

La micotoxina Ocratoxina A es producida por los mohos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. La Ocratoxina A tiene efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos, teratogénicos, cancerígenos e inmunosupresores.

El riesgo para la salud de las personas se presenta no solamente a través de la ingesta de alimentos contaminados, de origen vegetal, sino también a través de alimentos de origen animal. Ocratoxina A ha sido detectada en sangre y riñones de cerdo, así como en sangre humana y leche materna.

3. Fundamento del test

El ensayo se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los micropocillos están recubiertos con anticuerpos específicos contra la Ocratoxina A. En ellos se añaden los estándares de Ocratoxina A o los extractos de muestra y el conjugado. La Ocratoxina A libre y el conjugado compiten por los sitios de unión de los anticuerpos para Ocratoxina A (inmunoensayo enzimático competitivo). A continuación, con el lavado se retira todo el conjugado no unido. Se agrega sustrato/cromógeno a los pocillos y se incuba. El conjugado convierte el cromógeno en un compuesto de color azul. La adición del reactivo de parada provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medida se realiza

fotométricamente a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de Ocratoxina A en la muestra.

4. Contenido del kit

Cada kit contiene el material necesario para realizar un máximo de 42 determinaciones (mas 6 determinaciones de estándares). Cada kit de ensayo contiene:

Componente	Color del tapón	Presentación		Volumen
Microtiter plate Microplaca	-	Listo para usar		48 pocillos
ECO extractor Solución de extracción ECO	transparente	Concentrado 10x		2 x 120 ml
Standard 1* Estándar 1*	blanco	Listo para usar	0 µg/l	1,3 ml
Standard 2* Estándar 2*	blanco	Listo para usar	1 µg/l	1,3 ml
Standard 3* Estándar 3*	blanco	Listo para usar	3 µg/l	1,3 ml
Standard 4* Estándar 4*	blanco	Listo para usar	10 µg/l	1,3 ml
Standard 5* Estándar 5*	blanco	Listo para usar	30 µg/l	1,3 ml
Standard 6* Estándar 6*	blanco	Listo para usar	100 µg/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween** Sales de tampón de lavado Tween**		Disolver las sales		
Conjugate Conjugado	rojo	Listo para usar		3 ml
Substrate/Chromogen Sustrato/cromógeno Cromógeno rojo Pro	marrón	Listo para usar		10 ml
Stop solution Reactivo de parada	amarillo	Listo para usar		14 ml

*) Se considera el factor de dilución 10 de la preparación de la muestra. Por tanto, la concentración de ocratoxina A (µg/kg o µg/L) de las muestras puede leerse directamente de la curva de calibración.

***) El tampón de lavado listo para usar (ver preparación 10.1) se usa como tampón de muestra y como tampón de lavado.

5. Reactivos adicionales y accesorios requeridos

5.1. Equipo

- molino de grano o de laboratorio
- probeta graduada (plástico o vidrio) de 100 ml
- centrífuga (≥ 3500 g)
- espectrofotómetro para microplacas (450 nm)
- agitador (horizontal)
- Agitador vórtex
- micropipetas de volumen variable, de 50 μ l - 100 μ l y 1000 μ l

5.2. Reactivos

- agua destilada o desionizada

6. Precauciones

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Se deben seguir las instrucciones de uso al pie de la letra.

Los estándares contienen Ocratoxina A. Deben extremarse las precauciones. Evitar el contacto del reactivo con la piel (utilizar guantes).

La mejor manera de descontaminar el material de vidrio y las soluciones de Ocratoxina A es con una solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 10 % (v/v) durante toda la noche (ajustar el pH de la solución a 7 con HCl).

Este kit puede contener sustancias peligrosas. Para ver la información sobre el riesgo de las sustancias que contiene, consultar las fichas de datos de seguridad (SDS) de este producto, disponibles en www.r-biopharm.com.

7. Conservación de reactivos

Almacenar el kit a una temperatura de 2 - 8 °C (35 - 46 °F). **No congelar ninguno de los componentes del kit de ensayo.**

Volver a guardar los micropocillos no usados en la bolsa de aluminio original, con el desecante suministrado cerrar y almacenarlos de nuevo a una temperatura de 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

El sustrato/cromógeno es sensible a la luz; por lo tanto, debe evitarse la exposición a la luz directa.

La garantía de calidad no es válida después de la fecha de caducidad del kit (ver la etiqueta del kit).

El kit del ensayo puede usarse normalmente al menos hasta la fecha de caducidad (indicada en el envase del kit) si se almacena correctamente.

No utilice reactivos de otros kits con diferentes números de lote.

8. Inestabilidad o deterioro de reactivos

- una coloración azulada del sustrato/cromógeno antes de la realización del ensayo
- un valor inferior a 0,8 unidades de absorbancia ($A_{450\text{ nm}} < 0,8$) del estándar cero

9. Preparación de las muestras

Las muestras deben almacenarse en un lugar fresco, protegidas de la luz.

9.1. Tampón de extracción

Para la extracción, se necesita la solución de extracción ECO diluida. Para preparar la solución de extracción ECO lista para usar, diluir la solución de extracción ECO concentrada 10x) 1:10 con agua destilada o desionizada. La solución de extracción ECO diluida es estable durante una semana a 2 - 8 °C (36 - 46 °F). Si la solución de extracción ECO está turbia (posiblemente debido a la contaminación), se debe desechar o no utilizarse.

9.2. Extracción de maíz, trigo, cebada, avena y piensos

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de usarlos y realizar la preparación de la muestra a temperatura ambiente.

Se debe moler y mezclar bien una muestra representativa (siguiendo las técnicas de toma de muestras aceptadas) antes realizar el procedimiento de extracción (tamaño de partículas recomendado: 500 µm).

Se recomienda analizar por duplicado las muestras desconocidas.

- pesar 10 g de muestra molida y homogeneizada en un recipiente adecuado (p. Ej., un frasco de 125 ml) y añadir 50 ml de la solución de extracción ECO diluida
- agitar la muestra brevemente (10 segundos)
- agitar la muestra vigorosamente durante 5 minutos (de forma manual o con un agitador a 420 rpm)

- centrifugar durante 5 min a 3500 g, a temperatura ambiente (20 – 25 °C; 36 – 46 °F)
- diluir 1 ml de sobrenadante con 1 ml de tampón de lavado listo para usar (tampón de muestra, ver 10.1.)
- pipetear 50 µl del sobrenadante diluido en el correspondiente pocillo del ensayo

Nota: Se recomienda diluir 1:10 o 1:20 como máximo las muestras con valores fuera del rango de medida de > 100 µg/kg (ppb), utilizando tampón de lavado listo para usar (ver 10.1.). En el cálculo debe tenerse en cuenta el factor de dilución resultante: 10 (para dilución 1:10) o 20 (para dilución 1:20); es decir, los resultados deben multiplicarse por 10 o por 20, respectivamente.

10. Procedimiento

10.1. Comentarios preliminares

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de usarlos, y realizar el ensayo a temperatura ambiente.
2. Volver a guardar todos los reactivos a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) inmediatamente después de usarlos.

Como tampón de lavado y tampón de muestra, se utiliza el tampón de PBS Tween. Usar las sales de tampón incluidas en el kit (consultar 4.). Disolver el sobre completo de sales de tampón en un litro de agua destilada. El tampón de lavado listo para usar es estable durante aproximadamente 4 - 6 semanas si se almacena a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternativa: Disolver el contenido del sobre en 100 ml de agua destilada para obtener el tampón de lavado concentrado 10x. El concentrado 10x es estable durante aproximadamente 8 - 12 semanas si se almacena a temperatura ambiente (20 - 25 °C/ 68 - 77 °F). Usar 1 parte de este concentrado y disolver con 9 partes de agua destilada para obtener el tampón de lavado listo para usar.

10.2. Ejecución del ensayo

El lavado de los micropocillos es muy importante. Los micropocillos no deben secarse por completo y hay que evitar intervalos prolongados entre los pasos de trabajo. Es decir, el procedimiento debe llevarse a cabo rápidamente. Seguir atentamente las indicaciones de lavado recomendadas, tal como se describe en el procedimiento del ensayo. La reproducibilidad de cualquier EIA depende en gran medida de la correcta realización del lavado de los micropocillos. No deben procesarse más de 3 tiras de micropocillos por análisis.

Evitar la luz solar directa durante todas las incubaciones. Es decir, se recomienda cubrir las microplacas durante la incubación.

1. Insertar en el soporte un número suficiente de pocillos para todos los estándares y muestras que se vayan a analizar. Anotar las posiciones de las muestras y los estándares.
2. Pipetear 50 µl de estándar o extracto de muestra en cada pocillo; usar una punta de pipeta nueva para cada estándar o muestra.
3. Añadir 50 µl de conjugado a cada pocillo. Mezclar suavemente, agitando la placa manualmente, e incubarla durante 5 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) en la oscuridad.
4. Vaciar el líquido de los pocillos y golpear vigorosamente el soporte de micropocillos invertido (tres veces seguidas) sobre un papel absorbente para asegurar la eliminación de todo el líquido de los pocillos. Llenar todos los pocillos con 250 µl de tampón de lavado (ver 10.1.) y volver a vaciar el líquido. Repetir el procedimiento de lavado otras dos veces.
5. Añadir 100 µl de sustrato/cromógeno en cada pocillo. Mezclar suavemente, agitando la placa manualmente, e incubarla durante 3 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) en la oscuridad.
6. Pipetear 100 µl de reactivo de parada en cada pocillo. Mezclar suavemente, agitando la placa manualmente, y medir la absorbancia a 450 nm. Leer durante los 15 minutos siguientes a la adición del reactivo de parada.

11. Resultados

Existe un software especial, RIDASOFT® Win.NET (Ref. Z9996), para evaluar los resultados de inmunoensayos enzimáticos RIDASCREEN®.

Es necesario usar el método Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met para la evaluación de resultados.

La evaluación se lleva a cabo con la función logit/log.

La forma de la curva de calibración puede verse en el Certificado de garantía de calidad incluido en el kit.

Procedimiento para el cálculo sin software:

Absorbancia estándar (o muestra) x 100 = % de absorbancia

Absorbancia estándar cero

El estándar cero se iguala a 100 % y los valores de absorbancia se indican en porcentaje. Los valores calculados para los estándares se representan en un sistema de coordenadas en papel semilogarítmico respecto a la concentración de Ocratoxina A [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

La concentración de Ocratoxina A en $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondiente a la absorbancia de cada muestra puede leerse en la curva de calibración.

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.