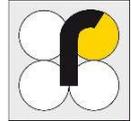


r-biopharm®



RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

REF R1312

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Ochratoxin A

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of ochratoxin A

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

R-Biopharm AG switchboard

Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Order department

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

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (Art. Nr. R1312) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Reis und Futtermitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: extrahieren, zentrifugieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Reis ca. 20 min
Futtermittel..... ca. 20 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

Nachweisgrenze: Mais0,5 µg/kg (ppb)
(Matrix-abhängig) Weizen0,5 µg/kg (ppb)
Gerste.....0,4 µg/kg (ppb)
Roggen1,2 µg/kg (ppb)
Reis0,8 µg/kg (ppb)
Futtermittel.....1,6 µg/kg (ppb)

Wiederfindungsrate: in künstlich kontaminierten Proben (Ø)
(bezogen auf die Gerste (FAPAS)80 - 100 %
Standardsubstanz) Roggen100 - 130 %
Reis75 - 130 %
Futtermittel.....60 - 100 %

in natürlich kontaminierten Proben (Ø)
Mais90 - 130 %
Weizen90 - 140 %
Futtermittel.....50 - 100 %

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

Spezifität:	Ochratoxin A	ca.100 %
	Ochratoxin C.....	ca. 37 %
	Ochratoxin B.....	ca. 2 %
	Ochratoxin α	ca. 9 %
	Ochratoxin β	< 0,02 %
	Deoxynivalenol	< 0,02 %
	Zearalenon	< 0,02 %
	Aflatoxin B1	< 0,02 %
	Fumonisin B1	< 0,02 %
	Citrinin	< 0,02 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Werten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Ochratoxin A

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (Art. Nr. R5402)

RIDA® Ochratoxin A column (Art. Nr. R1303)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (Art. Nr. 1312) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Reis 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 Schweinenieren sowie in Menschenblut und Muttermilch nachgewiesen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die 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 max. 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
ECO extractor ECO Extractor	Transparent	Konzentrat	10 x	2 x 120 ml
Standard 1 Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/L	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,03 µg/L	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	0,1 µg/L	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	0,3 µg/L	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	1 µg/L	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	3 µg/L	1,3 ml
Wash buffer salt Tween* Waschpuffersalz Tween	-	Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		6 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

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

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 3.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- (Horizontal-)Schüttler
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 50 µl und 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) 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 Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, siehe Kapitel 10.2. Testdurchführung) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen 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.

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

9.1. Extraktionspuffer

Für die Extraktion wird der verdünnte ECO Extractor benötigt. Um diesen herzustellen, verdünnen Sie bitte den ECO Extractor (10-fach Konzentrat) 1:10 mit destilliertem oder desionisiertem 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, Reis und Futtermittel

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

- 10 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe einwiegen (z. B. 125 ml HDPE-Flasche) und 50 ml gebrauchsfertigen 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 gebrauchsfertigen Waschpuffer Tween verdünnen
- 50 μl des verdünnten Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung

Mais-, Weizen-, Reis- und Futtermittelproben, die außerhalb des Messbereiches mit $> 30 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) gemessen werden, sollten 1:10 (1 + 9) mit Waschpuffer weiter verdünnt werden.

9.3. Extraktion für Roggen

- 5 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe einwiegen (z. B. 125 ml HDPE-Flasche) und 50 ml gebrauchsfertigen 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 gebrauchsfertigen Waschpuffer Tween verdünnen
- 50 μl des verdünnten Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung

Roggenproben, die außerhalb des Messbereiches mit $> 60 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) gemessen werden, sollten 1:10 (1 + 9) mit Waschpuffer weiter verdünnt werden.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** sowie Probenpuffer wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe Kapitel 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen (1 + 9).

Die Lösung (10-fach Konzentrat) ist ca. 8 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2 Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist ein gleichmäßiges Waschen der Kavitäten erforderlich. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Mehrkanal- oder einer Multistep-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

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 Standards bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung 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 30 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
5. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte für Doppelbestimmungen mittels Cubic Spline Funktion erfolgen.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem halblogarithmisch gegen die Ochratoxin A Konzentration [$\mu\text{g/l}$] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Ochratoxin A Konzentration in $\mu\text{g/l}$ ($\mu\text{g/kg}$) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Mais, Weizen, Gerste, Reis und Futtermittel.....	10
Roggen.....	20

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Ermittelte Werte in diesem Bereich sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ “< LoQ“ angegeben werden.

Ein Ergebnis unterhalb der LoD schließt nicht aus, dass eine Ochratoxin A Kontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt. Die Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend formuliert werden.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450 \text{ nm}}$) > Standard 6 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden. Weitere Verdünnungen sollten mit dem Waschpuffer durchgeführt werden.

13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse im Falle von Wiederholungsuntersuchungen bemerkbar macht. Hierdurch können besonders Proben, die an den charakteristischen Grenzen der Methode (LoD, LoQ, obere Grenze des Messbereichs) liegen, zwischen den Bereichen der Kalibrationskurve wechseln.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird außerdem empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Mykotoxin-freie und Mykotoxin-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-11-28	Freigabeversion
2020-03-23	Generelle Überarbeitung
2023-02-02	Aktuelle Version Generelle Überarbeitung und allgemeine redaktionelle Änderungen Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none">– 6. Vorsichtsmaßnahmen: Ergänzungen– Kapitel 12 - 15 hinzugefügt

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

Brief information

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (Art. No. R1312) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in corn, wheat, barley, rye, rice and feed.

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Extraction, centrifugation, dilution

Time requirement: Sample preparation (for 10 samples)
Corn, wheat, barley, rye, rice approx. 20 min
Feed approx. 20 min
Test implementation (incubation time)..... 45 min

Limit of detection: Corn 0.5 µg/kg (ppb)
(depending on matrix) Wheat 0.5 µg/kg (ppb)
Barley 0.4 µg/kg (ppb)
Rye 1.2 µg/kg (ppb)
Rice 0.8 µg/kg (ppb)
Feed 1.6 µg/kg (ppb)

Recovery rate: in artificially contaminated samples (Ø)
(corresponding to the Standard substance) Barley (FAPAS) 80 - 100 %
Rye 100 - 130 %
Rice 75 - 130 %
Feed 60 - 100 %

in naturally contaminated samples (Ø)
Corn 90 - 130 %
Wheat 90 - 140 %
Feed 50 - 100 %

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

Specificity:	Ochratoxin A.....	approx. 100 %
	Ochratoxin C.....	approx. 37 %
	Ochratoxin B.....	approx. 2 %
	Ochratoxin α	approx. 9 %
	Ochratoxin β	< 0.02 %
	Deoxynivalenol	< 0.02 %
	Zearalenon	< 0.02 %
	Aflatoxin B1	< 0.02 %
	Fumonisin B1	< 0.02 %
	Citrinin	< 0.02 %

The specificity of the RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 test was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related product and accessories for ochratoxin A determination

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (Art. No. R5402)

RIDA® Ochratoxin A column (Art. No. R1303)

1. Intended use

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (Art. No. R1312) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in corn, wheat, barley, rye, rice and feed.

2. General information

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 test 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 a maximum of 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Volume
Microtiter plate	-	Ready to use	96 wells
ECO extractor	Transparent	Concentrate	10 x 2 x 120 mL
Standard 1	White	Ready to use	0 µg/L 1.3 mL
Standard 2	White	Ready to use	0.03 µg/L 1.3 mL
Standard 3	White	Ready to use	0.1 µg/L 1.3 mL
Standard 4	White	Ready to use	0.3 µg/L 1.3 mL
Standard 5	White	Ready to use	1 µg/L 1.3 mL
Standard 6	White	Ready to use	3 µg/L 1.3 mL
Wash buffer salt Tween*		Dissolve the salt	
Conjugate	Red	Ready to use	6 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 mL

5. Reagents/Equipment required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mill / mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 3,500 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- (Horizontal) shaker
- Vortex mixer
- Graduated cylinder (plastic or glass) 100 mL
- Variable 20 - 200 μ L and 200 - 1000 μ L micropipettes
- If necessary: 8-channel pipette for 50 μ L and 100 μ L
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. 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 material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2.). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations

concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

7. Storage instructions

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

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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 is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for zero standard

9. Sample preparation

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 (recommended particle size: 500 µm).

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 deionized 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, rice 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.

- 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 chapter 10.1.)
- Add 50 µL of the diluted supernatant per well in the assay

Note

Corn, wheat, rice and feed samples measured outside the measurement range of > 30 µg/kg (ppb) should be further diluted 1:10 (1 + 9) with ready-to-use wash buffer (see chapter 10.1.).

9.3. Extraction of rye

- Weigh 5 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 chapter 10.1.)
- Add 50 µL of the diluted supernatant per well in the assay

Note

Rye samples measured outside the measurement range of > 60 µg/kg (ppb) should be further diluted 1:10 (1 + 9) with ready-to-use wash buffer (see chapter 10.1.).

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

As **wash buffer and sample buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the buffer salt contained in the kit (see chapter 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready-to-use wash buffer expires after approx. 4 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 10-fold concentrated washing buffer. The 10-fold concentrate expires after approx. 8 weeks when stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer (1 + 9).

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps. Carefully follow the recommended washing procedure as outlined in the test procedure. Reproducibility in any ELISA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed.

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore cover the microtiter plates.

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. Pipette 50 µL of each standard or sample (prepared according to chapter 9.) in duplicate to the wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µL of the conjugate 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.

4. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
5. Add 100 µL of substrate/chromogen to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Pipette 100 µL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 15 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done for double determinations using the cubic spline function.

For the evaluation it should be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 semilogarithmic against the ochratoxin A concentration [µg/L].

12. Result interpretation

In order to obtain the ochratoxin A concentration in µg/L (µg/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:

Corn, wheat, barley, rice and feed.....	10
Rye	20

Results between LoD and LoQ indicate a low ochratoxin A concentration in the sample. Calculated result show a high uncertainty in this area due to the method's high variation below LoQ. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LoQ".

A result below the LoD does not exclude a ochratoxin A contamination below the detection limit of the assay. The result should be reported accordingly.

A further dilution and new detection of samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the ochratoxin A concentration. Further dilutions should be made with the wash buffer.

13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range resulting in higher variation. This may cause a switch of results between the different areas of the calibration curve especially at the test characteristic boundaries (LoD, LoQ, upper limit of measurement range).

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Mycotoxin-free and mycotoxin containing (spiked) samples should be used.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

Further application notes are available on request.

For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2019-11-28	Release version
2020-03-23	General revision
2023-02-02	Current version General revision and editorial changes Changes made: <ul style="list-style-type: none">– 6. Warnings and precautions for the users: additions– Chapter 12 - 15 added

Explanation of symbols

General symbols:

	Follow the instructions for use
	Batch number
	Expiry date (YYYY-MM)
	Storage temperature
	Article number
	Number of test determinations
	Manufacturing date (YYYY-MM)
	Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Jochen Hirsch, Ute Salzbrenner,

Hans Frickel, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321