

## **RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15**

**REF R1312**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Ochratoxin A

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
ochratoxin A

In vitro Test

Lagerung bei 2-8 °C  
Storage at 2-8 °C



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

R-Biopharm AG switchboard  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Order department  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb  
E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

Marketing & sales  
E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup>, RIDASCREEN<sup>®</sup> und RIDASOFT<sup>®</sup>  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA<sup>®</sup>, RIDASCREEN<sup>®</sup> and RIDASOFT<sup>®</sup>  
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.

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

Probenvorbereitung: extrahieren, zentrifugieren, verdünnen

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

Nachweisgrenze: Mais ..... 0,5 µg/kg (ppb)  
Weizen ..... 0,5 µg/kg (ppb)  
Gerste ..... 0,4 µg/kg (ppb)  
Roggen ..... 1,2 µg/kg (ppb)  
Reis..... 0,8 µg/kg (ppb)  
Futtermittel ..... 1,6 µg/kg (ppb)

Wiederfindungsrate: Mais.....90 - 130 %  
(natürlich kontaminierte Proben – TRILOGY®) Weizen.....90 - 140 %  
Futtermittel.....50 - 100 %

Wiederfindungsrate: Gerste (FAPAS).....80 – 100 %  
(dotierte Proben) Roggen.....100 - 130 %  
Reis.....75 - 130 %  
Futtermittel.....60 - 100 %

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

## Spezifität:

Die Spezifität des RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen 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.

Ochratoxin A .....	ca.100 %
Ochratoxin C .....	ca. 37 %
Ochratoxin B .....	ca. 2 %
Ochratoxin $\alpha$ .....	ca. 9 %
Ochratoxin $\beta$ .....	< 0,02 %
Deoxynivalenol .....	< 0,02 %
Zearalenon .....	< 0,02 %
Aflatoxin B1 .....	< 0,02 %
Fumonisin B1 .....	< 0,02 %
Citrinin .....	< 0,02 %

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](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittel-analytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## Produktangebot

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (R5402)

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® Ochratoxin A 30/15 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 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>ECO extractor</b> ECO Extractor	transparent	<b>Konzentrat</b>	<b>10 x</b>	2 x 120 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	0,03 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	0,1 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	0,3 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	1 µg/L	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/L	1,3 ml
<b>Wash buffer salt Tween*</b> Waschpuffersalz Tween		<b>Salz zum Auflösen</b>		
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfähig		6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

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

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge ( $\geq 3.500$  g)
- (Horizontal)-Schüttler
- Labor- oder Getreidemühle
- Vortexmischer
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- variable 50 µl, 100 µl und 1000 µl Mikropipetten

## 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 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](http://www.r-biopharm.de).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

Die rötlich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

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

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlichen Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) 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 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.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahmeverfahren gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen (empfohlene Korngröße: 500 µm). Wir empfehlen bei unbekanntem und natürlich kontaminierten Proben ein zusätzliches Replikat herzustellen.

- 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 Waschpuffersalz Tween verdünnen
- 50 µl des verdünnten Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

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

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
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 6 Streifen pro Testlauf abgearbeitet werden.

Bei allen Inkubationsschritten direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten 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. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in 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. 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 15 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 des Stopp-Lösung messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDASOFT® Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigegeführten Analysenzertifikat entnommen werden.

Die Auswertung erfolgt in Doppelbestimmungen mittels Cubic Spline-Funktion.

Um die in den Proben tatsächliche Ochratoxin A-Konzentration in µg/kg (ppb) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt für folgende Matrices folgender Verdünnungsfaktor:

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

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

## Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM)



Hersteller + Adresse

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

# 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 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)  
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: Corn ..... 90 - 130 %  
(naturally contaminated Wheat..... 90 - 140 %  
samples - TRILOGY®) Feed..... 50 - 100 %

Recovery rate: Barley (FAPAS)..... 80 - 100 %  
(spiked samples) Rye..... 100 - 130 %  
Rice..... 75 - 130 %  
Feed..... 60 - 100 %

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

## Specificity:

The specificity of the RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding mycotoxins 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.

Ochratoxin A .....	approx.100 %
Ochratoxin C .....	approx. 37 %
Ochratoxin B .....	approx. 2 %
Ochratoxin $\alpha$ .....	approx. 9 %
Ochratoxin $\beta$ .....	< 0.02 %
Deoxynivalenol .....	< 0.02 %
Zearalenon .....	< 0.02 %
Aflatoxin B1 .....	< 0.02 %
Fumonisin B1 .....	< 0.02 %
Citrinin .....	< 0.02 %

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](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

## Related products

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (R5402)

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® Ochratoxin A 30/15 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in corn, wheat, barley, rye, rice 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 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.

### 3. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	ready to use		96 wells
ECO extractor	transparent	<b>concentrate</b>	<b>10 x</b>	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*		<b>dissolve the salt</b>		
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

\*) 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:

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Centrifuge ( $\geq 3,500$  g)
- (Horizontal) shaker
- Laboratory or grain mill
- Vortex mixer
- Graduated cylinder (plastic or glass ) 100 ml
- Variable 50 µl - 100 µl and 1000 µl 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](http://www.r-biopharm.com).

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

## 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, 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.

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

## 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). Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

### 10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. 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 EIA is largely dependent upon the consistency with which

the microwells are washed. Not more than 6 strips per test run should be processed.

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

1. Insert a sufficient number of microtiter wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells; 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 30 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 15 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 special software, the RIDASOFT® Win.net (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The calculation should be done in double determinations by use of a cubic spline function. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.









In order to obtain the ochratoxin A concentration in µg/kg (ppb) actually contained in a sample, the concentration read from the standard 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, rye, rice and feed.....	10
Rye.....	20

Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

## 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

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.

### 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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321