

**Helica® Ochratoxine A ELISA universel (Ochratoxin A Universal ELISA Kit)**  
Référence produit – KIT5015 (961OCH01LM-96)





## **Helica® Ochratoxine A ELISA universel (Ochratoxin A Universal ELISA Kit)**

*Pour la détermination quantitative de l'ochratoxine A dans les céréales, le café, la poudre de cacao et le beurre de cacao, diverses épices, l'alcool, le lait et le sérum.*

### **Table des matières**

Introduction – Ochratoxine A .....	3
Utilisation prévue.....	3
Principe de la méthode d'analyse .....	3
Contenu du kit.....	4
Matériel requis mais non fourni .....	4
Conservation et durée de vie .....	5
Précautions et élimination des déchets .....	5
Préparation des échantillons.....	6
Procédure d'analyse.....	7
Interprétation des résultats .....	8
Caractéristiques du test.....	8
Assistance technique.....	13



## Introduction – Ochratoxine A

L'ochratoxine A est un métabolite secondaire toxique produit par plusieurs moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, notamment *Aspergillus ochraceus*. L'ochratoxine A est une néphrotoxine et un cancérigène. Chez l'homme, l'exposition à l'ochratoxine A a été associée à la néphropathie endémique des Balkans (BEN), une maladie rénale chronique associée à des tumeurs du système rénal. Chez les dindes et les poulets, les symptômes comprennent un retard de croissance, une diminution de l'indice de conversion alimentaire, une néphropathie et de la mortalité. Un refus de s'alimenter a également été observé chez les dindes. Une diminution de la production d'œufs et de la qualité de la coquille a été signalée chez les dindes et les poulets. Une altération du système rénal a également été signalée chez les porcs. L'ochratoxine A a été fréquemment détectée dans les aliments destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale, la principale charge biologique humaine provenant des céréales et des produits céréaliers, bien qu'une large gamme de produits contienne cette toxine. Il s'agit notamment des céréales, du café vert et torréfié, du cacao, des épices et des dérivés du raisin tels que les raisins secs, le jus de raisin et les vins.

## Utilisation prévue

Les kits ELISA Helica® Mycotoxin d'Hygiena sont des kits faciles à utiliser et économiques destinés à la détection des mycotoxines dans un large éventail de produits, notamment les aliments pour animaux, les céréales, le maïs et l'urine animale. Ils sont conçus pour protéger les humains et les animaux contre les effets secondaires dangereux des mycotoxines.

Le kit ELISA universel Helica Ochratoxin A a été spécialement conçu pour la détermination quantitative de l'ochratoxine A dans les céréales, le café, la poudre de cacao et le beurre de cacao, diverses épices, l'alcool, le lait et le sérum.

Les données obtenues à partir des tests ne doivent pas être utilisées à des fins de diagnostic ou de traitement chez l'homme. Les tests ne sont pas approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis ni par aucune autre agence réglementaire américaine ou non américaine pour une utilisation dans le diagnostic ou le traitement chez l'homme. Les tests ne doivent pas être utilisés comme seule base pour évaluer la sécurité des produits destinés à être commercialisés auprès des consommateurs. Les informations générées ne doivent être utilisées qu'en conjonction avec le programme d'assurance qualité habituel de l'utilisateur. Non approuvé pour le diagnostic clinique. À utiliser pour la recherche et le développement, l'assurance qualité et le contrôle qualité sous la supervision de personnes techniquement qualifiées.

Non approuvé pour le diagnostic clinique. À utiliser pour la recherche et le développement, l'assurance qualité et le contrôle qualité sous la supervision de personnes techniquement qualifiées.

## Principe de la méthode

Le test ELISA universel Helica Ochratoxin A est un test immunoenzymatique à inhibition compétitive en phase solide. Un anticorps à haute affinité pour l'ochratoxine A est déposé sur une microplaque en polystyrène. Les toxines sont extraites d'un échantillon broyé avec 70 % de méthanol ou 80 % d'acétonitrile et, après dilution, ajoutées au puits approprié.

L'étalon ou l'échantillon est ajouté au puits approprié et, si l'ochratoxine A est présente, elle se lie à l'anticorps enrobé. Ensuite, l'ochratoxine A liée à la peroxydase de raifort (HRP) est ajoutée et se lie à l'anticorps qui n'est pas déjà occupé par l'ochratoxine A présente dans l'étalon ou l'échantillon. Après cette période d'incubation, le contenu des puits est décanté, lavé et un substrat HRP est ajouté, qui développe une couleur bleue en présence d'enzyme. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité de conjugué lié et inversement proportionnelle à la quantité d'ochratoxine A dans l'étalon ou l'échantillon. Par conséquent, à mesure que la concentration d'ochratoxine A dans l'échantillon ou l'étalon augmente, l'intensité de la couleur bleue diminue. Une solution acide est ajoutée, ce qui fait virer le chromogène du bleu au jaune. Les micropuits sont mesurés optiquement par un lecteur de microplaques avec un filtre d'absorbance de 450 nm (OD450). Les densités optiques des échantillons sont comparées aux DO des étalons du kit et un résultat est déterminé par interpolation à partir de la courbe étalon.



## Contenu du

Emballage /Numéro	Composant	Description
1X Pochette	Plaque de micropuits recouverts d'anticorps	96 puits (12 bandes de huit puits) demicroplaques recouverts d'un anticorps anti-ochratoxine A de souris, <i>prêt à l'emploi.</i>
1X Plaque	Plaque de dilution	96 puits non enduits (12 barrettes de huit puits) dans unemicroplaque, <i>prêt à l'emploi.</i> (Puits de mélange)
Flacons 6X	Étalons	1,5 ml/flacon d'ochratoxine A aux concentrations suivantes : 0,0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,8 ng/ml dans du méthanol à 70 %, <i>prêt à l'emploi.</i>
Flacon 1X	Conjugué	12 ml d'ochratoxine A conjuguée à la peroxydase dans un tampon avec conservateur, <i>prêt à l'emploi.</i>
Flacons 2X	Diluant pour dosage	2 x 12 ml de diluant pour échantillons exclusif, prêt à l'emploi.
Flacon 1X	Substrat	12 ml de tétraméthylbenzidine (TMB) stabilisée, <i>prête à l'emploi.</i>
Flacon 1X	Solution d'arrêt	12 ml de solution acide, <i>prête à l'emploi.</i>
Sachet 1X	Poudre PBS-T	PBS avec 0,05 % de Tween <sup>®</sup> 20*, compléter à 1 litre avec de l'eau distillée et conserver au réfrigérateur. (Tampon de lavage)

\*TWEEN<sup>®</sup> 20 est une marque déposée de CRODA International Plc.

## Matériel requis mais non fourni

- Broyeur suffisant pour réduire l'échantillon à une taille de particules équivalente à celle du café instantané fin
- Récipient de collecte d'une capacité minimale de 100 ml
- Balance avec une capacité de mesure de 20 g
- Éprouvette graduée : 100 ml
- Méthanol ou acétonitrile : 3,5 à 40 ml, de qualité réactive par échantillon
- Eau distillée ou déionisée : 1 à 15 ml par échantillon
- Papier filtre : Whatman n° 1 ou équivalent
- Entonnoir à filtre
- Centrifugeuse
- Pipette avec embouts : 100 µL et 200 µL
- Minuteur
- Bouteille de lavage
- Tubes de dilution
- Serviettes en papier absorbant
- Lecteur de microplaques avec filtre 450 nm



## Conservation et durée de conservation

- Conserver les réactifs entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.
- Les réactifs doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur les étiquettes individuelles.
- Le conjugué marqué à la HRP et les substrats TMB sont photosensibles et sont conditionnés dans un flacon opaque protégeant de la lumière. Conserver à l'abri de la lumière et replacer dans son emballage après utilisation.

## Précautions et élimination des déchets

### Précautions générales :

- Amener tous les réactifs à température ambiante (19 à 25 °C) avant utilisation.
- Ne pas interchanger les réactifs entre des kits de numéros de lot différents.
- Ne pas utiliser les solutions si elles sont troubles ou si elles contiennent des précipités.
- Ne pas remettre les réactifs inutilisés dans leurs flacons d'origine. La procédure de dosage précise les volumes requis.
- Respecter toutes les conditions de temps et de température indiquées dans la procédure.
- Pendant l'extraction de l'échantillon, éviter toute contamination croisée.
- Les appareils, tels que les mixeurs, doivent être nettoyés après chaque préparation d'échantillon.
- Les échantillons testés doivent avoir un pH de 7,0 ( $\pm 1,0$ ). Des conditions alcalines ou acides excessives peuvent affecter les résultats du test.

### Précautions de sécurité :

Les mycotoxines (aflatoxines, trichothécènes et autres) sont des substances cancérigènes bien connues pour l'homme et sont considérées comme hautement toxiques. Étant donné que les mycotoxines peuvent provoquer des maladies chez l'homme, des mesures de sécurité appropriées doivent être prises et un équipement de protection individuelle doit être porté lors de la manipulation d'échantillons, de réactifs, de verrerie et d'autres fournitures et équipements susceptibles d'être contaminés par des mycotoxines.

- Avant d'utiliser ce test, veuillez consulter la ou les fiches de données de sécurité disponibles sur [www.hygiena.com](http://www.hygiena.com).
- Reportez-vous aux pratiques en vigueur sur votre site pour une manipulation sûre des matériaux.
- Il est fortement recommandé de porter des gants de protection, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité à tout moment lors de la manipulation des kits de mycotoxines et de leurs composants respectifs. Considérer tous les matériaux, conteneurs et dispositifs exposés aux échantillons ou aux étalons comme contaminés par des mycotoxines.
- Ne jamais pipeter les réactifs ou les échantillons avec la bouche.
- Les étalons sont inflammables. Il convient de prendre des précautions lors de l'utilisation et du stockage de ces réactifs.
- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique, qui est corrosif. Veuillez consulter la fiche de données de sécurité. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux. En cas d'exposition, rincer abondamment à l'eau.

### Élimination :

Décontaminer les matériaux et éliminer les déchets conformément aux pratiques en vigueur sur lesite et aux réglementations locales. Ne pas jeter ces matériaux dans les égouts. Veuillez noter qu'il existe un risque de contamination par des mycotoxines dans ou sur l'un des composants du kit fourni.

- Après utilisation, jeter tous les matériaux, contenants et dispositifs dans le récipient approprié.  
Avant de réaliser le test, préparer un conteneur à déchets qui servira de récipient pour les déchets de votre kit.  
Jeter les embouts de pipettes contaminés et tous les autres matériaux connexes dans ce conteneur.
- Une fois le test terminé, le récipient doit être traité avec une quantité suffisante d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 5-6 % pour saturer son contenu (environ 1/10e du volume du récipient). Le NaOCl dénaturera les mycotoxines et neutralisera les déchets, les rendant ainsi propres à l'élimination. Retourner le récipient plusieurs fois pour bien en recouvrir tous les déchets.
- En cas de déversement accidentel de toxines, traiter la surface déversée avec du NaOCl à 5-6 % pendant au moins 10 minutes, puis avec de l'acétone aqueuse à 5 %. Essuyer avec des serviettes en papier absorbant.



## Préparation des échantillons

Remarque : l'échantillon doit être prélevé conformément aux techniques d'échantillonnage appropriées établies.

### Procédure d'extraction Café,

#### cacao et épices

1. Broyer un échantillon représentatif jusqu'à obtenir une granulométrie équivalente à celle du café instantané fin (50 % passe à travers un tamis de 20 mesh).
2. Préparer 50 ml de solvant d'extraction. (voir la section sur les performances pour le choix des solvants).
3. Transférer 50 ml de solvant d'extraction dans un récipient et ajouter 10 g de l'échantillon broyé.  
*Remarque : le rapport entre l'échantillon et le solvant d'extraction est de 1:5 (p/v).*
4. Mélanger en agitant dans un récipient hermétique ou un mixeur pendant au moins 5 minutes.
5. Laisser les particules se déposer, puis filtrer 5 à 10 ml de l'extrait à travers un papier filtre Whatman n° 1 (ou équivalent) et recueillir le filtrat à analyser. Il est également possible de centrifuger une partie de l'échantillon à 3 500 tr/min pendant 5 minutes afin d'accélérer la séparation.
6. Recueillir la couche supérieure contenant l'ochratoxine à tester.
7. Diluer une aliquote de l'extrait à 1:10 avec du méthanol à 70 % dans de l'eau distillée.
8. L'échantillon est maintenant prêt à être testé.
9. Dilution finale à utiliser pour le calcul = **1:50**

#### Beurre de cacao

1. Peser 1 g de beurre de cacao dans un tube bouchon.
2. Préparer le solvant d'extraction en ajoutant 1,5 ml d'eau distillée ou déionisée à 3,5 ml de méthanol ou 1 ml d'eau distillée ou déionisée à 4 ml d'acétonitrile (voir la section sur les performances pour le choix des solvants).
3. Transférer 5 ml de solvant d'extraction dans le tube bouché et placer dans de l'eau chaude (50 °C-70 °C) jusqu'à ce que le beurre de cacao ait fondu et que le solvant ait atteint la température de l'eau.  
*Remarque : le rapport entre l'échantillon et le solvant d'extraction est de 1:5 (p/v).*
4. Mélanger en secouant le tube bouché afin que le beurre de cacao fondu se fragmente en petites gouttelettes et présente ainsi une plus grande surface au solvant. Maintenir le contenu du tube à une température supérieure à 37 °C pendant le mélange en replongeant le tube dans l'eau chaude de temps à autre. La durée totale du mélange doit être de 5 minutes.
5. Faire immédiatement passer l'échantillon à travers un papier filtre Whatman n° 1 (ou équivalent) et recueillir le filtrat à tester. Pendant la filtration, le beurre de cacao peut refroidir et se solidifier, mais une quantité suffisante d'échantillon doit passer à travers pour pouvoir être testée.
6. Diluer une aliquote de l'extrait à 1:10 avec du méthanol à 70 % dans de l'eau distillée.
7. L'échantillon est maintenant prêt à être testé.
8. Dilution finale à utiliser pour le calcul = **1:50**

#### Céréales

1. Broyer un échantillon représentatif jusqu'à obtenir une granulométrie équivalente à celle du café instantané fin (95 % passe à travers un tamis de 20 mesh).
2. Préparer le solvant d'extraction (70 % de méthanol) en ajoutant 30 ml d'eau distillée ou déionisée à 70 ml de méthanol pour chaque échantillon à tester.
3. Transférer 100 ml de solvant d'extraction dans un récipient et ajouter 20 g de l'échantillon broyé.  
*Remarque : le rapport entre l'échantillon et le solvant d'extraction est une dilution de 1:5 (p/v).*
4. Mélanger en agitant dans un récipient fermé pendant au moins 2 minutes.
5. Laisser les particules se déposer, puis filtrer 5 à 10 ml de l'extrait à travers un papier filtre Whatman n° 1 (ou équivalent) et recueillir le filtrat à tester.
6. Diluer une aliquote de l'extrait à 1:10 avec du méthanol à 70 %.



7. L'échantillon est maintenant prêt à être testé.
8. Dilution finale à utiliser pour le calcul = **1:50**

## Alcool et jus

1. Diluer les échantillons de vin, de moût de raisin ou de jus dans un rapport de 1:20 dans du méthanol à 70 %. Diluer les échantillons de bière dans un rapport de 1:2 avec du méthanol absolu.
2. Dilutions finales à utiliser pour le calcul = **1:20** (vin, moût ou jus de raisin) ou **1:4** (bière).

## Sérum et lait

1. À 250 µL d'échantillon (sérum ou lait), ajouter 750 µL de méthanol absolu. Si des volumes différents sont utilisés, maintenir le rapport échantillon/méthanol à 1:4. Mélanger vigoureusement et laisser reposer pendant cinq minutes à température ambiante.
2. Centrifuger ou filtrer l'échantillon pour le clarifier et utiliser le surnageant ou le filtrat pour le test.
3. Dilution finale à utiliser pour le calcul = **1:4**

## Procédure de dosage

Remarque : il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux pour réaliser le test. Si vous utilisez une pipette monocanal, il est recommandé de ne pas analyser plus de 16 échantillons et étalons (2 bandelettes réactives) au total.

1. Amener tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Préparer le tampon de lavage en reconstituant le sachet de poudre PBS-T en rinçant son contenu avec un léger jet d'eau distillée ou déionisée dans un récipient d'un litre. Remplir à 1 litre avec de l'eau distillée et conserver au réfrigérateur lorsque vous ne l'utilisez pas.
2. Placer un puits de mélange dans un support pour microplaques pour chaque étalon et échantillon à tester. Placer un nombre égal de puits de microtitrage recouverts d'anticorps dans un autre support pour microplaques. Si vous utilisez un seul puits, ajuster les volumes en conséquence. Remettre les puits inutilisés dans le sachet en aluminium avec le dessiccant et le refermer.
3. Mélanger chaque réactif en agitant le flacon avant utilisation.
4. Verser 200 µL de diluant d'échantillon dans chaque puits de mélange.
5. À l'aide d'une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon, ajoutez 100 µL de chaque étalon et échantillon préparé dans le puits de mélange approprié contenant le diluant. Mélanger en amorçant la pipette au moins trois (3) fois. *Remarque : l'opérateur doit noter l'emplacement de chaque étalon et échantillon tout au long du test.*
6. À l'aide d'une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon, transférer 100 µL du contenu de chaque puits de mélange dans un puits de microtitrage recouvert d'anticorps correspondant. Il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux pour cette étape afin de minimiser les variations du débit à la fin. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.  
*Remarque : les puits de mélange contiennent suffisamment de solution pour analyser chaque étalon et/ou échantillon en double (recommandé). Si chaque étalon ou échantillon est analysé en simple ou si plusieurs réplicats sont nécessaires, les volumes de diluant de test et d'échantillon/étalon doivent être ajustés en conséquence.*
7. Transvaser le contenu des micropuits dans un récipient jetable. Laver les micropuits en les remplissant chacun de tampon de lavage PBS-T, puis transvaser le liquide de lavage dans un récipient jetable. Répéter l'opération trois (3) fois au total.
8. Tapoter les micropuits (face vers le bas) sur une couche de serviettes absorbantes pour éliminer le tampon de lavage résiduel.
9. Ajouter 100 µL de conjugué ochratoxine A-HRP dans chaque puits recouvert d'anticorps et incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Couvrir pour éviter la lumière directe.
10. Répéter les étapes 7 et 8.
11. Mesurer le volume requis de réactif substrat (1 ml/bandelette ou 120 µl/puits) et le placer dans un récipient séparé. Ajouter 100 µl dans chaque micropuits. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Couvrir pour éviter la lumière directe.
12. Mesurer le volume requis de solution d'arrêt (1 ml/bandelette ou 120 µl/puits) et le verser dans un récipient séparé. Ajouter 100 µl dans le même ordre et au même rythme que le réactif substrat.
13. Lire la densité optique (DO) de chaque micropuits à l'aide d'un lecteur de plaques de microtitrage équipé d'un filtre de 450 nm. Enregistrer la densité optique (DO) de chaque micropuits.





14. En définissant la norme zéro comme une liaison à 100 % ( $B_0$ ), calculer le pourcentage de liaison (%B) pour chaque norme et chaque échantillon en tant que pourcentage de la liaison zéro ( $\%B/B_0$ ).

*Remarque : les courbes d'immuno-essai ont pour particularité de s'aplatir aux valeurs extrêmes basses et élevées. L'extrapolation à des valeurs au-delà du point le plus bas et le plus haut de la courbe standard conduira à des résultats imprécis et inexacts.*

### Interprétation des résultats

Construire une courbe dose-réponse en utilisant les valeurs OD exprimées en pourcentage ( $\%B/B_0$ ) de l'OD de l'étalon zéro (0,0 ng/mL) par rapport à la teneur en ochratoxine A de l'étalon. Les inconnues sont mesurées par interpolation à partir de la courbe étalon.

Les informations figurant sur l'étiquette de chaque flacon étalon se réfèrent à son contenu. Cependant, l'échantillon a été dilué par le solvant d'extraction conformément à la procédure d'extraction, de sorte que le niveau d'ochratoxine indiqué par l'étalon doit être multiplié par le facteur de dilution total afin d'indiquer le nombre de ng par gramme (ppb) du produit, comme suit :

Échantillon standard (ng/mL)	Cacao, beurre de cacao, café, épices, céréales (ppb) 1:50	Vin, moût de raisin, jus (ng/mL) 1:20	Sérum et lait (ng/mL) 1:4	Bière (ng/mL) 1:2
0	0	0	0	0
0,05	2,5	1	0,2	0,1
0,1	5	2	0,4	0,2
0,2	10	4	0,8	0,4
0,4	20	8	1,6	0,8
0,8	40	16	3,2	1,6

Si un échantillon contient de l'ochratoxine A à une concentration supérieure à la norme la plus élevée, il doit être dilué de manière appropriée dans un solvant d'extraction et testé à nouveau. L'étape de dilution supplémentaire doit être prise en compte lors de l'expression du résultat final.

### Caractéristiques du dosage

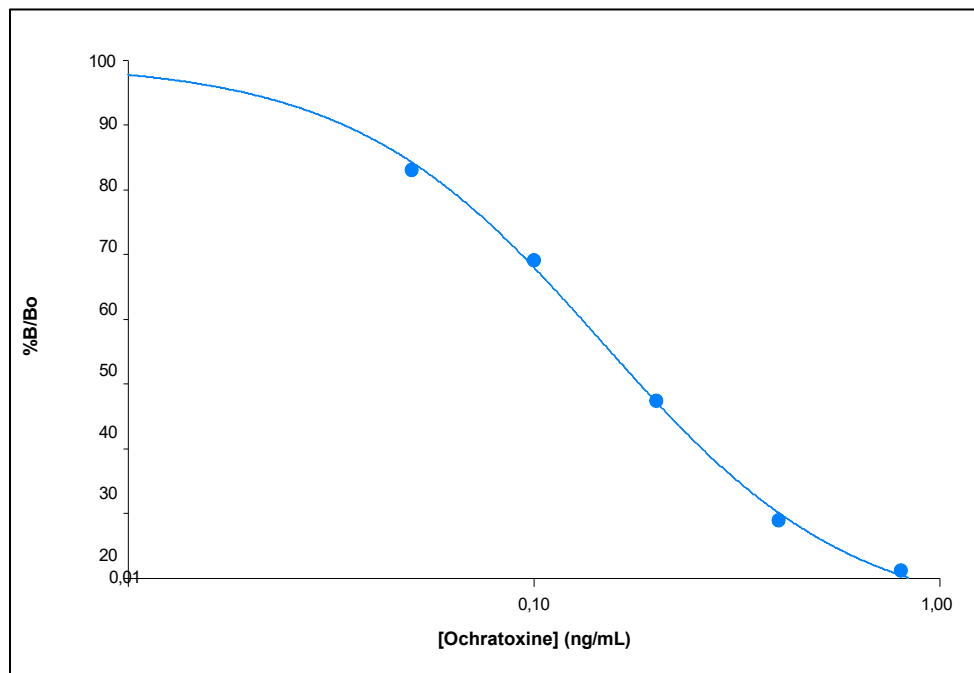
Les données issues de la moyenne de vingt-et-une courbes étalons consécutives ont donné les résultats suivants :

Étalon (ng/mL)	% $B/B_0$	% CV
0	100,0	-
0,05	91,3	4,0
0,1	80,4	5,7
0,2	60,0	7,6
0,4	35,4	9,7
0,8	18,4	17,8





La figure ci-dessous représente une courbe standard représentative pour l'ochratoxine A, basée sur le tableau de données de la page précédente.



Le café vert dont la teneur en ochratoxine A a été déterminée à moins de 1 ppb par HPLC a été obtenu auprès de Trilogy Labs (etc.). Les autres produits utilisés pour déterminer les paramètres de performance du test ont été achetés comme produits de consommation et n'ont pas fait l'objet d'une analyse supplémentaire par HPLC. Chaque produit a été extrait dans trois solvants différents :

- Solvant 1 : 70 % de méthanol dans 1 % de bicarbonate de sodium
- Solvant 2 : 70 % de méthanol dans de l'eau distillée
- Solvant 3 : 80 % d'acétonitrile dans de l'eau distillée

Chaque extrait a été dilué à 10:1 dans du méthanol à 70 % dans de l'eau distillée, comme décrit dans la section « Procédure d'extraction ». Chaque échantillon dilué a été analysé avec une moyenne de 12 réplicats par rapport à l'étalon zéro. Les résultats sont présentés ci-dessous :

#### Solvant 1, n=12

Produit	Moyenne %B/B <sub>0</sub>	% CV	ppb	Moyenne - 2 écarts types écarts (ppb)
Café vert	95,7	2,0	<1	<1
Café torréfié	99,3	1,1	<1	<1
Café instantané	92,3	1,0	<1	<1
Cacao en poudre	93,0	1,4	<1	<1
Beurre de cacao	99,3	3,4	<1	<1
Paprika	99,9	1,8	<1	<1
Poudre de chili	100,5	1,6	<1	<1

**Solvant 2, n=12**

Produit	Moyenne %B/B <sub>0</sub>	% CV	ppb	Moyenne - 2 Écart type écarts (ppb)
Café vert	94,9	2,5	<1	1,1
Café torréfié	99,7	2,3	<1	<1
Café instantané	90,5	2,0	<1	1,1
Cacao en poudre	90,7	2,2	<1	1,2
Beurre de cacao	99,6	2,7	<1	<1
Paprika	97,7	1,5	<1	<1
Poudre de chili	93,2	2,3	<1	<1

**Solvant 3, n=12**

Produit	Moyenne %B/B <sub>0</sub>	% CV	ppb	Moyenne - 2 écarts types écarts (ppb)
Café vert	95,4	1,1	<1	<1
Café torréfié	94,9	2,8	<1	<1
Café instantané	92,3	2,1	<1	1,0
Cacao en poudre	90,7	2,6	1,0	1,3
Beurre de cacao	101,7	2,6	<1	<1
Paprika	96,4	1,7	<1	<1
Poudre de chili	94,2	1,4	<1	<1

Afin de déterminer l'efficacité d'extraction des trois solvants, 1 g de chaque produit a été enrichi avec 5 ppb d'ochratoxine A dans du méthanol absolu, séché pendant une nuit, puis extrait comme indiqué dans la « Procédure d'extraction ».

Dans le cas du beurre de cacao, la substance solide et cireuse a été grattée en petits copeaux, enrichie, puis, après séchage, fondue dans de l'eau chaude et resolidifiée, de sorte que l'ochratoxine A ajoutée ait été incorporée dans un ensemble solide homogène afin de simuler plus fidèlement la situation naturelle. Le matériau enrichi a été dilué dans 5 ml de solvant d'extraction et comparé aux 5 ml d'extrait de produit, comme indiqué ci-dessous. Les extractions ont été effectuées trois fois pour chaque produit. Les résultats sont présentés ci-dessous :

**Solvant 1**

Produit	Récupération 1 (%)	Récupération 2 (%)	Récupération 3 (%)
Café vert	83	92	85
Café torréfié	79	84	79
Café instantané	79	81	73
Cacao en poudre	94	94	92
Beurre de cacao	90	87	91
Paprika	79	81	73
Poudre de chili	87	96	97

**Solvant 2**

Matière première	Récupération 1 (%)	Récupération 2 (%)	Récupération 3 (%)
Café vert	93	79	83
Café torréfié	75	79	78
Café instantané	75	74	89
Cacao en poudre	89	108	113
Beurre de cacao	101	101	98
Paprika	77	102	96
Poudre de chili	98	79	81

**Solvant 3**

Matière première	Récupération 1 (%)	Récupération 2 (%)	Récupération 3 (%)
Café vert	99	96	90
Café torréfié	91	97	92
Café instantané	107	103	98
Cacao en poudre	110	108	108
Beurre de cacao	97	104	100
Paprika	102	104	109
Poudre de chili	101	102	107

Il semble que le solvant 3, à savoir 80 % d'acétonitrile dans de l'eau distillée, soit le solvant de choix le plus généralement applicable, bien que le méthanol fonctionne bien avec les produits à base de cacao. L'ochratoxine A ajoutée directement au solvant à plusieurs reprises et analysée comme contrôle dans les expériences de récupération a été mesurée à  $4,86 \pm 0,39$  ppb (CV = 8,0 %, n = 27).

Les récupérations d'ochratoxine A à partir d'échantillons de maïs de référence certifiés étaient les suivantes, sur la base de cinq expériences indépendantes utilisant 70 % de méthanol (n = 5) :

Échantillon de référence de maïs (ppb)	Récupération (%)	Répétabilité (%CV)
18	101	8,9
4,8	104	10,6
2,9	95	10,2

L'alcool a également été testé. Tous les produits ont été cultivés et transformés en Californie, à l'exception de la bière, qui a été brassée en Belgique.



La comparaison des produits avec la norme zéro (70 % de méthanol) dans quatre essais en double a donné les résultats moyens suivants :

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Norme zéro	1,918	0,09	4,7
Vin rouge (Merlot)	1,922	0,09	4,7

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Zéro standard	1,847	0,11	6,0
Vin blanc (Chardonnay)	1,817	0,11	6,1

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Zéro standard	1,926	0,11	5,7
Port	1,909	0,13	6,8

Échantillon	OD	Écart type	%CV
Zéro standard	1,945	0,11	5,7
Sherry	1,955	0,05	2,6

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Zéro standard	2,030	0,12	5,9
Moût de raisin rouge	2,045	0,09	4,4

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Zéro standard	1,827	0,07	3,8
Jus de raisin rouge	1,819	0,07	3,8

Échantillon	DO	Écart type	%CV
Zéro standard	1,870	0,09	4,8
Bière	1,841	0,11	6,0

Après avoir démontré qu'aucun des produits ne contenait d'ochratoxine A, chacun d'entre eux a été enrichi en ochratoxine A à des concentrations de 0,0, 0,4, 1,0, 2,0, 4,0 et 8,0 ng/mL, et le solvant standard (70 % de méthanol) a été enrichi de la même manière. Bière a été enrichi

s à des concentrations de 0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,8 ng/mL. Tous les échantillons ont été dilués à 1:20 avec du méthanol à 70 %, à l'exception de la bière qui a été diluée à 1:2 dans du méthanol absolu et analysée comme décrit ci-dessus (dans le kit tel qu'il est présenté, les étalons sont pré-dilués et doivent être utilisés sans dilution supplémentaire). Les récupérations pour chaque produit par rapport aux étalons sont indiquées ci-dessous.

Étalon (ng/mL)	Rouge Vin rouge %	Blanc %	Port %	Sherry %	Moût %	Jus %	Bière %
0,05	104	98	102	104	101	72	112
0,1	100	92	98	105	99	80	115
0,2	103	110	98	93	98	93	120
0,4	110	99	108	101	91	95	113



Les résultats démontrent que le test Helica Ochratoxin A Assay peut être utilisé pour mesurer l'ochratoxine A dans une grande variété de boissons alcoolisées et non alcoolisées.

Des échantillons biologiques ont également été testés à l'aide du test ELISA universel pour l'ochratoxine A. Les échantillons suivants ont été testés dans le cadre de l'analyse : 1. Sérum humain normal traité au charbon. 2. Sérum porcin normal traité au charbon. 3. Colostrum/lait humain. 4. Lait de vache entier. Chacun a été mesuré à l'aide de 12 réplicats et comparé à la norme zéro.

Produit	% B <sub>0</sub> Échantillon	% B <sub>0</sub> Échantillon <2 écart-type	% CV	ng/mL
Sérum humain	99,7	96,3	1,7	<0,08
Sérum porcin	100,2	97,4	1,4	<0,08
Lait maternel	92,3	89,3	1,6	<0,08
Lait de vache	91,1	88,9	1,2	<0,08

Les résultats indiquent que ces échantillons sont négatifs (<0,08 ng/mL) pour l'ochratoxine A. Ces échantillons de sérum et de lait ont été enrichis avec environ 0,2 ng/mL d'ochratoxine A et, après équilibrage pendant une nuit, ont été extraits et analysés comme décrit. L'extraction a été effectuée trois fois pour chaque échantillon. Le PBS a été enrichi et extrait de la même manière que le contrôle.

Produit	Récupération 1 (%)	Récupération 2 (%)	Récupération 3 (%)	Moyenne de récupération (%)
Sérum humain	102	102	104	103
Sérum porcin	100	94	96	97
Lait maternel	96	110	95	100
Lait de vache	114	116	113	114

Le contrôle PBS a mesuré  $0,214 \pm 0,011$  ng/mL, CV = 5,1 %, n = 8. Les valeurs de récupération systématiquement supérieures à 100 % pour l'échantillon de lait de vache indiqueraient un niveau intrinsèque de 0,0 à 0,08 ng/mL d'ochratoxine A.

## Assistance technique

Pour toute question ou commentaire, veuillez contacter votre distributeur local. Vous pouvez également envoyer un e-mail à [techsupport@hygiena.com](mailto:techsupport@hygiena.com), consulter notre page [Contactez-nous](#) pour obtenir les numéros de téléphone régionaux ou demander une assistance technique à l'adresse <https://www.hygiena.com/hygiena/technical-support-request.html>.