

RIDASCREEN[®] SET A,B,C,D,E

Art. Nr.: R4101

Enzymimmunoassay zur Identifikation der
Staphylokokken Enterotoxine A, B, C, D und E
in Lebensmitteln und Bakterienkulturen

Enzyme immunoassay for identification of
Staphylococcus enterotoxins A, B, C, D and E
in food and bacterial cultures

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:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & Sales

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (Art. Nr.: R4101) ist ein Enzymimmunoassay zur Identifikation der Staphylokokken Enterotoxine A, B, C, D und E in flüssigen und festen Lebensmitteln sowie in Bakterienkulturen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 12 Bestimmungen.

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	Extraktion nach vereinfachter Aufarbeitungsmethode (nur bedingt anwendbar, s. Punkt 9. „Probenaufarbeitung“) durch Homogenisieren mit Puffer und Zentrifugieren
	Extraktion nach der „Offiziellen Europäischen Aufarbeitungsmethode“ (Dialysekonzentrationsmethode, s. Punkt 9.5.)
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung für 10 Proben ca. 1 h (einfache Aufarbeitung)
	Probenvorbereitung für 10 Proben ca. 19 h (offizielle Methode, Dialyse ü. N.)
	Testdurchführung (Inkubationszeit) 2 h 45 min
Nachweisgrenzen:	
Einfache Aufarbeitung:	flüssige Proben0,25 ng/ml Toxin feste Proben..... 0,375 ng/g Toxin Überstand von Bakterienkulturen0,25 ng/ml Toxin
Dialysekonzentration:	flüssige Proben0,05 ng/ml Toxin feste Proben..... 0,05 ng/g Toxin

Die Spezifität des RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E 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 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 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 R-Biopharm Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDASCREEN® SET Total (R4105; 96 Bestimmungen)

RIDASCREEN® SET Total (R4106; 48 Bestimmungen)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur Identifikation der Staphylokokken Enterotoxine (SET) A, B, C, D und E in flüssigen und festen Lebensmitteln sowie in Bakterienkulturen. Aufgrund seiner Nachweisgrenze ist der RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E-Test den Immundiffusions-Verfahren, die eine Nachweisgrenze im Bereich von 0,1 mg/ml haben, deutlich überlegen.

2. Allgemeines

Staphylokokken gehören zur Familie der Micrococcaceae. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus hyicus* produzieren ein oder mehrere hitzestabile Proteine, die als Enterotoxine wirken können. Diese sind Ursache für eine große Anzahl von Lebensmittel-Intoxikationen.

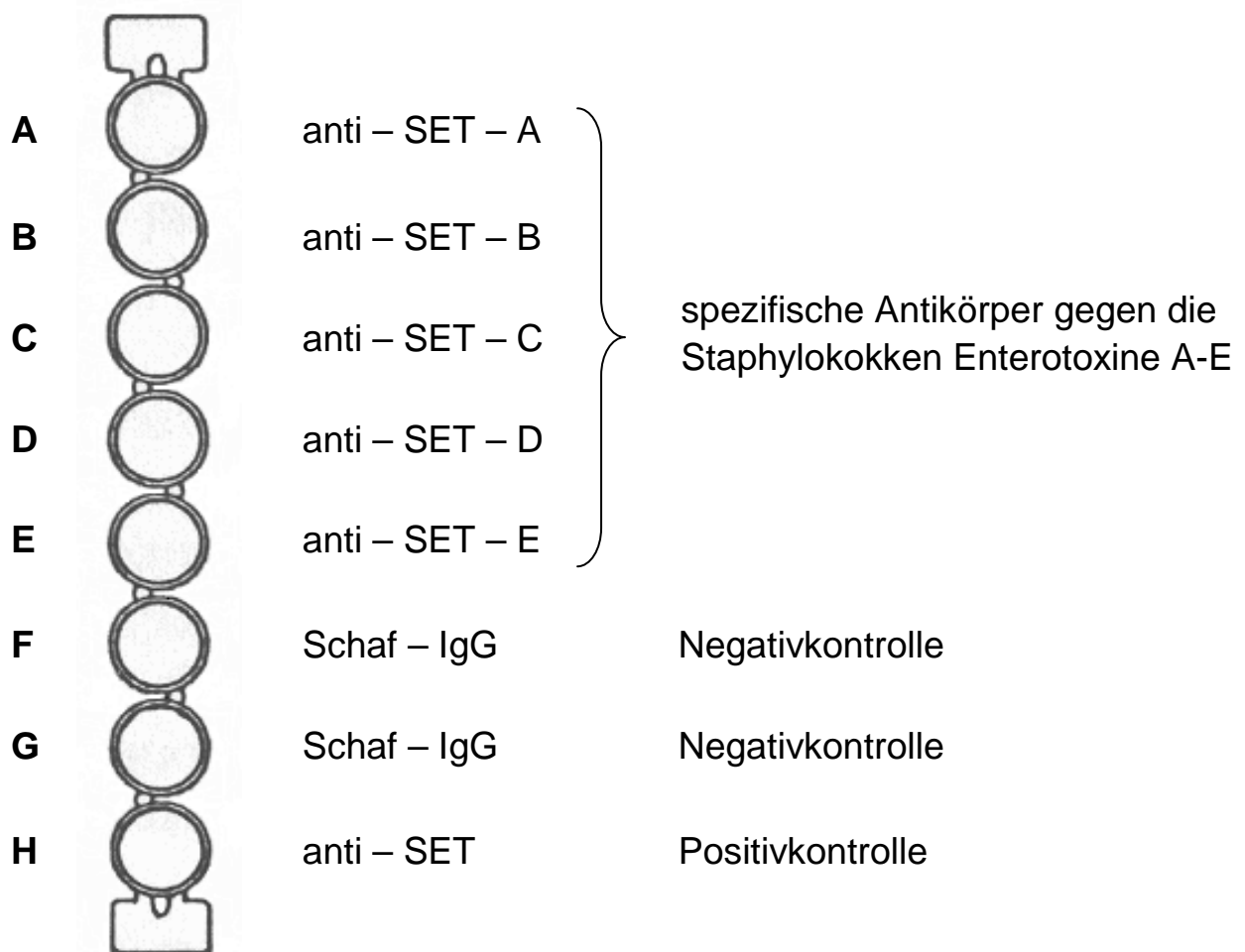
Neben den Salmonellen gehören die *Staphylococcus aureus* Enterotoxine zu den Hauptverursachern von Lebensmittel-Intoxikationen. Generell wird angenommen, dass eine Population von 5×10^5 Zellen enterotoxinbildender *Staphylococcus aureus* Stämme pro Gramm Lebensmittel notwendig ist, um zu einer Intoxikation zu führen. Andere Studien zeigten, dass bereits Mengen von 100 bis 200 ng Staphylokokken Enterotoxine zu den Symptomen einer Lebensmittelvergiftung führen können.

Eine Reihe von Lebensmitteln sind an SET-Intoxikationen besonders häufig beteiligt, so z. B. Teigwaren, fertige Fleischgerichte, gekochter Schinken, Pasteten, Hühnerfleischprodukte, Fisch, Fischprodukte, Milch, Milcherzeugnisse, Speiseeis, Eierprodukte, Salate, Backwaren, Kuchenfüllungen sowie Zubereitungen aus

diesen Lebensmitteln. Die Enterotoxine der serologischen Gruppen A, B, C, D und E sind dabei von wesentlicher Bedeutung.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen A - E und H sind mit spezifischen Antikörpern gegen die Staphylokokken Enterotoxine A, B, C, D und E beschichtet. Die Kavitäten F und G sind mit Antikörpern von nicht immunisierten Tieren beschichtet (Kontrolle). Es ergibt sich folgendes Schema:



Mikrotiterstreifen des RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E-Enzymimmunoassays

Die angegebene Zuordnung ergibt sich beim korrekten Einsetzen der Mikrotiterstreifen in den Halterahmen. Hierbei ist nur die angegebene Orientierung möglich (schmales Ende der Streifen → oben, breites Ende der Streifen → unten).

Die Probelösungen werden jeweils in die Kavitäten A bis G (entsprechend der Bezeichnung auf dem Halterahmen) und die Positivkontrolle in die Kavität H pipetiert. Eventuell in der Probelösung vorhandene Toxine binden an die entsprechenden Fänger-Antikörper. Nicht gebundene Probenbestandteile werden in einem

Waschschrift entfernt. Die immobilisierten Enterotoxine werden mit einem biotinkonjugierten anti-SET-Antikörpergemisch gebunden. Nicht gebundenes Konjugat wird anschließend in einem Waschschrift entfernt. Nach Zugabe von Streptavidin-POD und einem weiteren Waschschrift erfolgt die Detektion durch Zugabe von Substrat/Chromogen-Lösung. Gebundenes Streptavidin-POD-Konjugat wandelt das rötlich gefärbte Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450/620 ±10 nm; die Extinktion der Lösung ist proportional zur SET-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Jeder Testkit enthält alle Reagenzien für 12 Tests (von den 96 Kavitäten der Mikrotiterplatte wird pro Test 1 Streifen à 8 Einzelkavitäten benötigt).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Positive control Positivkontrolle	rot	gebrauchsfertig	rot gefärbt	2 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10 x	100 ml
Conjugate 1 Konjugat 1	rot	gebrauchsfertig	grün gefärbt	11 ml
Conjugate 2 Konjugat 2	schwarz	gebrauchsfertig	blau gefärbt	11 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	rot gefärbt	13 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Laborwaage und Wiegeschälchen
- Mixer o. ä. zum Homogenisieren der Probe (für Lebensmittelmatrices wie Molkepulver und andere, die sich schwer homogenisieren lassen, ist es dringend empfohlen, einen Ultraturrax zu verwenden)
- 50 ml Rührchen
- optional: Sterilfilter
- 100 µl Mikropipette
- Inkubator 35 - 37 °C

- Multikanalpipette oder Mikrotiterplatten-Washer
- optional: Mikrotiterplatten-Photometer (450/620 ± 10 nm)

Zusätzlich benötigtes Zubehör für die Probenaufarbeitung nach der offiziellen europäischen Screeningmethode, Version 5, September 2010:

Genereller Hinweis: Es wird dringend empfohlen, nur Laborgefäße (Trichter, Becher, Röhrchen, usw.) aus Laborglas oder Polypropylen zu verwenden, da andere Materialien die Toxine absorbieren können.

- Becherschüttler (Raumtemperatur)
- Kühlzentrifuge (4 °C), 3130 bis 10 000 g, Zentrifugenröhrchen
- Dialysemembran, MWCO: 6 – 8 kD, flache Weite: 23 ± 2 mm (z.B. Spectra/Por[®]1, ref: 132 650, Spectrum)
- Verschlüsse, Verschlussweite = 35 mm (z.B. Spectra/Por[®], ref: 132736, Spectrum)
- pH-Meter
- 50 ml Röhrchen
- Trichter
- Glaswolle
- Laborglaswanne
- Kühlschrank (5 °C ± 3 °C) und Gefrierschrank (≤ -18 °C)
- Vortexer
- Mikrotiterplatten-Photometer (450/620 ± 10 nm)

5.2. Reagenzien:

- PBS-Puffer, pH 7,4 (0,55 g NaH₂PO₄ x H₂O + 2,85 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 8,7 g NaCl ad 1000 ml dest. Wasser)
- destilliertes Wasser (optional: steriles Wasser)
- n-Heptan (für Proben mit hohem Fettgehalt)
- Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion = BHI) für die Voranreicherung potentiell toxinbildender Staphylokokkenstämme. BHI kann beispielsweise über Sifin, Berlin (TN 1216), Heipha, Eppelheim (3110r), Oxoid, Wesel (CM 225) oder andere Nährmedienhersteller bezogen werden.

Zusätzliche Reagenzien zur Durchführung der offiziellen europäischen Screeningmethode:

- Salzsäure (5N und 1N)
- Natriumhydroxidlösung (5N und 1N)
- Polyethylenglykol 20000 (PEG), Synthesenqualität

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

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

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.

Das rötlich gefärbte Substrat-/Chromogen 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 ordnungsgemäßer 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 des rötlichen Substrat-/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 1,0 ($E_{450/620 \pm 10 \text{ nm}} < 1,0$) für die Positivkontrolle

9. Probenvorbereitung

Die Proben müssen bis zur Extraktion bei 5 °C ± 3 °C gelagert werden. Gefrorene Proben sollten bis Extraktionsbeginn komplett aufgetaut sein.

Wichtige Hinweise: Um eine gute Präzipitation der Feststoffe sowie eine vollständige Phasentrennung durch die Zentrifugation zu gewährleisten, sollte im Bedarfsfall die Zentrifugationsgeschwindigkeit und/oder -dauer erhöht werden.

Da Lebensmittelproteine mit Toxinen oder den im Test enthaltenen Antikörpern interagieren und so den Nachweis unter Umständen empfindlich stören können, wird dringend empfohlen, die Aufarbeitung von Lebensmittelproben nach der „*Offiziellen Europäischen Screeningmethode des Europäischen Referenzlabores für Koagulase-positive Staphylokokken*“ durchzuführen (s. 9.5.).

Die unter 9.1. bis 9.3. beschriebenen vereinfachten Aufarbeitungsmethoden sind zur Extraktion von SET aus besonders kritischen Matrices (z.B.: Fisch, Schokolade, gesäuertes/sauer eingelegtes Gemüse) unter Umständen nicht geeignet. Bei diesen Lebensmitteln sind zum Teil niedrige Wiederfindungsraten und/oder unspezifische Bindungen von Matrixproteinen an die Testantikörper beobachtet worden.

Eine Liste verschiedener SET-Wiederfindungsraten, die für eine breite Palette verschiedener Lebensmittelmatrices ermittelt wurden, ist auf Anfrage erhältlich.

9.1. Vereinfachte Aufarbeitung von Milch

- Milchproben (10 - 25 ml), vor allem Rohmilchproben, in kühlem Zustand zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
(wenn keine Kühlzentrifuge verfügbar, Proben vorkühlen)
- die obere Sahneschicht abheben und gründlich entfernen
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Vereinfachte Aufarbeitung von Nudeln, Reis (gekocht), Fleisch, Eiscreme, Fertiggerichten und anderen Lebensmitteln mit einem Fettgehalt unter 40 %

- 10 - 25 g Probe zerkleinern, mit 1,5 ml PBS-Puffer (pH 7,4) je g Probe homogenisieren (z. B. 10 g Probe + 15 ml Puffer)
- 15 min schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
- gegebenenfalls die obere Fettschicht entfernen
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Vereinfachte Aufarbeitung von Lebensmitteln mit einem Fettgehalt von mehr als 40 %

- 10 - 25 g Probe zerkleinern und mit 1,5 ml PBS-Puffer (pH 7,4) je g Probe homogenisieren (z.B. 10 g Probe + 15 ml Puffer)
- 15 min schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
- den Überstand in ein anderes Zentrifugenröhrchen überführen, mit der gleichen Menge n-Heptan versetzen und 5 min gründlich mischen
- zentrifugieren: 5 min / 3500 g / 10 °C
- die obere Heptanphase großzügig absaugen, ein Überführen von Heptanresten in die Kavitäten ist zu vermeiden
- von der resultierenden wässrigen (unteren) Phase 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Bakterienkulturen

Potentiell toxinbildende Stämme der Spezies *S. aureus* (oder *S. hyicus*/*S. intermedius*) müssen vor der Untersuchung über Nacht in Brain-Heart-Infusion (BHI) vorkultiviert werden, um die optimale Bildung der Enterotoxine zu gewährleisten.

Wichtiger Hinweis: Vor Beginn der Untersuchung ist sicher zu stellen, dass die zu analysierenden Stämme in Reinkultur vorliegen.

- Überstände von mikrobiologischen Flüssigkulturen zentrifugieren:
5 min / mind. 3500 g
- Sterilfiltration des Kulturüberstandes ist erforderlich, da nicht präzipitierte oder wieder aufgewirbelte Zellen die Testreaktion stören können
- 100 µl Filtrat pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung: Eventuell auftretende Hintergrundeffekte (zu hohe Werte bei den Negativkontrollen) können vermieden werden, wenn der zentrifugierte und sterilfiltrierte Kulturüberstand mit PBS weiter verdünnt wird.

Dasselbe gilt, wenn die OD-Werte für nachgewiesene Toxine außerhalb des linearen Bereiches des Messgeräts (etwa $\geq 3,0$; bitte Herstellerangaben beachten) liegen.

Probenaufarbeitungen und Kulturüberstände können bei 5 ± 3 °C gelagert werden, wenn die Analyse innerhalb von 48 h durchgeführt werden kann. Für längere Lagerzeiten müssen die Lösungen bei ≤ -18 °C eingefroren werden.

Eingefrorene Probenaufarbeitungen und Kulturüberstände müssen vor Beginn der Untersuchung vollständig aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden. Die einmal aufgetauten Proben direkt mit dem RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E analysieren. Sie können nicht erneut tiefgefroren gelagert werden.

Probenaufarbeitungen und Kulturüberstände die für ein SET-Screening mit RIDASCREEN® SET Total hergestellt wurden, können direkt zur Toxinidentifizierung mit RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E verwendet werden.

9.5 Probenvorbereitung nach der offiziellen europäischen Screeningmethode, Version 5, September 2010

9.5.1. Vorbereitende Schritte vor der Toxinextraktion

Da Staphylokokken Enterotoxine in einer Probe heterogen verteilt sein können, sollte die ganze Probe (oder ein repräsentativer Teil davon) mit einem Mixer homogenisiert werden.

25 g \pm 0,1 g der homogenisierten Probe abwiegen und in ein Becherglas überführen.

Anmerkung 1: Handelt es sich bei der Probe um einen Käse mit Rinde, sind etwa 10% Rinde und 90% Käse zu verwenden.

Anmerkung 2: Für die Rekonstitution pulverförmiger Proben müssen 12,5 g Pulver eingewogen und mit 12,5 g destilliertem Wasser versetzt werden. Herstellerangaben zur Aufbereitung des Pulvers sollten hierbei berücksichtigt werden (z. B.: Milchpulver als 10%ige Lösung ansetzen.)

Anmerkung 3: Falls der Verdacht auf Ausbruch einer Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung besteht, liegt das Minimum der zu testenden Lebensmittelmenge bei 12,5 g.

9.5.2. Extraktion der Enterotoxine

40 ml warmes, destilliertes oder deionisiertes Wasser ($38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) zur abgewogenen Testportion hinzufügen. Gemisch mit einem Turrax, Mixer oder Labormischer homogenisieren. Mixersystem nach der Benutzung mit destilliertem Wasser spülen und das Spülwasser der zu analysierenden Probe hinzufügen.

Anmerkung 1: Bei einer flüssigen Probe müssen keine 40 ml destilliertes Wasser hinzugefügt werden.

Zur homogenen Verteilung der Toxine die Probe bei Raumtemperatur für 30 min schütteln.

Ansäuerungsschritt: Gemisch mit wenigen Tropfen Salzsäure zu einem pH zwischen **3,5 und 4,0** ansäuern.

*Anmerkung 2: Um die Denaturierung der Enterotoxine während der Ansäuerung zu vermeiden, ist es notwendig, den pH-Bereich von **3,5 bis 4,0** genau einzuhalten. Zur Einstellung muss ein geeignetes pH-Meter verwendet werden.*

Ein pH unter 3,0 ist strikt zu vermeiden! Sollte bei der Ansäuerung mit Salzsäure der pH unter die genannte Grenze sinken, muss eine neue 25 g Portion der Probe abgewogen und mit der Aufarbeitung wie unter 9.5.1 erneut begonnen werden.

Das Gemisch bei 3130 x g für 15 min bei **4 °C oder Raumtemperatur (20 – 25 °C)** zentrifugieren. Den Überstand in ein Becherglas überführen.

Anmerkung 3: Es ist empfehlenswert, die verwendeten Gefäße und Geräte nach jedem Schritt mit destilliertem Wasser zu spülen, um so ein Maximum an vorhandenem Toxin wiederfinden zu können.

Anmerkung 4: Falls der Überstand nach dem Zentrifugieren nicht klar sein sollte, ist die Zentrifugation nach obiger Beschreibung erneut durchzuführen.

Anmerkung 5: Der pH-Wert des Überstandes muss nach der ersten Zentrifugation unter 4,5 liegen. Wenn das nicht der Fall ist, muss erneut auf pH 3,5 bis 4,0 angesäuert und anschließend noch einmal zentrifugiert werden.

Neutralisationsschritt: Das Gemisch mit NaOH-Lösung auf einen pH-Bereich zwischen **7,4 und 7,6** neutralisieren. Anschließend erneut wie beschrieben zentrifugieren. Die neutralisierte wässrige Phase (Überstand) möglichst vollständig abnehmen und weiterverwenden.

*Anmerkung 6: um die Denaturierung der Enterotoxine während der Neutralisation zu vermeiden, ist es notwendig, den pH-Bereich von **7,4 bis 7,6** genau einzuhalten. Zur Einstellung muss ein geeignetes pH-Meter verwendet werden.*

Ein pH über 9,0 ist strikt zu vermeiden! Sollte bei der Neutralisation mit Natriumhydroxid der pH-Wert über die genannte Grenze steigen, muss eine neue 25 g Portion der Probe abgewogen und mit der Aufarbeitung wie unter 9.5.1 erneut begonnen werden.

9.5.3. Konzentration des Extrakts mittels Dialyse

Benötigt pro Einzelprobe:

- 30% (w/v) PEG-Lösung (pro Probe jeweils 30 g PEG auf 100 ml destilliertes Wasser) vorbereiten.
- 50 bis 60 cm von der Dialysemembran abschneiden.
- Membran nach Herstellerangabe in destilliertem Wasser einweichen (mindestens für 30 min bei Raumtemperatur).
- Membran außen und innen mit destilliertem Wasser spülen.
- das eine Ende der Membran mit einem Verschluss verschließen und mit der neutralisierten wässrigen Phase der Probenvorbereitung (9.5.2) befüllen. Dazu einen Trichter mit einem Stück Glaswolle verwenden, um resuspendierte Partikel zurückzuhalten. Das offene Ende der Membran ebenfalls mit einem Verschluss verschließen.

Anmerkung 1: falls die Probe sehr salz- oder zuckerhaltig ist, ist eine zweifache Dialyse gegen destilliertes Wasser durchzuführen. Dabei muss innerhalb einer Stunde unter ständiger Bewegung der Dialysemembran zweimal gegen 2 l destilliertes Wasser dialysiert werden.

- die 30% (w/v) PEG-Lösung in eine Laborglaswanne geben und die befüllte Dialysemembran hineinlegen. Den Probenextrakt über Nacht bei $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ aufkonzentrieren lassen.

Anmerkung 2: falls der Extrakt nach der Dialyse über Nacht nicht genügend aufkonzentriert sein sollte, ist die Dialysezeit entsprechend zu verlängern. Unter Umständen kann es notwendig sein, der Lösung weiteres PEG-Pulver hinzuzufügen

- die Dialysemembran aus der PEG-Lösung nehmen und die Außenseite mit destilliertem Wasser spülen, um alle Spuren von PEG zu entfernen.

Entnahme des konzentrierten Extrakts unter Verwendung von:

- PBS-Lösung, wenn der Extrakt Milch oder Milchprodukte enthält**
- deionisiertem Wasser, wenn der Extrakt weder Milch noch Milchprodukte enthält**

Den Innenteil der Membran gut spülen, um am Ende eine konzentrierte Extraktmasse zwischen 5,0 und 5,5 g zu erhalten (maximal 5,8 g wenn der Extrakt klebrig sein sollte).

Bei der Entnahme des Konzentrates aus der Dialysemembran wird empfohlen:

- die Innenseiten der Membran gegeneinander zu reiben, um die Toxine von den Membranwänden zu lösen und eine maximale Ausbeute zu gewährleisten.
- mehrfach kleine Tropfen PBS oder deionisiertes Wasser auf die Innenseite der Membran zu geben und diese wiederholt zu spülen um möglichst alle vorhandenen Enterotoxine des Konzentrates zu erhalten.

Den konzentrierten Extrakt vorsichtig in ein Glasgefäß überführen.

Anmerkung 3: wenn das Ausgangsgewicht der zu untersuchenden Probe geringer ist als 25 g (9.5.1, Anmerkung 3), sollte das Verhältnis von Gewicht der abgewogenen Testportion zu konzentriertem Extrakt bei 5:1 liegen

Bei Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen oder innerhalb von speziellen Studien kann die Masse der Testportion anderen Größenordnungen als 25 g entsprechen. Das Verhältnis von Masse der Testportion zum konzentrierten Extrakt ist in folgender Tabelle dargestellt:

Masse der Testportion	Konzentrierter Extrakt
17,5 g - 25,0 g	3,5 g - 5,0 g (im Verhältnis 5:1)
12,5 g bis 17,5 g	3,5 g (3,9 g max.)

Anmerkung 4: der konzentrierte Extrakt kann bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ gelagert werden, wenn die Analyse innerhalb von 48 h durchgeführt werden kann. Für längere Lagerzeiten Extrakt bei $\leq -18\text{ °C}$ einfrieren. Vor Testbeginn muss der konzentrierte Extrakt komplett aufgetaut und homogenisiert sein.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien sowie die aufgearbeiteten Proben müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur ($20 - 25\text{ °C}$) gebracht werden.

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 10 ml Pufferkonzentrat + 90 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der gebrauchsfertige Puffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei $2 - 8\text{ °C}$.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist wichtig für den Erhalt eindeutiger Resultate. Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Mikrotiterstreifen in den Halterahmen einsetzen, wie Proben vorhanden sind. Für eine Probe werden alle Kavitäten eines Streifens benötigt.
2. Je $100\text{ }\mu\text{l}$ der vorbereiteten Probe in die Kavitäten A bis G und $100\text{ }\mu\text{l}$ Positivkontrolle in die Kavität H, entsprechend der Beschriftung auf dem Halterahmen, pipettieren. Die Platte abdecken und für 1 h bei $35 - 37\text{ °C}$ inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer (10.1.) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.
4. Je $100\text{ }\mu\text{l}$ Konjugat 1 in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen, die Platte abdecken und für 1 h bei $35 - 37\text{ °C}$ inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$

Waschpuffer (10.1.) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.

6. Je 100 µl Konjugat 2 in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen, die Platte abdecken und für 30 min bei 35 - 37 °C inkubieren.
7. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 300 µl Waschpuffer (10.1.) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.
8. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen, die Platte abdecken und für 15 min bei 35 - 37 °C inkubieren.
9. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450/620 ±10 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

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

11.1. Qualitätskontrolle des Tests

1. Der Extinktionswert der Positivkontrolle sollte gleich oder größer 1,0 sein.
2. Der Mittelwert der Extinktionswerte der Negativkontrollen sollte kleiner oder gleich 0,2 sein.

Falls diese Kriterien nicht erfüllt werden, sollten die folgenden Arbeitsschritte überprüft und evtl. korrigiert und der Test danach wiederholt werden:

- Überprüfen des Haltbarkeitsdatums des Testkits
- sicherstellen, dass alle Reagenzien des Testkits vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden (20 - 25 °C)
- Verwendung von neuen Pipettenspitzen beim Pipettieren der Proben und Kontrollen (Vermeidung von Kreuzkontamination)
- Überprüfen der Sterilität des Wassers für das Ansetzen des Waschpuffers (evtl. steriles Wasser verwenden)
- unzureichendes Waschen / zu wenige Waschschrte (siehe 10.2.)
- kontaminierte Pipetten (regelmäßig reinigen)

11.2. Grenzwertberechnung

Der Mittelwert der Extinktionswerte der Negativkontrollen in Kavität F und G wird für jede Probe separat berechnet. Zum errechneten Mittelwert werden 0,15 addiert, um den Grenzwert zu erhalten.

Beispiel: Negativkontrolle 1 (Kavität F) = 0,008
 Negativkontrolle 2 (Kavität G) = 0,010
 Mittelwert = 0,009
 Grenzwert = 0,009 + 0,15 = 0,159

11.3. Interpretation der Ergebnisse

1. Eine Probe wird als POSITIV für ein bestimmtes SET bewertet, wenn der Test als gültig (11.1.) beurteilt wurde und die in der entsprechenden Kavität bei 450/620 \pm 10 nm gemessene Extinktion größer oder gleich dem ermittelten Grenzwert ist.
2. Eine Probe wird als NEGATIV für ein bestimmtes SET bewertet, wenn der Test als gültig (11.1.) beurteilt wurde und die in der entsprechenden Kavität bei 450/620 \pm 10 nm gemessene Extinktion kleiner als der ermittelte Grenzwert ist.

12. Kreuzreaktivitäten der Antikörper

Bekannte Kreuzreaktivitäten kommen zwischen Antikörper/Toxin bei A/E, E/A, B/C und C/B vor. Dabei können die Kreuzreaktivitäten der Antikörper zu den jeweiligen Toxinen im Bereich von 10 - 50% liegen. Bestimmte Lebensmittelmatrices (z.B. Milch, Wurst) können die Kreuzreaktivität verstärken oder auch abschwächen. Bei Verdacht auf Kreuzreaktivität sollte der Probenextrakt mit PBS verdünnt (s.u.) und erneut gemessen werden.

Um deutlich zwischen Kreuzreaktivität und tatsächlichem Nachweis unterscheiden zu können, sollten bei positiven Proben die Extinktionswerte der Einzeltoxine im OD-Wert-Bereich von 1,0 bis 2,5 liegen. Bei positiven Proben, deren Extinktionswerte größer 2,5 sind, sollte die Probe so weit verdünnt werden, dass deren spezifisches Signal im genannten Bereich von 1,0 bis 2,5 liegt.

Beispiel 1 für **eine** Kreuzreaktivität zwischen A/E:

A) Erste Messung:

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin A: 4,1

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin E: 3,6

B) Die Probe wird soweit verdünnt, dass die obigen OD-Werte im Bereich zwischen 1,0 und 2,5 liegen:

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin A: 2,5

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin E: **1,0**

Auswertung: Das Signal der Probe in der Kavität von Toxin E ist mit 1,0 zwar deutlich positiv, beträgt allerdings nur 40% des spezifischen Signals der Probe in Kavität A. Dies weist auf eine Kreuzreaktivität hin. Die Probe enthält somit ausschließlich Toxin A.

Beispiel 2 für **keine** Kreuzreaktivität zwischen A/E:

A) Erste Messung:

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin A: 4,1

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin E: 3,6

B) Die Probe wird soweit verdünnt, dass die obigen OD-Werte im Bereich zwischen 1,0 und 2,5 liegen:

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin A: 2,5

OD-Wert Kavität für Nachweis Toxin E: **1,9**

Auswertung: Im Unterschied zu Beispiel 1 beträgt das OD-Signal der Probe in Kavität Toxin E 1,9, das deutlich mehr als 50% des spezifischen Signals der Probe in Kavität A ist. Eine Kreuzreaktivität liegt hier somit nicht vor. Daher würde in diesem Fall die Probe sowohl Toxin A als auch Toxin E beinhalten.

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® SET A,B,C,D,E

Brief information

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (Art. No.: R4101) is an enzyme immunoassay for the identification of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in fluid and solid foods as well as in bacterial cultures.

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

The test kit is sufficient for 12 determinations.

A microtiter plate spectrophotometer is required for determination.

Sample preparation: extraction according to a simplified method for working up of samples (partly applicable, s. point 9. „Sample preparation“) by homogenization with buffer and sample preparation

extraction according to the „Official European Preparation Method“ (dialysis concentration method, (see point 9.5.)

Time requirement: sample preparation for 10 samplesca. 1 h (simplified working up)

sample preparation for 10 samplesca. 19 h (official method, dialysis overnight)

test implementation (incubation time).....2 h 45 min

Limits of detection:

Simplified working up liquid samples 0.25 ng/ml Toxin
solid samples0.375 ng/g Toxin
supernatants from bacterial cultures 0.25 ng/ml Toxin

Dialysis concentration liquid samples 0.05 ng/ml Toxin
solid samples0.05 ng/g Toxin

The specificity of the RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E 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 (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDASCREEN® SET Total (R4105; 96 determinations)

RIDASCREEN® SET Total (R4106; 48 determinations)

1. Intended use

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E is a sandwich enzyme immunoassay for the identification of staphylococcal enterotoxins (SET) A, B, C, D, E in fluid and solid foods as well as in bacterial cultures. Based on its sensitivity the RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E test is consequently clear superior to the immunodiffusion procedure which has a detection limit of 0.1 mg/ml.

2. General

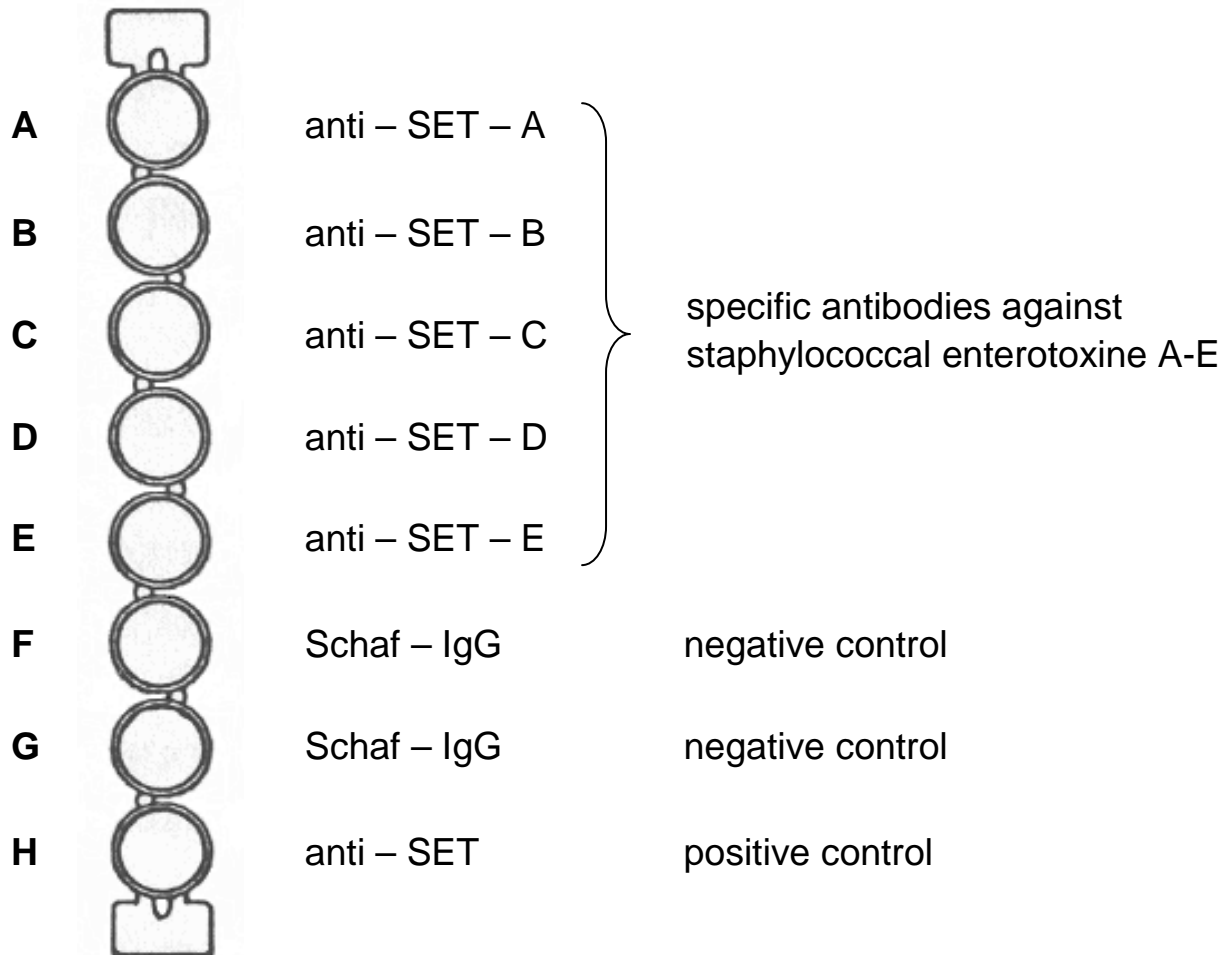
Staphylococci belong to the family of micrococci. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus hyicus* produce one or more heat stable proteins which behave as enterotoxins. These are the causative agents for a number of food poisoning cases.

The main causative agent of food poisoning are enterotoxins of *Staphylococcus aureus* next to the Salmonella. Generally, it is assumed that a population of 5×10^5 cells of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains per gram of food is required to lead to an intoxication. However, other studies show that only 100 - 200 ng of staphylococcal enterotoxins can lead to symptoms of food poisoning.

SET intoxications have been frequently associated with pasta, finished meat products, ham, pies, chicken meat products, fish, fish products, milk, milk products, ice-cream, egg products, salads, pastries and cake stuffing as well as preparations from these food products. The enterotoxins of the serological group A, B, C, D, E are very significant.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells A - E and H in the microtiter strips are coated with specific antibodies against staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E, the wells F and G serve as controls and are coated with antibodies of non-immunized animals in the following pattern:



Micro titer strips of the RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E enzyme immunoassay

This sequence is obtained when the microtiter strips are inserted properly into the frame (narrow end of the strip → at the top, wide end of the strip → at the bottom). By adding the sample solution to the wells A to G (see the letters on the left side of the frame) and the positive control to well H, present toxins will bind to specific capture antibodies. Sample components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. The immobilized toxins were bound by a mixture of specific antibodies conjugated to biotin. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. After addition of Streptavidin-POD as well as an additional washing step the detection is performed by adding the substrate/chromogen solution. Bound Streptavidin-POD conjugate converts the reddish 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 450/620 \pm 10 nm; the absorbance is proportional to the SET concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains all reagents which are sufficient for 12 tests (from the 96m wells of the microtiter plate one strip of 8 single wells is necessary per single test).

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	ready-to-use		96 wells
Positive control	red	ready-to-use	red stained	2 ml
Wash buffer	brown	Concentrate	10 x	100 ml
Conjugate 1	red	ready-to-use	green stained	11 ml
Conjugate 2	black	ready-to-use	blue stained	11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready-to-use	red stained	13 ml
Stop solution	yellow	ready-to-use		14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- analytical balance and weighing vessels
- Blender, Mixer or equivalent (for sample homogenization). For whey powder and all type of food difficult to mix, a turrax is highly recommended in order to have a homogeneous sample.
- 50 ml tubes
- optional: sterile filter cartridges
- 100 μ l micro pipette
- Incubator 35 - 37 °C (95 – 98.6 °F)
- Multi channel pipette or microwell plate washer
- optional: microwell plate spectrophotometer (450/620 \pm 10 nm)

Additional equipment for sample preparation according to the European official screening method (EOSM) Version 5, September 2010:

General remark: it is strictly recommended to use only laboratory vessels of glass-ware or polypropylene-ware (e.g. tubes, funnels, beakers, vials), to avoid adsorption of toxins

- Shaker for beakers (room temperature)
- Centrifuge, 3130 to 10 000 g, capable of being refrigerated at 4°C, centrifuge tubes
- Dialysis membrane, MWCO: 6 – 8 kD, flat width: 23 ± 2 mm (e.g. Spectra/Por[®]1, ref: 132 650, Spectrum)
- Closures, sealing width = 35 mm (e.g. Spectra/Por[®], ref: 132 736, Spectrum)
- pH-meter
- 50 ml tubes
- Funnel
- Glass-wool
- Tray
- Fridge (5 ± 3 °C/ 41 ± 5.4 °F) and freezer (≤ -18 °C/ ≤ -0.4 °F)
- Vortex
- Microwell plate spectrophotometer ($450/620 \pm 10$ nm)

5.2. Reagents:

- PBS buffer, pH 7.4, (0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8.7 g NaCl, fill up to 1000 ml with distilled water)
- Distilled or osmosed water (optional: sterile water)
- n-heptane (for samples with high fat content)
- Brain-Heart-Infusion (BHI) for the pre-enrichment of potentially toxin forming Staphylococci strains. Ask your local producer/distributor of culture media for the supply with BHI

Additional reagents for EOSM:

- Hydrochloric acid (5N and 1N)
- Sodium hydroxide (5N and 1N)
- Polyethylene glycol 20 000 (PEG), quality for synthesis

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.

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

7. Storage instructions

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

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

The reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the 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 1.0 absorbance units ($A_{450/620 \pm 10 \text{ nm}} < 1.0$) for the positive control

9. Preparation of Samples

The samples have to be stored at 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F) until extraction. The samples should be completely defrosted before the extraction step.

Important notes: For good precipitation of solids and for complete separation of the phases while centrifugation it is necessary in some cases to increase centrifugation speed and/or time.

Food proteins may interact with toxins or antibodies of the test kit. In case of interaction they will affect the detection of the toxins tremendously. Therefore it is strongly recommended to prepare food samples according to the „Official European Screening Method of the European Reference Laboratory for Coagulase-positive Staphylococci” (see 9.5.).

The simplified methods for sample working up described under 9.1. to 9.3. are possibly not suitable for extraction of SET from difficult matrices (e.g. fish, chocolate, acidified vegetables/pickles). For these foods particularly low recovery rates as well as unspecific bindings of matrix proteins to the test antibodies have been observed.

A list of recovery rates for SET according to a variety of different food matrices is available on request.

9.1. Simplified working up of milk

- centrifuge milk samples (10 - 25 ml), especially raw milk samples, in cool condition: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
(if no cooled centrifuge is available pre-cooling of samples is necessary)
- remove upper cream layer by absorbing it generously
- use 100 µl per well in the assay

9.2. Simplified working up of pasta and rice (cooked), meat, ice cream, processed food and other food with a fat content of less than 40 %

- mince 10 - 25 g of the sample and homogenize with 1.5 ml of PBS buffer (pH 7.4) per g sample (e.g. 10 g sample + 15 ml buffer)
- shake for 15 min
- centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- if necessary, remove upper fat layer
- use 100 µl per well in the assay

9.3. Simplified working up of food with a fat content of more than 40 %

- mince 10 - 25 g of the sample and homogenize with 1.5 ml of PBS buffer (pH 7.4) per g sample (e.g. 10 g sample + 15 ml buffer)
- shake for 15 min
- centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- transfer supernatant to another centrifugal vial, add the same volume of n-heptane and mix thoroughly for 5 min
- centrifuge: 5 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- remove upper heptane layer generously, avoid to transfer heptane residues into the wells
- use 100 µl of the resulting aqueous (lower) phase per well in the assay

9.4. Bacterial cultures

Strains of the specie *S. aureus* (as well as *S. hyicus* or *S. intermedius*) which are potentially toxin forming have to be pre-enriched in Brain-Heart-Infusion (BHI) to ensure optimal formation of enterotoxins.

Important note: Prior to analysis please make sure that all strains to be tested are present in pure cultures

- centrifuge supernatants of microbiological fluid cultures 5 min / at a minimum of 3500 g / 10 °C (50 °F)
- sterile filtration of the supernatant is strongly recommended as not precipitated or re-suspended cells may influence the test reaction
- use 100 µl of the filtrate per well in the assay

Remark: Background effects which may occur (too high values for the negative controls) can be avoided, if the sterile filtrated supernatant is further diluted with PBS buffer.

This is also valid if OD-values measured for detected toxins are out of range of linearity (about ≥ 3.0 , please consider manufactures' instructions).

Sample preparations as well as culture supernatants can be stored at 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F) if the analysis can be performed within 48 h. For longer storage periods the solutions have to be frozen at ≤ -18 °C (≤ -0.4 °F).

Frozen sample preparations or culture supernatants have to be completely defrosted and brought to room temperature before performance of analysis. Implement the once thawed samples into RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E immediately. They can't be stored deep frozen again.

Sample preparations or culture supernatants prepared for analysis with RIDASCREEN® SET Total can be used directly for toxin identification with RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.

9.5. Sample preparation according to the European official screening method, Version 5, September 2010

9.5.1. Preparatory steps before toxin extraction

As staphylococcal enterotoxins can be heterogeneously dispatched in the sample, mix the whole sample if possible, or a representative part of it, with a mixer.

Weight 25 g \pm 0.1 g of the mixed sample and transfer this test portion into a beaker.

NOTE 1: In case of cheese with rind, take about 10% of rind for 90% of cheese.

NOTE 2: In case of powder samples, reconstitute the sample by weighting 12.5 g of sample and 12.5 g of distilled water or follow the manufacturer's instructions (ex: milk powder at 10%).

NOTE 3: In the case of a suspected Staphylococcal Food Poisoning Outbreak (SPFO), the minimal size of the test portion to perform the analysis is equal to 12.5 g.

9.5.2. Extraction step

Add 40 mL of warm distilled or osmosed water (38 °C \pm 2 °C/100.4 \pm 7.2 °F) to the test portion and homogenize the mixture by using a turrax, a blender or a stomacher. Rinse the system with distilled water.

NOTE 1: In case of liquid product, don't add 40 mL of distilled water.

Allow the toxin to diffuse by shaking the sample, at room temperature for at least 30 min.

Acidification step: Acidify the mixture with a few drops of hydrochloric acid in order to obtain a **pH between 3.5 and 4.0**.

*NOTE 2: During the acidification of the sample in order to keep enterotoxins in a good shape, a specific attention has to be given to: i) a pH-meter must be used and ii) **pH between 3.5 and 4.0** before centrifugation has to be respected.*

Be careful not to have a pH < 3.0 using hydrochloric acid. If the pH gets < 3.0, take another 25 g test portion and proceed as described on 9.5.1.

Centrifuge the mixture at least at 3130 x g for 15 min at **4 °C (32.9 °F) or room temperature**. Transfer the supernatant in a beaker.

NOTE 3: Do not hesitate to rinse with distilled water at each step to recover a maximum of toxin.

NOTE 4: If the supernatant is not clear enough, centrifuge again as described above.

*NOTE 5: The pH of the supernatant after the first centrifugation has to be < 4.5. If it is not the case, acidify until obtaining a **pH between 3.5 and 4.0** and centrifuge again as described above.*

Neutralization step: Neutralize the mixture using NaOH solution in order to obtain a **pH between 7.4 and 7.6**. Centrifuge again as described above. Recover the whole neutralized aqueous phase.

*NOTE 5: During the neutralization of the sample in order to keep enterotoxins in a good shape, a specific attention has to be given to: i) a pH-meter must be used and ii) **pH between 7.4 and 7.6** after neutralization has to be respected.*

Be careful not to rise above pH 9.0. If the pH is > 9.0, take another 25 g test portion and proceed as described on 9.5.1.

9.5.3. Dialysis-concentration step

For each sample:

- Prepare a 30% (w/v) PEG solution (30 g PEG / 100 mL distilled water).
- Cut about 50 to 60 cm of a dialysis membrane.
- Soak the membrane into distilled water following the instructions of the manufacturer (at room temperature during at least 30 minutes).
- Rinse the membrane with distilled water (outside and inside).
- Lock one end of the membrane with a closure, fill it up with the neutralised aqueous phase as prepared on 9.5.2 by using a funnel and a small piece of glass-wool to discard suspended particles. Lock the other end of the membrane with a second closure.

NOTE 1: If the sample to analyze contains high amounts of salt or sugar, conduct a dialysis under agitation with 2 L of distilled water, two times during one hour.

- Lay down the filled dialysis membrane in a tray containing the 30% (w/v) PEG solution.
- Allow the extracts to concentrate overnight at 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F).

NOTE 2: If the extract is not concentrated enough, lay down it in the PEG solution for more time or add some powder of PEG.

- Take the dialysis membrane out of the PEG solution and rinse the outer-part of the membrane with distilled water to remove all traces of PEG.

Recover the concentrated extract using:

- the PBS solution in the case of extract containing milk or milk products**
- osmosis water in the case of extract containing no milk nor milk products**

Rinse well the inner-part of the dialysis membrane to obtain a final concentrated extract mass ranging from 5.0 g to 5.5 g (maximum 5.8 g for the stick extracts).

During this step, it is recommended:

- To rub the inner-parts of the dialysis membrane (one against another inner-part) with the fingers in order to take off and to recover the maximum of enterotoxins.
- To pour small drops of PBS or osmosis water (several additions) and to rinse in several times the inside membrane in order to recover all enterotoxins.

Transfer carefully the concentrated extract into a glass vial.

NOTE 3: If the initial weight of the sample to be tested is lower than 25 g (9.5.1, note 3, in case of SFPO), take care to obtain a final ratio equal to 5 between the weight of the concentrated extract and the weight of the test portion.

In case of SFPO or special the test portion mass may differ from the size of 25 g. The ratio of test portion mass to concentrated extract is shown in the following table:

Test portion mass	Concentrated extract
17.5 g – 25.0 g	3.5 g – 5.0 g (ratio 5:1)
12.5 g to 17.5 g	3.5 g (3.9 g max.)

NOTE 4: If the concentrated extract is analyzed within 48 h, store it at 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F), otherwise store it at ≤ -18 °C (≤ -0.4 °F). The extract should be completely defrosted and homogenized before testing.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 10 ml buffer concentrate + 90 ml distilled water). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (98.6 °F). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. four weeks.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert as many microtiter strips into the microwell holder as samples are present. For each sample, all wells of a microtiter strip are required.
2. Add 100 µl of a sample to wells A to G of one microtiter strip, add 100 µl of the positive control to well H. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 1 h at 35 - 37 °C (95 – 98.6 °F).
3. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.
4. Add 100 µl of conjugate 1 to each well. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 1 h at 35 - 37 °C (95 – 98.6 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.
6. Add 100 µl of conjugate 2 to each well. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 30 min at 35 – 37 °C (95 – 98.6 °F).
7. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.
8. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 15 min at 35 – 37 °C (95 – 98.6 °F).
9. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450/620 ± 10 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

For evaluation RIDA[®]SOFT Win.NET (Art. No. Z9996) which is a software especially developed for RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays is available from R-Biopharm.

11.1. Quality control of the test (valid ranges for controls)

1. The absorbance value for the positive control should be equal or greater than 1.0.
2. The mean absorbance value for the negative controls should be equal or less than 0.2 units.

If these criteria have not been met, the following steps should be checked and corrected before repeating the test:

- check kit expiry date
- ensure sufficient time allowed for kit components to reach room temperature (20 – 25 °C / 68 - 77 °F)
- a new pipette tip must be used for each sample or control to avoid cross contamination
- check wash buffer for possible contaminations (poss. use sterile water for preparation)
- inadequate washing of wells/less washing steps as recommended (see 10.2.)
- contaminated pipettes (clean regularly)

11.2. Determination of threshold values

The mean absorbance value for the negative controls in wells F and G is determined separately for each sample. Add 0.15 to the mean value of the negative control to get the threshold value.

Example: Negative control 1 (well F) = 0.008
 Negative control 2 (well G) = 0.010
 Mean value = 0.009
 Threshold value = 0.009 + 0.15 = 0.159

11.3. Interpretation of results

1. A sample is considered POSITIVE for a certain SET if the test is valid (11.1.) and the absorbance measured at 450/620 ± 10 nm in the appropriate well is higher than or equal to the threshold value.
2. A sample is considered NEGATIVE for a certain SET if the test is valid (11.1.) and the absorbance measured at 450/620 ± 10 nm in the appropriate well is lower than the threshold value.

12. Crossreactivities of antibodies

Crossreactivities are known to occur between antibody/toxin: A/E, E/A, B/C and C/B. The percentage of crossreactivities is between 10 - 50%. Some food matrices (e. g.: milk, sausages) may enhance or weaken the crossreactivity. If crossreactivities are suspected the prepared samples should be diluted with PBS buffer (see below) and measured again.

To distinguish significantly between crossreactivity and actual detection the absorbance values of positive toxin measurements should be in a range between 1.0 to 2.5. For positive samples with higher extinction values than 2.5 the sample should be diluted, that the specific signal is in the range of 1.0 to 2.5.

Example 1 for crossreactivity between A/E:

A) Initial sample results:

Extinction value for detection of Toxin A: 4.1

Extinction value for detection of Toxin E: 3.6

B) The sample should be diluted to obtain an extinction value in the range between 1.0 and 2.5:

Extinction value for detection of Toxin A: 2.5

Extinction value for detection of Toxin E: **1.0**

Explanation: The signal of the sample in the cavity of toxin E is 1.0 and would be rated as strong positive. But it is only 40% of the specific signal of the sample in cavity A. This has to be evaluated as crossreactivity. The sample only contains toxin A.

Example 2 for no crossreactivity between A/E:

A) Initial sample results:

Extinktion value for detection of Toxin A: 4.1

Extinktion value for detection of Toxin E: 3.6

B) The sample should be diluted to obtain an extinktion value in the range between 1.0 and 2.5:

Extinktion value for detection of Toxin A: 2.5

Extinktion value for detection of Toxin E: **1.9**

The main difference between example 1 to example 2 is the extinktion value of the sample in cavity E (1.9), which is clearly above 50% of the specific signal of the sample in cavity A. In conclusion, there is no crossreactivity. The sample contains toxin A and toxin E.

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

www.r-biopharm.com