

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E

REF 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



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

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

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

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® 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. Der Testkit ist ausreichend für 12 Bestimmungen. Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Extraktion nach vereinfachter Aufarbeitungsmethode (nur bedingt anwendbar, siehe Punkt 9. „Probenaufarbeitung“) durch Homogenisieren mit Puffer und Zentrifugieren

Extraktion nach der „Offiziellen Europäischen Aufarbeitungsmethode“ (Dialysekonzentrationsmethode, siehe Punkt 9.5)

Zeitbedarf: Probenvorbereitung für 10 Proben ca. 1 h (einfache Aufarbeitung)

Probenvorbereitung für 10 Proben ca. 19 h (offizielle Methode, Dialyse über Nacht)

Testdurchführung (Inkubationszeit) 2 h 45 min

Nachweisgrenze

Einfache Aufarbeitung: Flüssige Proben 0,25 ng/ml Toxin
Feste Proben..... 0,375 ng/g Toxin
Überstand von Bakterienkulturen ... 0,25 ng/ml Toxin

Dialysekonzentration: Flüssige Proben 0,05 ng/ml Toxin
Feste Proben..... 0,05 ng/g Toxin

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

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 Werten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

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

Produktangebot

RIDASCREEN® SET Total (R4105; 96 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.

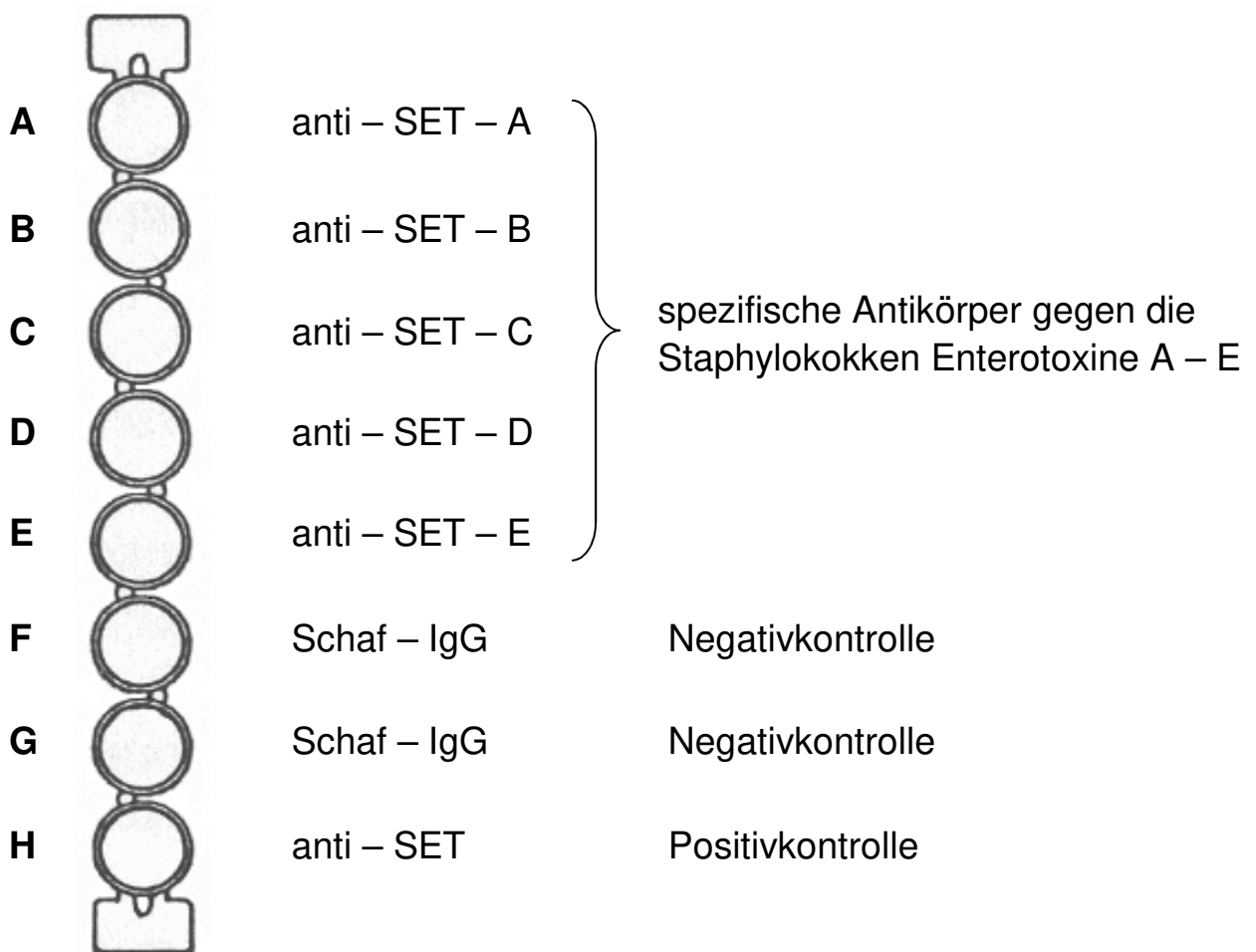
Neben den Salmonellen gehören die *Staphylococcus aureus* Enterotoxine zu den Hauptverursachern von Lebensmittel-Intoxikationen. Generell wird angenommen,

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 pipettiert. 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

Mit den Reagenzien einer Packung können 12 Bestimmungen durchgeführt werden (von den 96 Kavitäten der Mikrotiterplatte wird pro Test 1 Streifen à 8 Einzelkavitäten benötigt). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Positive control Positivkontrolle	Rot	Gebrauchsfertig	Rot gefärbt	2 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	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 Röhren
- Optional: Sterilfilter
- 100 µl Mikropipette
- Inkubator 35 - 37 °C
- Multikanalpipette oder Mikrotiterplatten-Washer
- 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, Röhren, usw.) aus Laborglas oder Polypropylen zu verwenden, da andere Materialien die Toxine absorbieren können.

- Becherschüttler (Raumtemperatur)
- Kühlzentrifuge (4 °C), 3130 – 10 000 g, Zentrifugenröhren
- 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 Röhren
- 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8,7 g NaCl 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.

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.

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.

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 1,0 ($E_{450/620 \text{ nm}} < 1,0$) für die Positivkontrolle

9. Probenvorbereitung

Die Proben müssen bis zur Extraktion bei $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ 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 (siehe 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
- Die wässrige Phase 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 oder Mixer 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 ± 3 °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 - 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 vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

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 verdünnte und gebrauchsfertige Puffer hat eine Haltbarkeit von einer Woche bei 2 - 8 °C.

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

10.2 Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig für den Erhalt eindeutiger Resultate. Ein 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 µl der vorbereiteten Probe in die Kavitäten A bis G und 100 µl Positivkontrolle in die Kavität H, entsprechend der Beschriftung auf dem Halterahmen, pipettieren. Die Platte abdecken und für 1 h bei 35 - 37 °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 µl Waschpuffer (10.1) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat 1 in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen, die Platte abdecken und für 1 h bei 35 - 37 °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 µl 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 optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET** (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich.

11.1 Qualitätskontrolle des Tests

- Der Extinktionswert der Positivkontrolle sollte gleich oder größer 1,0 sein.
- 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

- 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 ± 10 nm gemessene Extinktion größer oder gleich dem ermittelten Grenzwert ist.

- 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.

11.4 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 - 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 - 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.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-08-09	Freigabeversion
2020-10-15	10.1 Testvorbereitung, 11. Auswertung

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM)



Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

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

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

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

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

RIDASCREEN® 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 quantification.

Sample preparation: Extraction according to a simplified method for preparation of samples (only conditionally applicable, see section 9. "Sample preparation") by homogenization with buffer and sample preparation

Extraction according to the "Official European Preparation Method" (dialysis concentration method, (see section 9.5)

Time requirement: Sample preparation for 10 samples..... approx. 1 h (simplified preparation)

Sample preparation for 10 samples..... approx. 19 h (official method, dialysis overnight)

Test implementation (incubation time) 2 h 45 min

Limit of detection

Simplified preparation: Liquid samples 0.25 ng/ml toxin
Solid samples..... 0.375 ng/g toxin
Supernatants from bacterial cultures..... 0.25 ng/ml toxin

Dialysis concentration: Liquid samples 0.05 ng/ml toxin
Solid samples..... 0.05 ng/g toxin

Further information is contained in the validation report.

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 manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA analyses with them. The manual can be retrieved, printed, and downloaded from www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDASCREEN® SET Total (R4105; 96 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.

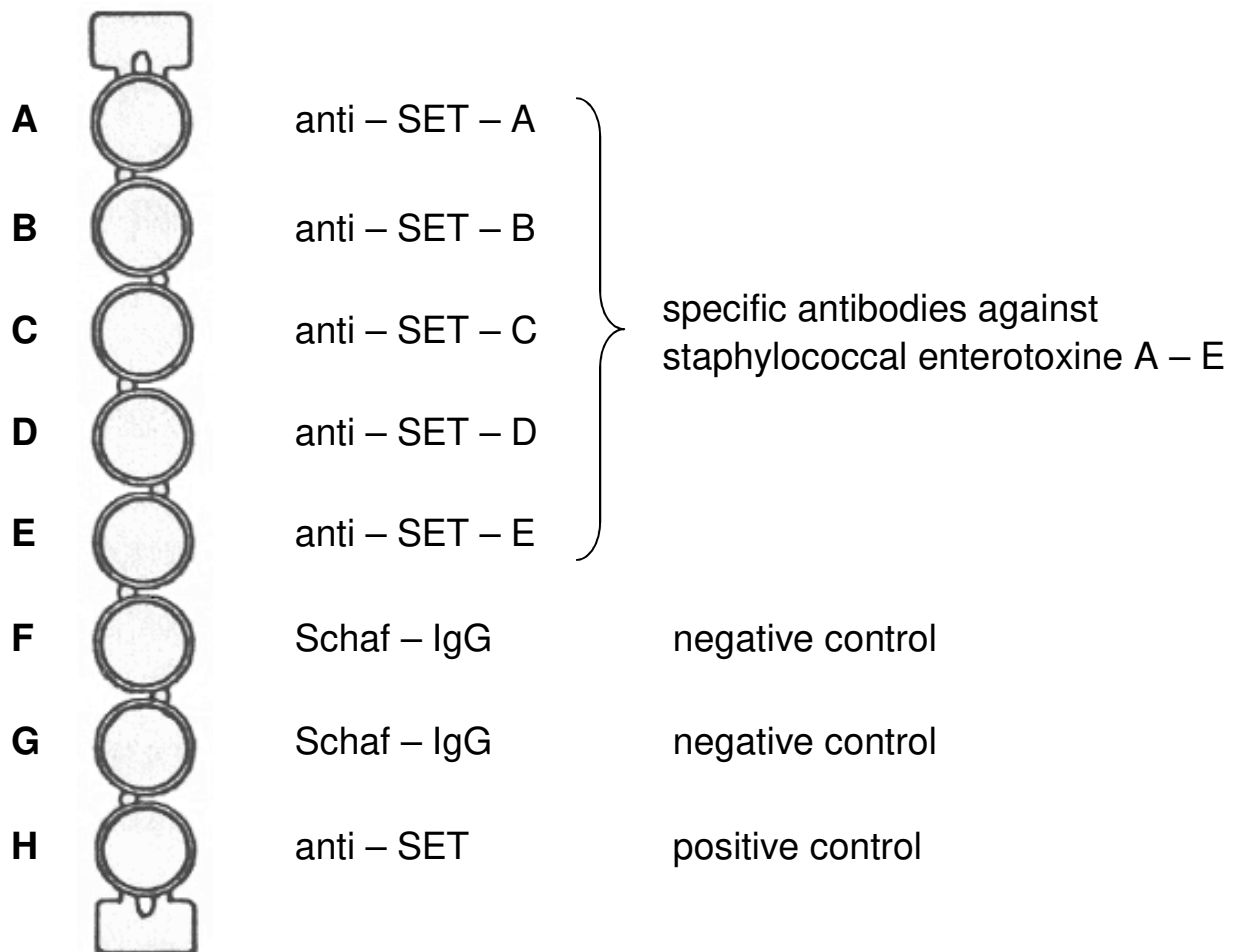
2. General information

Staphylococci belong to the family of micrococci. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus hyicus* produce one or more heat stable proteins that 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 fillings 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:



Microtiter 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 end product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 / 620 ± 10 nm; the absorbance is proportional to the SET concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 12 measurements (from the 96 wells of the microtiter plate one strip of 8 single wells is necessary per single test). Each test kit contains:

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. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Analytical balance and weighing vessels
- Mixer or equivalent for sample homogenization. For food matrices like whey powder and others that are difficult to homogenize, an ultra turrax is highly recommended to obtain an homogeneous sample.
- 50 ml tubes
- Optional: sterile filter
- 100 µl micro pipette
- Incubator 35 - 37 °C (95 - 98.6 °F)
- Multichannel pipette or microwell plate washer
- Microwell plate spectrophotometer (450 / 620 ± 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 (e.g. funnels, beakers, test tubes) of laboratory glass or polypropylene to avoid the absorption of toxins.

- Shaker for beakers (room temperature)
- Refrigerated centrifuge (4 °C), 3130 - 10 000 g, 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
- Laboratory glass trough
- Refrigerator (5 ± 3 °C / 41 ± 5.4 °F) and freezer (≤ -18 °C / ≤ -0.4 °F)
- Vortexer
- Microwell plate spectrophotometer (450 / 620 ± 10 nm)

5.2 Reagents

- PBS buffer, pH 7.4, (0.55 g NaH₂PO₄ x H₂O + 2.85 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 8.7 g NaCl, fill up to 1000 ml with distilled water)
- Distilled 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 be carried out only by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at 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 is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to addition in the wells
- Extinction less than 1.0 ($E_{450/620 \text{ nm}} < 1.0$) for the positive control

9. Sample preparation

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

Important notes: To ensure good precipitation of solids and complete phase separation via centrifugation, increase the centrifugation speed and / or time as needed.

Food proteins may interact with toxins or antibodies of the test kit, in which case they can significantly affect the detection of the toxins. 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 preparation described under 9.1 to 9.3 may not be suitable for extracting SET from difficult matrices (e.g. fish, chocolate, pickled vegetables). For these foods, particularly low recovery rates and / or non-specific bindings of matrix proteins to the test antibodies have been observed.

A list of SET recovery rates determined for a wide range of different food matrices is available on request.

9.1 Simplified preparation 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 refrigerated centrifuge is available, pre-cooling of samples is necessary)
- Thoroughly remove the upper cream layer
- Use 100 µl per well in the assay

9.2 Simplified preparation of pasta and rice (cooked), meat, ice cream, processed foods and other foods with a fat content of less than 40 %

- Grind 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 preparation of foods with a fat content of more than 40 %

- Grind 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 aqueous phase 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)
- Thoroughly remove the upper heptane layer; avoid transferring heptane residues into the wells
- Use 100 µl of the resulting aqueous (lower) phase per well in the assay

9.4 Bacterial cultures

Potentially toxin-forming strains of the species *S. aureus* (as well as *S. hyicus* or *S. intermedius*) have to be pre-cultivated 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 culture.

- Centrifuge supernatants of microbiological fluid cultures for 5 min / at least 3500 g / 10 °C (50 °F)
- Sterile filtration of the supernatant required because unprecipitated or re-suspended cells may disturb 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 outside the linear range (about ≥ 3.0 , please note manufacturer's specifications).

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 distributed in a sample, mix the whole sample if possible, or a representative part of it, with a mixer.

Weigh $25 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ of the homogenized sample and transfer it into a beaker.

Note 1: For cheese with rind, take about 10 % rind and 90 % cheese.

Note 2: For samples in powder form, reconstitute the sample by weighing 12.5 g of sample and 12.5 g of distilled water or follow the manufacturer's instructions (e.g. milk powder as a 10 % solution).

Note 3: In the case of a suspected staphylococcal food poisoning outbreak, a minimal of 12.5 g of food should be tested.

9.5.2 Extraction of enterotoxins

Add 40 ml of warm distilled or deionized water ($38 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ / $100.4 \pm 7.2 \text{ °F}$) to the test portion and homogenize the mixture by using a turrax or a blender. After use, rinse the mixing system with distilled water and add the rinse water to the sample being analyzed.

Note 1: For a liquid sample, do not add 40 ml of distilled water.

Shake the sample at room temperature for at least 30 min to homogeneously distribute the toxins.

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: To prevent denaturation of the enterotoxins during acidification, maintain a **pH between 3.5 and 4.0**. A suitable pH meter must be used for

adjustment. Do not allow pH to fall under 3.0. If the pH drops below 3.0 during acidification, take a fresh 25 g test portion and prepare as described in 9.5.1.

Centrifuge the mixture at least at 3130 x g for 15 min at **4 °C (32.9 °F) or room temperature (20 - 25 °C)**. Transfer the supernatant into a beaker.

Note 3: It is recommended to rinse vessels and devices with distilled water after 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 this is not the case, acidify to a **pH between 3.5 and 4.0** and centrifuge again.

Neutralization step: Neutralize the mixture with NaOH solution in order to obtain a **pH between 7.4 and 7.6**. Centrifuge again as described. Remove as much of the neutralized aqueous phase (supernatant) as possible and continue to use.

Note 6: To prevent denaturation of the enterotoxins during neutralization maintain a **pH between 7.4 and 7.6**. A suitable pH meter must be used for adjustment.

Do not allow pH to rise above 9.0. If the pH rises above 9.0 during neutralization, take a fresh 25 g test portion and prepare as described in 9.5.1.

9.5.3 Extract concentration via dialysis

For each sample:

- Prepare a 30 % (w/v) PEG solution (30 g PEG / 100 ml distilled water)
- Cut about 50 to 60 cm off a dialysis membrane
- Soak the membrane in distilled water per the manufacturer's instructions (at room temperature for 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 neutralized aqueous phase as prepared in 9.5.2 by using a funnel and a small piece of glass wool to keep out resuspended 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 in one hour.

- Lay the filled dialysis membrane in a laboratory glass trough 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, increase the dialysis time as needed. It may be necessary to add more PEG powder to the solution.

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

Remove the concentrated extract using:

- **PBS solution if of extract contains milk or milk products.**
- **Deionized water if extract contains no milk or milk products.**

Rinse the inside of the dialysis membrane well to obtain a final concentrated extract mass between 5.0 g to 5.5 g (maximum 5.8 g for sticky extracts).

When removing the concentrate from the dialysis membrane, it is recommended:

- To rub the insides of the dialysis membrane together in order to loosen the toxins from the membrane walls and to recover the maximum amount of enterotoxins.
- To pour small drops of PBS or deionized water on the inside of the membrane multiple times and rinse repeatedly to recover all enterotoxins present.

Carefully transfer 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), the weight ratio of the weighed test portion to the concentrated extract should be 5:1.

For outbreaks of food poisoning or for special studies, 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 - 17.5 g	3.5 g (3.9 g max.)

Note 4: If the concentrated extract is analyzed within 48 h, store it at $5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($41 \pm 5.4 \text{ }^{\circ}\text{F}$), otherwise store it at $\leq -18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\leq -0.4 \text{ }^{\circ}\text{F}$). The extract should be completely thawed and homogenized before testing.

10. Test procedure

10.1 Preliminary comments

Bring all reagents as well as prepared samples to room temperature ($20 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ / $68 - 77 \text{ }^{\circ}\text{F}$) 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 (e.g. 10 ml buffer concentrate + 90 ml dist. water). Prior to dilution, dissolve any formed crystals by heating the buffer in a water bath at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($98.6 \text{ }^{\circ}\text{F}$). The diluted and ready-to-use buffer has a shelf life of one week at $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($35 - 46 \text{ }^{\circ}\text{F}$).

Unused reagents should be immediately stored at $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow wells to dry between work 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 $100 \text{ }\mu\text{l}$ of a sample to wells A to G of one microtiter strip, add $100 \text{ }\mu\text{l}$ of the positive control to well H. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 1 h at $35 - 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($95 - 98.6 \text{ }^{\circ}\text{F}$).
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. Wash each well with $300 \text{ }\mu\text{l}$ of wash buffer (10.1). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.
4. Pipette $100 \text{ }\mu\text{l}$ of conjugate 1 into each well. Mix gently by shaking the plate manually. Cover the plate and incubate for 1 h at $35 - 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($95 - 98.6 \text{ }^{\circ}\text{F}$).
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. Wash each well with 300 µl of wash buffer (10.1). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.

6. Pipette 100 µl of conjugate 2 into 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. Wash each well with 300 µl of wash buffer (10.1). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step four more times.
8. Pipette 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. Pipette 100 µl of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 / 620 ± 10 nm in a microtiter plate spectrophotometer. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET** (Art. No. Z9996FF), is optionally available for evaluating RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

11.1 Quality control of the test

- The extinction value for the positive control should be equal to or greater than 1.0.
- The mean extinction value for the negative controls should be equal to 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 was allowed for kit components to reach room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- A new pipette tip was used for each sample or control to avoid cross-contamination.
- Check sterility of water for preparing wash buffer (use sterile water for preparation).

- Inadequate washing of wells / fewer washing steps than 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 Result interpretation

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

11.4 Cross-reactivities of antibodies

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

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

Example 1 for **cross-reactivity** 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 cross-reactivity. The sample only contains toxin A.

Example 2 for **no cross-reactivity** 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: **1.9**

Explanation: The main difference between example 1 to example 2 is the extinction 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 cross-reactivity. The sample contains toxin A and toxin E.









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

Version overview

Version number	Chapter and title
2017-08-09	Release version
2020-10-15	10.1 Preliminary comments, 11 Evaluation

Explanation of symbols

- General symbols:

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

Disclaimer

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

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

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

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

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

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

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321