

RIDASCREEN® SET Total

REF R4105

Enzymimmunoassay für den gemeinsamen Nachweis von Staphylokokken Enterotoxinen (A - E) in Lebensmitteln

Enzyme immunoassay for combined detection of staphylococcal enterotoxins (A - E) in foods

Test immuno-enzymatique pour la détection simultanée des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* (A - E) dans les aliments et produits alimentaires

Official European Screening Method

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Stockage à 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 Total (Art. Nr.: R4105) ist ein Enzymimmunoassay zum gemeinsamen Nachweis der Staphylokokken Enterotoxine A, B, C, D und E in flüssigen und festen Lebensmittelproben sowie in Bakterienkulturen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für 96 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 Total 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 A,B,C,D,E (R4101)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® SET Total ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zum gemeinsamen Nachweis der Staphylokokken Enterotoxine (SET) A, B, C, D und E in flüssigen und festen Lebensmitteln sowie in Bakterienkulturen.

2. Allgemeines

Staphylokokken Enterotoxine gehören neben den Salmonellen zu den Hauptverursachern von Lebensmittel-Intoxikationen. Die hitzestabilen Proteine werden hauptsächlich von *Staphylococcus aureus* produziert. Allerdings wurde beschrieben, dass auch die Spezies *Staphylococcus hyicus* und *Staphylococcus intermedius* in der Lage sind Enterotoxine zu bilden.

Generell wird angenommen, dass eine Population von 5×10^5 Zellen enterotoxinbildender *Staphylococcus aureus* 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

RIDASCREEN® SET Total ist ein zuverlässiger Test zum Nachweis der wichtigsten Toxine (A, B, C, D und E) von *S. aureus*. An die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebundene spezifische Antikörper binden selektiv in der Probe vorhandene Enterotoxine. Durch einen Waschschrift werden andere in der Probe vorhandene Substanzen entfernt. Durch Zugabe von markierten Enterotoxin-spezifischen Antikörpern und enzymmarkierten Detektor-Molekülen kommt es zur Ausbildung eines Sandwich-Komplexes (Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex). Nach der Zugabe von Substrat/Chromogen wandelt das gebundene Enzymkonjugat das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Eine ausbleibende Farbreaktion weist auf eine Enterotoxin-freie Probe hin. Die Auswertung erfolgt photometrisch. Nach Zugabe der Stopp-Lösung kann die Extinktion des Farbumschlags von blau nach gelb in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen werden.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 96 Bestimmungen durchgeführt werden (inklusive Positiv- und Negativkontrolle). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Positive control Positivkontrolle	Rot	Gebrauchsfertig	Rot gefärbt	2 ml
Negative control Negativkontrolle	Weiß	Gebrauchsfertig	Ungefärbt	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 Röhrchen
- 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, Röhrchen, usw.) aus Laborglas oder Polypropylen zu verwenden, da andere Materialien die Toxine absorbieren können.

- Becherschüttler (Raumtemperatur)
- Kühlzentrifuge (4 °C), 3130 – 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 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 und eine Extinktion größer oder gleich 0,2 ($E_{450/620 \text{ nm}} \geq 0,2$) für die Negativkontrolle

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: Bei OD-Werten außerhalb des linearen Bereiches des Messgeräts (etwa 3,0; bitte Herstellerangaben beachten) sollte der zentrifugierte und sterilfiltrierte Kulturüberstand mit PBS weiter verdünnt und erneut getestet werden.

Die zellfreien Kulturüberstände können bei -20 °C gelagert werden. Aufgetaute Kulturüberstände unverzüglich mit RIDASCREEN® SET Total untersuchen und nicht wieder einfrieren.

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 ± 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 ($20 - 25\text{ °C}$) 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 $2 - 8\text{ °C}$.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei $2 - 8\text{ °C}$ 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 Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für die Kontrollen und alle Proben benötigt werden. Die Positionen der Kontrollen und Proben protokollieren.
2. Jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ der vorbereiteten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Dabei jeweils eine neue Pipettenspitze verwenden. 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 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. 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 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 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 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 und für 15 min bei 35 - 37 °C im Dunkeln inkubieren.
9. Ein Farbumschlag von rot nach blau deutet auf Staphylokokken Enterotoxine hin. Die Farbentwicklung beginnt meist am Rand der Kavitäten - leichtes Klopfen an den Rand der Mikrotiterplatte verteilt die Farbe gleichmäßig.
10. Je 100 µl Stopp-Lösung in die Kavitäten pipettieren. Ein Farbumschlag von blau nach gelb deutet auf Staphylokokken Enterotoxine hin.
11. Instrumentelle Auswertung: Die Extinktion wird im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 / 620 nm gemessen.

11. Auswertung

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

11.1 Qualitätskontrolle des Tests

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

Der Cut-off-Wert zur Bewertung von Messwerten als NEGATIV oder POSITIV wird gebildet aus der OD der Negativkontrolle plus 0,15 OD-Einheiten:

Cut-off = Extinktionswert der Negativkontrolle + 0,15

- Eine Probe wird als POSITIV bewertet, wenn der Test als gültig (11.1) beurteilt wurde und die Extinktion der Probe größer oder gleich dem ermittelten Cut-off-Wert ist.
- Eine Probe wird als NEGATIV bewertet, wenn der Test als gültig (11.1) beurteilt wurde und die Extinktion der Probe kleiner als der ermittelte Cut-off-Wert ist.

11.3 Identifizierung der Enterotoxine

Bei positiven Ergebnissen des RIDASCREEN® SET Total können die einzelnen Toxine mit dem RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (R4101) identifiziert werden. Eine Sterilfiltration kann bei einigen Proben notwendig sein.









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, 11.1 Qualitätskontrolle des Tests

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 Total

Brief information

RIDASCREEN® SET Total (Art. No.: R4105) is an enzyme immunoassay for combined detection of Staphylococcus aureus 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 96 determinations. A microtiter plate spectrophotometer is required for determination.

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 Total 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 A,B,C,D,E (R4101)

1. Intended use

RIDASCREEN® SET Total is a sandwich enzyme immunoassay for the combined detection of Staphylococcus enterotoxins (SET) A, B, C, D and E in fluid and solid foods as well as in bacterial cultures.

2. General information

Besides Salmonella, *Staphylococcus aureus* enterotoxins are the main causative agents of food poisoning. Among the strains of *Staphylococcus aureus*, other Staphylococci species as *S. hyicus* and *S. intermedius* are able to produce one or more heat stable proteins that behave like enterotoxins.

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 showed that only 100 - 200 ng of Staphylococcus 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 groups A, B, C, D and E are very significant.

3. Test principle

RIDASCREEN® SET Total is a reliable test for the detection of the most important toxins (A, B, C, D and E) of *S. aureus*. The surface of the microtiter plate is coated with specific antibodies that selectively bind the enterotoxins contained in the sample. Sample components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Adding marked enterotoxin-specific antibodies as well as enzyme-marked detector molecules forms a sandwich complex (antibody-antigen-antibody-complex). After substrate/chromogen is added, the bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue end product. This color change points to the presence of enterotoxins in the samples. The results can be read photometrically. After addition of the stop solution, which leads to a color change from blue to yellow, the measurement can be made in a microtiter plate spectrophotometer.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for max. 96 measurements (including positive and negative control). 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
Negative control	White	Ready to use	Colorless	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 micropipette
- 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: 132650, Spectrum)
- Closures, sealing width = 35 mm (e.g., Spectra / Por[®], ref: 132736, 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 as well as an extinction greater than or equal to 0.2 ($E_{450/620 \text{ nm}} \geq 0.2$) for the negative control

9. Sample preparation

The samples have to be stored at $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ($41 \pm 5.4 \text{ }^\circ\text{F}$) 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 / $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ($50 \text{ }^\circ\text{F}$)
(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: If measured OD values are outside the linear range (about 3.0, please note manufacturer's specifications), the filtrated culture supernatant should be further diluted with PBS buffer and analyzed again.

The cell-free culture supernatant may be stored at -20 °C (-4 °F). Thawed culture supernatants should be analyzed immediately with RIDASCREEN® SET Total and not refrozen.

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 g ± 0.1 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 °C ± 2 °C / 100.4 ± 7.2 °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 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 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F), otherwise store it at ≤ -18 °C (≤ -0.4 °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 °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 (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 °C (98.6 °F). The diluted and ready-to-use buffer has a shelf life of one week at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Unused reagents should be immediately stored at 2 - 8 °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 a sufficient number of wells into the microwell holder for the controls and all samples. Record control and sample positions.
2. Transfer 100 µl of the controls and samples into separate wells; use a new pipette tip for each control or sample. Cover the plate and incubate for 60 minutes 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. Wash each well with 300 µl of wash buffer (10.1). Repeat the washing step four more times.

4. Pipette 100 µl of conjugate 1 into each well. Ensure that the wells are completely empty before proceeding with this step. Cover the plate and incubate for 60 minutes at 35 - 37 °C (95 - 98.6 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the micro well 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). Repeat the washing step four more times.
6. Pipette 100 µl of conjugate 2 into each well. Ensure that the wells are completely empty before proceeding with this step. Incubate for 30 minutes at 35 - 37 °C (95 - 98.6 °F).
7. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the micro well 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). Repeat the washing step four more times.
8. Pipette 100 µl of substrate/chromogen into each well. Ensure that the wells are completely empty before proceeding with this step. Incubate for 15 min at 35 - 37 °C (95 - 98.6 °F) in the dark.
9. A color change from red to blue indicates the presence of Staphylococcus enterotoxins in the samples. Color development tends to concentrate along the edge of the wells. Tap the microtiter plate gently to distribute the color evenly before reading.
10. Pipette 100 µl of stop solution into each well. A color change from blue to yellow indicates the presence of Staphylococcus enterotoxins in the samples.
11. Measure the extinction at 450 / 620 nm in a microtiter plate spectrophotometer.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food&Feed** (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 extinction value for the negative controls should be equal to or less than 0.2.

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 Result interpretation

The cut-off value for evaluation of results as NEGATIVE or POSITIVE is calculated by adding 0.15 to the OD value of the negative control:

Cut-off-value = extinction value of negative control + 0.15

- A sample is considered POSITIVE if the test is valid (11.1) and the extinction of the sample is greater than or equal to the cut-off value.
- A sample is considered NEGATIVE if the test is valid (11.1) and the extinction of the sample is less than the cut-off value.

11.3 Identification of enterotoxins

If samples are considered positive with the RIDASCREEN® SET Total, the single toxins can be identified by using RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (R4101). Sterile filtration of samples may be necessary in some cases.









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, 11.1 Quality control of the test

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

RIDASCREEN® SET Total

Avant-propos

RIDASCREEN® SET Total (n° d'art. R4105) est un kit de test immuno-enzymatique pour la détection des entérotoxines A, B, C, D, E de *Staphylococcus aureus* dans les produits alimentaires liquides et solides et dans les cultures bactériennes.

Tous les réactifs nécessaires pour l'analyse sont inclus dans le kit. Le kit permet de réaliser 96 déterminations. Un spectrophotomètre à plaque de microtitration est nécessaire pour la quantification.

Préparation des échantillons :

Extraction des échantillons selon une méthode simplifiée (applicable partiellement – voir point 9 : Préparation des échantillons) par homogénéisation avec un tampon.

Extraction selon la méthode officielle de préparation Européenne (Concentration par dialyse/ voir point 9.5)

Temps nécessaire :

Préparation pour 10 échantillons env. 1 h
(Méthode simplifiée)

Préparation pour 10 échantillons.....env. 19 h
(Méthode officielle par dialyse)

Réalisation du test (temps d'incubation) 2 h 45 min

Limite de détection

Méthode simplifiée :

Echantillons liquides..... 0,25 ng/ml toxine
Echantillons solides..... 0,375 ng/g toxine
Surnageants cultures bactériennes 0,25 ng/ml toxine

Concentration p. dialyse :

Echantillons liquides..... 0,05 ng/ml toxine
Echantillons solides..... 0,05 ng/g toxine

De plus amples informations sont contenues dans le rapport de validation.

La spécificité du test RIDASCREEN® SET Total a été déterminée en analysant les réactions croisées avec les substances ad-hoc préparées dans un tampon. Dans les échantillons, la spécificité peut différer de celle mesurée dans un tampon, à cause d'un effet matrice. Avant l'analyse d'une substance montrant une réaction croisée, l'utilisateur doit déterminer la limite de détection et le recouvrement dans la matrice échantillon respective. Le test ne peut pas différencier entre l'analyte et la substance ayant une réaction croisée.

Afin d'améliorer la qualité des résultats lors de la réalisation de tests ELISA, nous suivons aussi notre manuel de bonnes pratiques. Ce manuel donne les standards minima à observer pour l'utilisation des kits R-Biopharm AG et la réalisation des tests ELISA. Ce manuel peut être trouvé, imprimé ou téléchargé sur notre site www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Produits associés

RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R4101)

1. Application

RIDASCREEN® SET Total est un kit de test immuno-enzymatique au format sandwich pour la détection simultanée des entérotoxines A, B, C, D, E de *Staphylococcus aureus* dans les produits alimentaires liquides et solides et dans les cultures bactériennes.

2. Généralités

Les agents principaux d'intoxications alimentaires sont les entérotoxines de Staphylocoques au même titre que le sont les Salmonelles. Les *Staphylococcus aureus*, les *Staphylococcus hyicus* et les *Staphylococcus intermedius* produisent en particulier une ou plusieurs protéines thermostables qui se comportent comme des entérotoxines.

D'une façon générale, il est considéré que la production d'entérotoxine d'une population de 5×10^5 cellules de *Staphylococcus aureus* par gramme de produit alimentaire est requise pour provoquer une intoxication. Cependant, d'autres études montrent que seulement 100 - 200 ng d'entérotoxines de Staphylocoques peuvent entraîner les symptômes d'une intoxication alimentaire.

Les intoxications SET ont été fréquemment associées aux pâtes, produits transformés à base de viande, au jambon, aux tartes, aux produits à base de viande de poulet, au poisson, aux produits de la pêche, au lait, aux laitages, à la glace, aux produits à base d'œufs, aux salades, aux pâtisseries et aux fourrages de gâteaux ainsi que dans les préparations à base de ces produits alimentaires. Les entérotoxines des groupes sérologiques A, B, C, D, E sont les plus fréquemment rencontrées.

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® SET Total est un test fiable pour la détection des toxines principales de (A, B, C, D et E) *S. aureus*. La surface de la plaque de microtitration est sensibilisée avec des anticorps spécifiques qui peuvent capturer les entérotoxines présentes dans l'échantillon.

Les composants de l'échantillon qui ne se sont pas capturés par les anticorps sont éliminés au moment du lavage de la microplaque. En ajoutant des anticorps marqués par une enzyme spécifique, on obtient un complexe sandwich (anticorps-antigène-anticorps-complexe).

Après l'ajout du substrat/chromogène, le conjugué va s'accrocher et la présence d'entérotoxines est révélée par la dégradation du substrat sous l'action de l'enzyme du conjugué, qui se traduit par une coloration bleue. Les résultats peuvent être lus visuellement, ou par un photomètre. Après addition de la solution d'arrêt (la coloration passe du bleu au jaune) les résultats peuvent être lus à l'aide d'un spectrophotomètre à plaque de microtitration.

4. Contenu du paquet

Chaque kit contient suffisamment de matériel pour un maximum de 96 mesures (y compris le contrôle positif et négatif). Chaque kit de test contient :

Composant	Couleur du capuchon	Format		Volume
Plaque de microtitration	-	Prêt à l'emploi		96 puits
Contrôle positif	Rouge	Prêt à l'emploi	Colorée en rouge	2 ml
Contrôle négatif	Blanc	Prêt à l'emploi	Incolore	2 ml
Tampon de lavage	Marron	Concentré	10 x	100 ml
Conjugué 1	Rouge	Prêt à l'emploi	Colorée en vert	11 ml
Conjugué 2	Noir	Prêt à l'emploi	Colorée en bleu	11 ml
Substrat/chromogène Red Chromogen Pro	Marron	Prêt à l'emploi	Colorée en rouge	13 ml
Solution d'arrêt	Jaune	Prêt à l'emploi		14 ml

5. Réactifs requis, mais non fournis

5.1 Équipement

- Balance analytique et récipients de pesage
- Mélangeur ou équivalent (pour l'homogénéisation des échantillons)
- Tubes 50 ml
- Cartouche de filtre stérile (en option)
- Micropipette 100 µl
- Incubateur à 35 - 37 °C
- Laveur de microplaque ou multi pipette
- Lecteur de microplaque pour lecture à 450 / 620 ± 10 nm

Équipement additionnel pour la préparation des échantillons selon la Méthode officielle de screening européenne (MOSE), version 5, septembre 2010 :

Remarque générale : Il est strictement recommandé d'utiliser des récipients de laboratoire en verre ou en polypropylène (entonnoirs, béchers, tubes à essai) pour éviter l'absorption de toxines.

- Agitateur pour bécher (travail à T° ambiante)
- Centrifugeuse, 3 130 à 10 000 g, capable de réfrigérer à 4 °C, tubes à centrifuger
- Membrane de dialyse, MWCO : 6 – 8 kD, largeur : 23 ± 2 mm (Spectra / Por[®]1, réf : 132650, Spectrum)
- Fermetures : largeur = 35 mm (e.g. Spectra / Por[®], réf : 132736, Spectrum)
- pH-mètre
- Tubes 50 ml
- Entonnoir
- Tampon de laine de verre
- Bac de laboratoire en verre
- Réfrigérateur (5 °C ± 3 °C) et freezer (≤ -18 °C)
- Vortexeur
- Lecteur de microplaque (450 / 620 nm ± 10 nm)

5.2 Réactifs :

- Tampon PBS, pH 7,4 (0,55g NaH₂PO₄ x H₂O, 2,85 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O + 8,7 g NaCl, à compléter avec de l'eau distillée pour obtenir 1000 ml)
- Eau distillée (en option : eau stérile)
- n-heptane (pour échantillons à haute teneur en matières grasses)
- Bouillon cœur-cerveau (Brain-Heart-Infusion – BHI) pour le pré-enrichissement de souches de Staphylocoque produisant potentiellement des toxines. Demander à votre producteur / distributeur local de milieux de culture pour l'approvisionnement en BHI.

Réactifs additionnels pour MOSE :

- Acide chlorhydrique (5N et 1N)
- Hydroxyde de sodium (5N et 1N)
- Polyéthylène glycol 20 000 (PEG), qualité de synthèse

6. Mesures de précaution

Ce test doit être réalisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié. Il est impératif de suivre strictement les instructions d'utilisation.

Ce coffret peut contenir des substances dangereuses pour la santé. Pour avoir les informations sur les dangers des substances présentes, merci de consulter les fiches de sécurité appropriées (SDS), disponibles sur www.r-biopharm.com.

Veiller à l'élimination correcte et responsable de tous les réactifs et matériaux après leur utilisation. Pour l'élimination, veuillez respecter les réglementations nationales.

7. Instructions de conservation des réactifs

Le kit doit être conservé entre 2 - 8 °C. Ne pas congeler les composants du kit.

Remettre les puits non utilisés dans leur sachet d'origine contenant le dessicant, le refermer et le conserver entre 2 - 8 °C.

Le substrat/chromogène rouge est photosensible : il doit être conservé à l'abri de la lumière.

N'utilisez pas le kit de test après la date d'expiration (voir l'étiquette du kit de test).

N'échangez pas les réactifs individuels entre des kits de numéros de lot différents.

8. Signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

- Toute coloration bleue de la solution substrat/chromogène rouge avant l'ajout dans les puits
- Une valeur de DO inférieure à 1,0 ($E_{450/620 \text{ nm}} < 1,0$) pour le contrôle positif et une valeur de DO supérieure ou égale à 0,2 ($E_{450/620 \text{ nm}} \geq 0,2$) pour le contrôle négatif

9. Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être conservés à $5 \pm 3 \text{ °C}$ ($41 \pm 5,4 \text{ °F}$) jusqu'à leur extraction. Les échantillons doivent être complètement décongelés avant l'étape d'extraction.

Remarques importantes : Pour une bonne précipitation des particules solides et pour une séparation complète des phases liquides et solides pendant la centrifugation, il est nécessaire, dans certains cas, d'augmenter la vitesse et/ou le temps de centrifugation.

Les protéines alimentaires peuvent interagir avec les toxines ou les anticorps du kit. Dans ce cas, elles vont fortement modifier le résultat du test. Pour cette raison, il est fortement recommandé de préparer les échantillons difficiles selon la « *Méthode officielle de screening européenne du Laboratoire européen de référence pour les staphylocoques à coagulase positive* » (voir 9.5).

La méthode simplifiée pour la préparation des échantillons décrite en points 9.1 à 9.3 n'est pas forcément adaptée à l'extraction des SET dans des matrices difficiles (ex : poisson, chocolat, légumes au vinaigre). Pour ces aliments, on a observé des taux de récupération particulièrement faibles et/ou des liaisons non spécifiques des protéines de la matrice aux anticorps testés

Une liste de taux de récupération pour les SET obtenus sur différentes matrices alimentaires est disponible sur demande.

9.1 Méthode simplifiée pour le lait

- Centrifuger les échantillons de lait (10 - 25 ml), notamment les échantillons de lait cru, au froid selon les conditions suivantes : 10 min / 3 500 g / 10 °C (s'il n'est pas possible de centrifuger, il est nécessaire de pré-refroidir les échantillons)
- Retirer la couche de crème en l'éliminant au maximum
- Utiliser 100 µl par puits

9.2 Méthode simplifiée pour pâtes et riz (cuit), viande, glaces, aliments transformés et autres aliments contenant moins de 40 % de matières grasses

- Hacher 10 - 25 g de l'échantillon et homogénéiser avec 1,5 ml de tampon PBS (pH 7,4) par g d'échantillon (ex: 10 g d'échantillon + 15 ml de tampon)
- Agiter pendant 15 minutes
- Centrifuger : 10 minutes / 3 500 g / 10 °C
- Si nécessaire enlever la couche de gras
- Utiliser 100 µl par puits

9.3 Méthode simplifiée pour les aliments contenant plus de 40 % de matières grasses

- Hacher 10 - 25 g de l'échantillon et homogénéiser avec 1,5 ml de tampon PBS (pH 7,4) par g d'échantillon (ex : 10 g d'échantillon + 15 ml de tampon)
- Agiter pendant 15 minutes
- Centrifuger : 10 minutes / 3 500 g / 10 °C
- Transférer la phase aqueuse dans un autre flacon de centrifugation, ajouter le même volume de n-heptane et bien mélanger pendant 5 minutes.
- Centrifuger : 5 minutes / 3 500 g / 10 °C
- Retirer au maximum la couche supérieure d'heptane. Eviter de transférer des résidus d'heptane dans les puits.
- Utiliser 100µl du résidu liquide (phase inférieure) par puits

9.4 Cultures bactériennes

Les souches de l'espèce *S. aureus* (tel que *S. hyicus* ou *S. intermedius*) qui peuvent potentiellement produire des toxines doivent être pré-enrichies dans un bouillon BHI (Brain-Heart-Infusion) pour assurer la production optimale d'entérotoxines.

Note importante : Avant l'analyse, s'assurer que les souches devant être testées sont présentes en culture pure.

- Centrifuger les surnageants des cultures bactériennes liquides pendant 5 minutes / un minimum de 3 500 g / 10 °C (50 °F)
- Il est fortement recommandé de filtrer stérilement le surnageant, car des cellules non-précipitées ou remises en suspension peuvent influencer la réaction du test
- Utiliser 100 µl du filtrat par puits

Remarque : Si les densités optiques mesurées sont en dehors du domaine de linéarité (env. 3,0 ; se référer à la notice), les surnageants de culture filtrés doivent être dilués avec du tampon PBS et être de nouveaux analysés.

Les surnageants ne contenant plus de cellules peuvent être stockés à -20 °C (-4 °F). Les surnageants décongelés doivent être analysés le plus vite possible avec le test RIDASCREEN® SET Total et ne doivent pas être recongelés.

9.5 Préparation des échantillons selon la méthode officielle de screening européenne (MOSE), version 5, septembre 2010

9.5.1 Etapes préparatoires avant l'extraction de la toxine

Comme les entérotoxines staphylococciques peuvent être distribuées de façon hétérogène dans l'échantillon, avec une table de mixage mélanger l'échantillon entier, si possible, ou une partie représentative de celui-ci.

Peser 25 g ± 0,1 g de l'échantillon homogénéisé et transférer cette préparation dans un bécher.

Remarque 1 : Dans le cas de fromage à croûte, prendre environ 10 % de la croûte pour 90 % de fromage.

Remarque 2 : Dans le cas d'échantillons en poudre, reconstituer l'échantillon en pesant 12,5 g d'échantillon et 12,5 g d'eau distillée et suivre les instructions du fabricant (ex : poudre de lait en forme de solution à 10 %).

Remarque 3 : Dans le cas d'une suspicion d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la taille minimale de l'échantillon à analyser pour effectuer l'analyse est égale à 12,5 g.

9.5.2 Extraction des entérotoxines

Ajouter 40 ml d'eau tiède distillée ou désionisée ($38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) à la préparation et homogénéiser le mélange en utilisant un mixeur. Après utilisation, rincer le système de mélange avec de l'eau distillée et ajouter l'eau de rinçage à l'échantillon à analyser.

Remarque 1 : Dans le cas de produit liquide, ne pas ajouter 40 ml d'eau distillée.

Afin de permettre la diffusion de la toxine, secouer l'échantillon à température ambiante pendant au moins 30 minutes.

Étape de l'acidification : Acidifier le mélange avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique pour obtenir un **pH compris entre 3,5 et 4,0**.

Remarque 2 : Pour éviter la dénaturation des entérotoxines lors de l'acidification, maintenir un **pH entre 3,5 et 4,0**. Un pH-mètre approprié doit être utilisé pour l'ajustement.

Ne pas laisser le pH descendre en dessous de 3,0. Si le pH descend en dessous de 3,0 pendant l'acidification, préparer une nouvelle portion d'essai de 25 g comme décrit au paragraphe 9.5.1.

Centrifuger le mélange au moins à $3\ 130 \times g$ pendant 15 minutes à 4 °C ou à température ambiante. Transférer le surnageant dans un bécher.

Remarque 3 : N'hésitez pas à rincer à l'eau distillée à chaque étape pour récupérer un maximum de toxines.

Remarque 4 : Si le liquide surnageant n'est pas suffisamment clair, centrifuger à nouveau comme décrit ci-dessus.

Remarque 5 : Le pH du surnageant après la première centrifugation doit être $< 4,5$. Si ce n'est pas le cas, acidifier jusqu'à l'obtention d'un **pH compris entre 3,5 et 4,0** et centrifuger à nouveau.

Étape de neutralisation : Neutraliser le mélange à l'aide d'une solution de NaOH afin d'obtenir un **pH compris entre 7,4 et 7,6**. Centrifuger à nouveau comme décrit ci-dessus. Enlever autant de la phase aqueuse neutralisée (surnageant) que possible.

Remarque 6 : Pour éviter la dénaturation des entérotoxines lors de la neutralisation, maintenir un **pH entre 7,4 et 7,6**. Un pH-mètre approprié doit être utilisé pour l'ajustement.

Ne pas laisser le pH dépasser 9,0. Si le pH dépasse 9,0 pendant la neutralisation, préparer une nouvelle portion d'essai de 25 g comme décrit dans le paragraphe 9.5.1.

9.5.3 Concentration de l'extrait par dialyse

Pour chaque échantillon :

- Préparer 30 % (p/v) de solution PEG (30 g PEG / 100 mL d'eau distillée).
- Couper une membrane de dialyse d'environ 50 à 60 cm.
- Faire tremper la membrane dans de l'eau distillée en suivant les instructions du fabricant (à température ambiante pendant au moins 30 minutes).
- Rincer la membrane avec de l'eau distillée (intérieur et extérieur).
- Verrouiller une extrémité de la membrane avec une fermeture, remplissez-la avec la phase aqueuse neutralisée établie dans le paragraphe 9.5.2 à l'aide d'un entonnoir et d'un petit morceau de laine de verre pour éliminer les particules en resuspension. Verrouiller l'autre extrémité de la membrane à l'aide d'une deuxième fermeture.

Remarque 1 : Si l'échantillon à analyser est très salé ou très sucré, mener une dialyse sous agitation avec 2 L d'eau distillée, deux fois pendant une heure.

- Fixer la membrane de dialyse remplie dans un bac contenant les 30 % (p/v) de solution PEG. Laisser les extraits se concentrer toute la nuit à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Remarque 2 : Si l'extrait n'est pas assez concentré, prolonger la dialyse ou ajouter du PEG en forme solide.

- Retirer la membrane de dialyse de la solution PEG et rincer la partie externe de la membrane avec de l'eau distillée pour enlever toute trace de PEG.

Récupérer l'extrait concentré à l'aide :

- De la solution PBS, dans le cas où l'extrait contient du lait ou des produits laitiers.
- D'eau désionisée, dans le cas où l'extrait ne contient aucun lait ni produit laitier.

Bien rincer la partie interne de la membrane de dialyse pour obtenir une masse de l'extrait concentré final allant de 5,0 à 5,5 g (maximum de 5,8 g pour les extraits collants).

Au cours de cette étape, il est recommandé :

- Frotter les parties internes de la membrane de dialyse (l'une contre l'autre avec la partie intérieure) afin de décoller et de récupérer la quantité maximale d'entérotoxines.
- Verser de petites gouttes de PBS ou d'eau désionisée (plusieurs ajouts) et de rincer à plusieurs reprises l'intérieur de la membrane afin de récupérer toutes les entérotoxines présentes.

Transvaser avec soin l'extrait concentré dans un flacon de verre.

Remarque 3 : Si le poids initial de l'échantillon à tester est inférieur à 25 g (9.5.1, note 3), veiller à obtenir un ratio final égal à 5:1 entre le poids de l'extrait concentré et le poids de l'échantillon à analyser.

Dans le cas de TIAC ou pour des études spéciales, la masse de l'échantillon peut être différente de 25g. Le ratio entre la masse d'échantillon et l'extrait concentré est présenté dans le tableau ci-dessous :

Masse de la préparation	Extrait concentré
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.)

Remarque 4 : Si l'extrait concentré est analysée sous 48 h, stockez-le à 5 °C \pm 3 °C), sinon conserver à \leq -18 °C. L'extrait doit être complètement décongelé et homogénéisé avant le test.

10. Réalisation du test

10.1 Conseils préliminaires

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation (20 - 25 °C).

Le **tampon de lavage** est fourni sous une forme concentrée 10 fois. Avant utilisation le tampon doit être dilué 1:10 (1+9) avec de l'eau distillée (soit 10 ml de tampon concentré + 90 ml d'eau distillée). Avant de diluer, dissoudre les cristaux qui peuvent se former en incubant le tampon dans un bain d'eau à 37 °C. Le tampon dilué et prêt à l'emploi a une durée de conservation d'une semaine entre 2 et 8 °C

Les réactifs non utilisés doivent être immédiatement stockés à 2 - 8 °C.

10.2 Réalisation du test

Suivre attentivement la procédure de lavage recommandée pour obtenir des résultats non équivoques. Eviter de sécher les puits entre chaque étape du lavage.

1. Constituer la plaque avec le nombre de puits nécessaires pour tous les échantillons et les contrôles. Enregistrer les positions des contrôles et des échantillons.
2. Transférer 100µl des contrôles et des échantillons dans des puits individuels ; utiliser un cône de pipette neuf pour chaque contrôle ou échantillon. Recouvrir les puits et incuber 60 minutes à 35 - 37 °C.
3. Eliminer les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 300 µl de tampon de lavage (voir 10.1). Vider les puits de nouveau selon le même protocole. Répéter l'opération quatre fois.
4. Ajouter 100µl du conjugué 1 dans chaque puits. Assurez-vous que les puits soient complètement vides avant de réaliser cette étape. Recouvrir les puits et incuber 60 minutes à 35 - 37 °C.
5. Eliminer les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide des puits. Remplir les puits avec 300 µl de tampon de lavage (voir 10.1). Vider les puits de nouveau selon le même protocole. Répéter l'opération quatre fois.
6. Ajouter 100µl du conjugué 2 dans chaque puits. Assurez-vous que les puits soient complètement vides avant de réaliser cette étape. Recouvrir les puits et incuber 30 minutes à 35 - 37 °C.
7. Eliminer les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement contre du papier absorbant (3 fois) pour retirer tout le liquide

- des puits. Remplir les puits avec 300 µl de tampon de lavage (voir 10.1). Vider les puits de nouveau selon le même protocole. Répéter l'opération quatre fois.
8. Ajouter 100µl du substrat/chromogène dans chaque puits. Assurez-vous que les puits soient complètement vides avant de réaliser cette étape. Incuber 15 minutes à 35 - 37 °C dans l'obscurité.
 9. Un changement de couleur du rouge au bleu indique la présence d'entérotoxines de Staphylocoques dans les échantillons.
 10. Ajouter 100µl de la solution d'arrêt dans chaque puits. Un changement de couleur du bleu au jaune indique la présence d'entérotoxines de Staphylocoques dans les échantillons.
 11. Mesurer la densité optique à 450 / 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à plaque de microtitration.

11. Évaluation

Un logiciel spécial, le **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed** (n° d'art. Z9996FF), est disponible en option pour l'évaluation des tests immuno-enzymatiques RIDASCREEN®.

11.1 Contrôle qualité du test

- Le contrôle positif doit avoir une densité optique égale ou supérieure à 1,0.
- Le contrôle négatif doit avoir une densité optique égale ou inférieure à 0,2.

Si ces critères n'ont pas été remplis, les étapes suivantes doivent être vérifiées et corrigées avant de refaire le test :

- Vérifier la date de péremption du kit.
- S'assurer que les composants du kit ont le temps d'atteindre la température ambiante (20 - 25 °C).
- Un cône de pipette neuf doit être utilisé pour chaque échantillon pour éviter tout risque de contamination croisée.
- Vérifier la stérilité de l'eau pour la préparation du tampon de lavage (utiliser de l'eau stérile pour la préparation).
- Les puits n'ont pas été lavés de façon adéquate/il y a eu moins d'étapes de lavage que recommandé (10.2).
- Contamination de la pipette (nettoyer les pipettes régulièrement).

11.2 Interprétation des résultats

La valeur seuil pour l'évaluation des résultats en tant que NEGATIF ou POSITIF est calculée en ajoutant 0,15 à la valeur de la densité optique du contrôle négatif.

Valeur seuil = valeur de la densité optique du contrôle négatif + 0,15

- Un échantillon est considéré comme POSITIF lorsque le test est validé (11.1) et que la DO de l'échantillon est supérieure ou égale à la valeur seuil.
- Un échantillon est considéré comme NEGATIF lorsque le test est validé (11.1) et que la DO de l'échantillon est inférieure à la valeur seuil.

11.3 Identification des entérotoxines

Si des échantillons sont contrôlés positifs avec le RIDASCREEN® SET Total, les toxines seules peuvent être identifiées grâce à l'utilisation du RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R4101). Une filtration stérile des échantillons peut s'avérer nécessaire dans certains cas.

Pour de plus amples informations sur les produits et les applications, veuillez contacter votre distributeur local ou R-Biopharm à cette adresse : sales@r-biopharm.de.

Aperçu des versions

Numéro de version	Chapitre et titre
2017-08-09	Version de sortie
2020-10-15	10.1 Conseils préliminaires, 11 Évaluation, 11.1 Contrôle qualité du test

Signification des symboles

- Symboles généraux :



Suivez le mode d'emploi



Numéro de lot



Date d'expiration (AAAA-MM)



Température de stockage



Numéro d'article



Nombre de déterminations de tests



Date de fabrication (AAAA-MM)



Fabricant + adresse

Exclusion de responsabilité

L'utilisateur assume seul le risque lié à l'utilisation des produits et services de R-Biopharm AG. R-Biopharm AG garantit que ses produits et services répondent à toutes les normes de contrôle de la qualité fixées par R-Biopharm AG, et R-Biopharm AG remplacera ou réparera, à sa discrétion, tout composant, produit ou service récurrent qui s'avère défectueux en termes de fabrication ou de matériau pendant les périodes de garantie ou avant les dates d'expiration spécifiques au produit et qui, après avoir été testé par R-Biopharm AG, s'avère défectueux selon l'appréciation de R-Biopharm AG.

Cette garantie remplace toutes les autres garanties, concernant la qualité, la description, l'adéquation à un usage particulier, la qualité marchande, la productivité ou toute autre spécification. R-Biopharm AG n'est en aucun cas responsable d'une quelconque utilisation de ses produits et décline par la présente tout autre recours explicite ou implicite, garantie ou responsabilité, découlant de la législation ou autre. Elle n'assume également aucune responsabilité pour des pertes de profits ou des dommages, directs, indirects ou autres, à des personnes ou des biens, en rapport avec l'utilisation de ses produits ou services.

Cette garantie ne peut être étendue, modifiée ou remplacée que par un document écrit, signé par un représentant autorisé de R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Adresse postale :

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Allemagne

Sitz / Siège social : 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 /

Président du conseil de surveillance :

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Conseil d'administration :

Christian Dreher (Vorsitzender / Président),

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

Handelsregister / Registre du commerce :

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321