

RIDASCREEN[®] Risk Material

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Risikomaterial (ZNS)
in prozessierten Fleisch- und Wurstwaren

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
risk material (CNS)
in processed meat and sausages

Art. No.: R6701

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Risk Material (Art. Nr.: R6701) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Risikomaterial (ZNS) in prozessierten (erhitzten) Fleisch- und Wurstwaren.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Für die Durchführung des Tests ist keine spezielle über die eines Laboranten / Technikers hinausgehende Ausbildung erforderlich. Falls gewünscht, wird jedoch auf Anfrage eine kostenlose Einarbeitung angeboten.

Probenvorbereitung: homogenisieren, extrahieren,
zentrifugieren und verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 1 h
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h

Nachweisgrenze: $\leq 0,2$ % für ZNS-Gewebe
in prozessierten (erhitzten) Fleisch- und Wurstwaren

Spezifität: Mit dem RIDASCREEN® Risk Material-Test wird
ZNS-Gewebe von Rind, Kalb, Schaf, Ziege, Pferd,
Geflügel und Schwein nachgewiesen.
Eine Aussage über die Gewebeart (Hirn, Rückenmark
oder Auge) ist nicht möglich.

Hinweis: Für die Untersuchung von rohen Fleisch- und
Wurstwaren sowie von kontaminierten Oberflächen ist
ein RIDASCREEN® Risk Material 10/5-Test unter der
Art. Nr.: R6703 erhältlich.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Risk Material-Test ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Risikomaterial (ZNS) in prozessierten (erhitzten) Fleisch- und Wurstwaren.

2. Einleitung

BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) wurde 1986 zuerst in Großbritannien diagnostiziert. Der Infektionsmechanismus ist bisher nicht genau geklärt, aber es ist unbestritten, dass das krankhaft veränderte Prion Protein (PrPsc) eine große Rolle bei der Übertragung und Entwicklung dieser Gehirnerkrankung spielt.

Das Verfüttern von unzureichend erhitztem Tiermehl führte zu einer Ausbreitung dieser Erkrankung, infolge derer bis Ende 2000 über 180.000 Tiere getötet wurden. Durch die Applikation von infektiösem Gehirnmaterial konnte eine Infektion bei verschiedenen Tierarten induziert werden. Ähnliche Krankheitsbilder werden bei Schafen, Ziegen, Katzen und anderen Säugetieren beschrieben. Mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit wird die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) durch die Aufnahme von infektiösem Fleisch und Fleischprodukten ausgelöst. Die Mortalität dieser Erkrankung, an der bis Mai 2002 in Großbritannien 111 Menschen verstorben sind, beträgt 100 %. Als Schutzmaßnahme wurden das Verfüttern von Tiermehl (2000/766/EG) und das Verarbeiten von spezifischem Risikomaterial in Lebensmitteln (2000/418/EG) / (2001/999/EG) von der EU verboten.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Nachweis von Risikomaterial erfolgt über die Bestimmung von saurem Gliafaserprotein (GFAP), einem zellulären Marker, der in besonders hoher Konzentration im ZNS vorkommt. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen GFAP beschichtet. Im Falle des Vorhandenseins von ZNS-Gewebe bindet darin enthaltenes Protein an den Fänger-Antikörper. Mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen GFAP (Enzymkonjugat) wird gebundenes Antigen nachgewiesen. Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat-/ Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist proportional zur Risikomaterial-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (incl. Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit Antikörpern gegen GFAP
- 4 x Standards (je 1,3 ml)
GFAP in wässriger Lösung
entsprechend 0 % (Nullstandard), 0,2 %, 1,0 %, 2,0 % Risikomaterial in
einer Probe
gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (6 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen GFAP
gebrauchsfertig
- 1 x Substrat/Chromogenlösung (10 ml).....brauner Verschluss
rötlich gefärbt, enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Probenpuffer (10 ml) weißer Verschluss
als 10fach Konzentrat
enthält 0,5 % SDS
- 1 x Extraktionspuffer (100 ml)
als 10fach Konzentrat
enthält 10 % SDS
- 1 x Waschpuffer (Salz)
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers, pH 7,4
enthält 0,05 % Tween 20

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + Zentrifugengläser
- Mixer, Mörser oder Pürierstab
- Wasserbad (100 °C)
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

Der Extraktions- und der Probenpuffer enthalten SDS. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der rötlich gefärbten Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Standard 4 (2,0 %)

9. Probenvorbereitung

9.1. Fleisch- und Wurstproben

Bitte beachten:

Die Probenaufbereitung spielt eine wesentliche Rolle für die GFAP-Freisetzung und sollte daher besonders sorgfältig durchgeführt werden!

- Probe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 2 g Homogenat in ein Zentrifugenglas einwiegen, mit 10 ml verdünntem Extraktionspuffer (siehe 10.1.) versetzen und durch kräftiges Schütteln (Vortex) suspendieren
- 15 min bei 100 °C aufkochen
- Proben abkühlen und zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
- die obere Fettschicht vollständig entfernen (absaugen, z.B. mit einer Pasteurpipette)
- den fettfreien Überstand 1:20 (1+19) mit verdünntem Probenpuffer (siehe 10.1.) verdünnen (z.B. 50 µl Überstand + 950 µl verdünnter Puffer)
- pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

Lagerung der Proben:

Die in Probenpuffer verdünnten Extraktionsüberstände können bei 2 - 8 °C ca. 8 Wochen gelagert werden. Vor Einsatz im Test sollten die Proben auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht und noch einmal kurz aufgeschüttelt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Der **Extraktionspuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss deshalb vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle vorher durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C lösen. Wir empfehlen, den Extraktionspuffer in einem Schritt zu verdünnen (d.h. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml destilliertes Wasser).

Der verdünnte Extraktionspuffer kann bis zum angegebenen Verfallsdatum auf dem Pufferetikett aufbewahrt werden. Um ein erneutes Auskristallisieren zu vermeiden, kann der Extraktionspuffer auch bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden.

Der **Probenpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss deshalb vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle vorher durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C lösen. Wir empfehlen, den Probenpuffer in einem Schritt zu verdünnen (d.h. 10 ml Pufferkonzentrat + 90 ml destilliertes Wasser).

Der verdünnte Probenpuffer kann bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Pufferetikett aufbewahrt werden.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ca. 4 - 6 Wochen ist bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl des Konjugates (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Substrat-/Chromogenlösung (brauner Verschluss) in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Die Farbintensität der ausgewählten Standards dient als Referenz.

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich. Die Daten werden automatisch vom Photometer übernommen und mittels linearer Regression ausgewertet.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Graphische Auswertung:

Die Extinktionswerte für die Standards werden in einem Koordinatensystem auf Millimeterpapier gegen die Risikomaterial-Gehalt [%] aufgetragen. Eine Eichgerade wird durch die Messpunkte für die Standards gelegt, und die Risikomaterial-Konzentration in % kann dann entsprechend der Extinktion für jede Probe aus der Eichkurve abgelesen werden.

Anmerkung

Die Nachweisgrenze des RIDASCREEN® Risk Material-Tests ist $\leq 0,2$ % für ZNS-Gewebe in prozessierten (erhitzten) Lebensmitteln (Brüh- und Kochwürsten). Die Bestimmungsgrenze des RIDASCREEN® Risk Material-Tests ist $\leq 0,4$ % für ZNS-Gewebe in prozessierten (erhitzten) Lebensmitteln (Brüh- und Kochwürsten). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass der Gehalt an Markerproteinen in verschiedenen Geweben von Risikomaterial (Hirn, Rückenmark, Auge) unterschiedlich hoch ist und Rückenmarksgewebe in geringeren Konzentrationen zu einem positiven Ergebnis führen kann.

Proben aus Rohware können aufgrund nicht denaturierter Markerproteine ebenfalls in geringeren Mengen zu einem positiven Ergebnis führen

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®] Risk Material

Brief information

RIDASCREEN[®] Risk Material (Art. No.: R6701) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of risk material (CNS) in processed (heated) meat and sausages.

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

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Technicians need no specialized training to perform the RIDASCREEN[®] Risk Material test, however, free support is offered from the distributor on request, if necessary.

Sample preparation:	homogenization, extraction, centrifugation and dilution
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)approx. 1 h test implementation (incubation time)1 h
Limit of detection:	≤ 0.2 % for CNS tissue in processed (heated) meat and sausages
Specificity:	The RIDASCREEN [®] Risk material assay allows the detection of CNS tissue from cattle, veal, sheep, goat, horse, poultry and pig. A specification of the kind of tissue (brain, spinal cord or eye) is not possible.
Note:	For the determination of risk material (CNS) in raw meat, meat products and on contaminated surfaces we refer to the RIDASCREEN [®] Risk Material 10/5 test with Art. No.: R6703.

1. Intended use

RIDASCREEN® Risk Material is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of risk material (CNS) in processed (heated) meat and sausages.

2. General

BSE (bovine spongiform encephalopathy) has been diagnosed first in Great Britain in 1986. The molecular mechanisms of infection are still unresolved, but it is clear, that the Prion protein (prP^{Sc}) plays a major role in the transmission and development of the brain disease. Feeding of insufficient heated animal meal is likely to be the main cause of the spread of disease, which has caused more than 180000 dead cows up to the end of 2000. Application of extracts from infected brain induced infection in different animal species. Similar diseases are now described in cows, sheep, goat, cat and many other mammals. With a high presumption, the new variant of the human Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) is caused by infected beef and beef products. The mortality of this disease is 100 %, with 111 deaths in Great Britain up to May 2002. As a protective measurement, animal meal / protein as animal feed is no longer allowed (2000/766/EG) and potential risk material has been banned from food production by the EU (2000/418/EG) / (2001/999/EG).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The detection of risk material occurs by the determination of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), a cellular marker, which can be found very high concentrated in CNS tissue. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against GFAP. If the sample is contaminated with CNS tissue, the contained glial fibrillary acidic proteins will bind to the specific capture antibodies. The bound GFAP is detected by an antibody peroxidase-conjugate directed against GFAP (enzyme conjugate). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/ chromogen is added to the wells, bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the risk material concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate (12 strips with 8 removable wells each)
coated with antibodies against GFAP
- 4 x Standard solutions (1.3 ml each)
GFAP in aqueous solution
corresponding to 0 % (zero standard), 0.2 %, 1.0 %, 2.0 % risk material (CNS)
in a sample
ready to use
- 1 x Conjugate (6 ml).....red cap
peroxidase conjugated antibody against GFAP
ready to use
- 1 x Substrate/chromogen solution (10 ml)..... brown cap
stained red, contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Sample dilution buffer (10 ml)..... white cap
as a 10fold concentrate
contains 0.5 % SDS
- 1 x Extraction buffer (100 ml)
as a 10fold concentrate
contains 10 % SDS
- 1 x Washing buffer (salt)
for preparation of a 10 mM Phosphate Buffer, pH 7.4
contains 0.05 % Tween 20

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal glass vials
- mixer, mortar or homogenizer
- water bath 100 °C (212 °F)
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

6. Warnings and precautions for the users

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

The extraction and the sample dilution buffer contain SDS. Avoid contact of the reagent with eyes, skin and clothes.

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

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 4 (2.0 %)

9. Preparation of Samples

9.1. Meat and meat products

Please note:

The preparation of samples plays an essential role for the release of GFAP and should therefore be done very carefully!

- grind and homogenize the sample, e.g. with a mixer
- mix 2 g of the homogenized sample with 10 ml diluted extraction buffer (see 10.1.) in a centrifugal glass vial and shake vigorously for suspending (vortex)
- heat the sample for 15 min at 100 °C (212 °F)
- chill down the sample and centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- remove the upper fat layer completely (draw off, e.g. by using a pasteur pipette)

- dilute the fat free supernatant 1:20 (1+19) with diluted sample dilution buffer (see 10.1.), e.g. 50 µl of supernatant + 950 µl of diluted buffer
- use 50 µl per well in the assay

Storage of samples:

Diluted in sample dilution buffer the extracted supernatants can be stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for approx. 8 weeks. Bring samples to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) and mix shortly before use.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The **extraction buffer** is provided as a 10fold concentrate. Therefore the buffer concentrate has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water before use. Dissolve eventually occurring crystals in a water bath at 37 °C (98 °F) before dilution. We recommend dilution of the buffer concentrate in only one step (i.e. 100 ml concentrate + 900 ml dist. water).

The diluted buffer can be used up to the expiry date printed on the buffer label. To avoid new crystallization, the buffer can be stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

The **sample dilution buffer** is provided as a 10fold concentrate. Therefore the buffer concentrate has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water before use. Dissolve eventually occurring crystals in a water bath at 37 °C (98 °F) before dilution. We recommend dilution of the buffer concentrate in only one step (i.e. 10 ml concentrate + 90 ml dist. water).

The diluted buffer can be used up to the expiry date printed on the buffer label if stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

A PBS-Tween buffer is needed as **washing buffer**, please use the washing buffer salt (pouch) contained in the kit (see 4.). Dissolve the total content of the pouch in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard solution or prepared sample to separate wells.
3. Add 50 µl of enzyme conjugate (red cap) to the bottom of each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen solution (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C, 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µl of stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

The color obtained for the standards serves as the reference value.

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The software allows automated data retrieval from the reader and result calculation by linear regression.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Graphic evaluation:

The absorbance values of the standards are entered in a system of coordinates on graph paper against the risk material contents [%]. The values of the standards are connected with a line and the risk material concentration in % depending on the absorbance of each sample can be read from the calibration curve.

Remark:

The limit of detection of the RIDASCREEN® Risk Material kit is ≤ 0.2 % for CNS tissue in processed (heated) meat and sausages. The limit of quantification of the RIDASCREEN® Risk Material kit is ≤ 0.4 % for CNS tissue in processed (heated) meat and sausages. When results are interpreted it has to be considered, that the contents of marker proteins in different risk materials (brain, spinal cord, eye) may vary. Therefore, cord will give positive results even in lower concentrations.

Because of native marker proteins, samples containing raw meat also may be detected positive in lower concentrations.

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.