



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

Official European Screening Method

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

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

R-Biopharm AG switchboard

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department

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

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® SET 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 maximal 96 Bestimmungen. Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

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

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

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

Probenvorbereitung für 10 Probenca. 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (Art. Nr. 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 (inklusive Positiv- und Negativkontrolle) durchgeführt werden. Jedes 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: 132650, Spectrum)
- Verschlüsse, Verschlussweite = 35 mm (z. B. Spectra / Por[®], Ref: 132736, Spectrum)
- pH-Meter
- 50 ml Röhrchen
- Trichter
- Glaswolle
- Laborglaswanne
- Kühlschrank (5 ± 3 °C) und Gefrierschrank (≤ -18 °C)
- Vortexer
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 / 620 ± 10 nm)

5.2 Reagenzien

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

Zusätzliche Reagenzien zur Durchführung der offiziellen europäischen Screeningmethode, Version 5, September 2010:

- 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 unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

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 oder gleich 1,0 ($E_{450/620 \text{ nm}} \leq 1,0$) 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 ± 3 °C gelagert werden. Gefrorene Proben sollten bis Extraktionsbeginn komplett aufgetaut sein.

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

Da Lebensmittelproteine mit Toxinen oder den im Test enthaltenen Antikörpern interagieren und so den Nachweis unter Umständen empfindlich stören können, wird dringend empfohlen, die Aufarbeitung von Lebensmittelproben nach der *„Offiziellen Europäischen Screeningmethode des Europäischen Referenzlabores für Koagulase-positive Staphylokokken“* durchzuführen (siehe Kapitel 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 Lebensmittel-matrices 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 / 10 °C
- 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 Standard EN ISO 19020

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 $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ aufkonzentrieren lassen.

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

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

Entnahme des konzentrierten Extrakts unter Verwendung von:

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

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

Bei der Entnahme des Konzentrates aus der Dialysemembran wird empfohlen:

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

Den konzentrierten Extrakt vorsichtig in ein Glasgefäß überführen.

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

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

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

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

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

Alle Reagenzien sowie die aufgearbeiteten Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

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

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

10.2 Testdurchführung

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für die Kontrollen und alle Proben benötigt werden. Die Positionen der Kontrollen und Proben protokollieren.
2. Jeweils 100 µl 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 °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 µl Waschpuffer (10.1) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat 1 in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren. Die Platte abdecken und für 1 h bei 35 - 37 °C inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 300 µl Waschpuffer (10.1) waschen. Diesen Waschvorgang noch viermal wiederholen.
6. Je 100 µl Konjugat 2 in die vollständig entleerten Kavitäten pipettieren 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. Die Messung sollte bis 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung erfolgen.

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 größer 1,0 sein.
- Der Extinktionswert der Negativkontrollen sollte kleiner 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 Kapitel 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-Wert = Extinktionswert der Negativkontrolle + 0,15

- Eine Probe wird als POSITIV bewertet, wenn der Test als gültig (siehe Kapitel 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 (siehe Kapitel 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 (Art. Nr. 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
2022-10-18	8 Anzeichen für Reagenzienverfall 10.2 Testdurchführung 11.1 Qualitätskontrolle des Tests
2026-05-26	Aktuelle Version 9.5 Probenvorbereitung aktualisiert Haftungsausschluss aktualisiert

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

1. Grundsätzlich leistet R-Biopharm für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs gemäß Incoterm, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte oder vereinbarte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für
 - a) Folgen aus der Versäumnis die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
 - b) Nutzungen oder Abarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck entsprechen oder nicht mit der Produktsicherheit vereinbar sind;
 - c) den Einsatz von ungeschultem oder unqualifiziertem Personal;
 - d) fehlender Anwendung von Industriestandards und -Praktiken (z.B. Good Laboratory Practices);
 - e) der Versäumnis für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen;
 - f) sonstige fehlerhafte Benutzung;
 - g) Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte;
 - h) unsachgemäße Lagerung oder Transport durch den Kunden oder Dritte;
 - i) Folgen aus chemischen, elektromagnetischen, mechanischen oder elektrolytischen Einflüssen außerhalb der Nutzung gemäß Dokumentation;
 - j) Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).
3. Sachmängelgewährleistung beschränkt sich auf Nacherfüllung. Wenn die R-Biopharm AG den Sachmangel zu vertreten hat, wird nach eigenem Ermessen Ersatz geliefert, nachgebessert oder eine Gutschrift ausgestellt. Insbesondere wenn eine Reparatur unwirtschaftlich ist, darf die Ware vernichtet werden. Ersatz erfolgt nach Produktcode, Anspruch auf Ersatz aus der gleichen Lot besteht nicht. Nur wenn Ersatzlieferung, Nachbesserung oder Gutschrift unmöglich, unverhältnismäßig oder zweimal fehlgeschlagen sind, kann der Kunde den Kaufpreis mindern. Weitergehende Gewährleistungsrechte wegen eines Sachmangels sind ausgeschlossen, es sei denn, es liegt Vorsatz oder grobe Fahrlässigkeit der R-Biopharm AG vor oder ein anderer gesetzlich zwingender Fall.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG ist beschränkt auf Vorsatz, grobe Fahrlässigkeit, Schäden aus der Verletzung von Leben, Körper oder Gesundheit, im Falle des Verzuges, soweit ein fixierter Liefertermin vereinbart wurde, Haftung bei Übernahme einer Garantie für die Beschaffenheit oder Vorhandensein eines bestimmten Leistungserfolges, Haftung bei Übernahme eines Beschaffungsrisikos sowie auf gesetzlich zwingende Haftungstatbestände, insbesondere dem Produkthaftungsgesetz und Arglist. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichten ist ausgeschlossen.



5. ALLE ANDEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILLSCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEEN JEDLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE DURCH GEWOHNHEITEN, PRAXIS, DEN GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDERWEITIG STILLSCHWEIGEND VORAUSGESETZT WERDEN. Insbesondere übernimmt die R-Biopharm AG keine Haftung für Folgeschäden wie z.B. entgangenen Gewinn., Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.
6. Vorstehende Haftungsregelungen gelten auch für die Haftung der gesetzlichen Vertreter, Angestellte und Erfüllungsgehilfen der R-Biopharm AG.

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 a maximum of 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 chapter 9. "Sample preparation") by homogenization with buffer and sample preparation

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

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

Sample preparation for 10 samplesapprox. 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 of 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 brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related products

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (Art. No. 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 a maximum of 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	10x	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 a 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 the European official screening method (EOSM) Version 5, September 2010:

- Hydrochloric acid (5N and 1N)
- Sodium hydroxide (5N and 1N)
- Polyethylene glycol 20000 (PEG), quality for synthesis

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

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

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

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 or equal to 1.0 ($E_{450/620 \text{ nm}} \leq 1.0$) 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 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F) until extraction. The samples should be completely thawed before the extraction step.

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

Food proteins may interact with toxins or antibodies of the test kit, in which case they can significantly affect the detection of the toxins. Therefore it is strongly recommended to prepare food samples according to the “*Official European Screening Method of the European Reference Laboratory for Coagulase-positive Staphylococci*” (see chapter 9.5).

The simplified methods for sample preparation described under chapter 9.1 to 9.3 may not be suitable for extracting SET from difficult matrices (e.g. fish, chocolate, pickled vegetables). For these foods, particularly low recovery rates and / or non-specific bindings of matrix proteins to the test antibodies have been observed.

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

9.1 Simplified preparation of milk

- Centrifuge milk samples (10 - 25 mL), especially raw milk samples, in cool condition: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
(if no refrigerated centrifuge is available, pre-cooling of samples is necessary)
- Thoroughly remove the upper cream layer
- Use 100 µL per well in the assay

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

- Grind 10 - 25 g of the sample and homogenize with 1.5 mL of PBS buffer (pH 7.4) per g sample (e.g. 10 g sample + 15 mL buffer)
- Shake for 15 min

- Centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- If necessary, remove upper fat layer
- Use 100 µL per well in the assay

9.3 Simplified preparation of foods with a fat content of more than 40 %

- Grind 10 - 25 g of the sample and homogenize with 1.5 mL of PBS buffer (pH 7.4) per g sample (e.g. 10 g sample + 15 ml buffer)
- Shake for 15 min
- Centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- Transfer aqueous phase to another centrifugal vial, add the same volume of n-heptane and mix thoroughly for 5 min
- Centrifuge: 5 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
- Thoroughly remove the upper heptane layer, avoid transferring heptane residues into the wells
- Use 100 µL of the resulting aqueous (lower) phase per well in the assay

9.4 Bacterial cultures

Potentially toxin-forming strains of the species *S. aureus* (as well as *S. hyicus* or *S. intermedius*) have to be pre-cultivated in brain heart infusion (BHI) to ensure optimal formation of enterotoxins.

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

- Centrifuge supernatants of microbiological fluid cultures for 5 min / at least 3500 g / 10 °C (50 °F)
- Sterile filtration of the supernatant required because unprecipitated or re-suspended cells may disturb the test reaction
- Use 100 µL of the filtrate per well in the assay

Remark: 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 Standard EN ISO 19020

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 \pm 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 ± 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 chapter 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 / 68 - 77 °F)**. 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 chapter 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 $5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($41 \pm 5.4 \text{ }^{\circ}\text{F}$), otherwise store it at $\leq -18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\leq -0.4 \text{ }^{\circ}\text{F}$). The extract should be completely thawed and homogenized before testing.

10. Test procedure

10.1 Preliminary comments

Bring all reagents as well as prepared samples to room temperature ($20 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ / $68 - 77 \text{ }^{\circ}\text{F}$) before use.

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1 + 9) with distilled water (e.g. 10 mL buffer concentrate + 90 mL dist. water). Prior to dilution, dissolve any formed crystals by heating the buffer in a water bath at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($98.6 \text{ }^{\circ}\text{F}$). The diluted and ready-to-use buffer has a shelf life of one week at $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($35 - 46 \text{ }^{\circ}\text{F}$).

Unused reagents should be immediately stored at $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($35 - 46 \text{ }^{\circ}\text{F}$).

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 $35 - 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($95 - 98.6 \text{ }^{\circ}\text{F}$).
3. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Wash each well with 300 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. The Measurement should be done up to 10 minutes after adding the stop solution.

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 greater than 1.0.
- The extinction value for the negative controls should be 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 chapter 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 (see chapter 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 (see chapter 11.1) and the extinction of the sample is less than the cut-off value-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 (Art. No. 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
2022-10-18	8 Indication of instability of reagents 10.2 Test procedure 11.1 Quality control of the test
2026-05-21	Current version 9.5 Sample preparation updated Disclaimer updated

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

1. R-Biopharm AG provides a limited statutory warranty (“Gewährleistung”) as mandated and pursuant to German law against defects in title and material. For products with a defined shelf life, the warranty applies for the stated shelf life. For use cycle limited products, it applies until the stated cycle limit is reached, but not beyond the general warranty period. For all other products, the general warranty period is twelve (12) months from the date the risk transfers.
Such warranty is subject to timely notice of the alleged defect, giving sufficient detail to assess the claim. A product’s defectiveness is assessed based on the specifically agreed quality, its suitability for the contractually stated purpose, and whether all agreed-upon accessories, documentation, and instructions were provided.
2. R-Biopharm AG is not liable for issues arising from:
 - a) The failure to read, understand, or follow product instructions and information for use or safety
 - b) The use of unqualified personnel
 - c) The failure to follow industry standards such as Good Laboratory Practices
 - d) The use of unsuitable controls, sample matrices, or procedures
 - e) Other misuse
 - f) unilateral product modifications
 - g) Improper storage by others
 - h) External chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences that exceed the defined parameters.
 - i) Harm caused by external events beyond R-Biopharm's control, including but not limited to burglary, theft, lightning, fire, water, or acts of nature.
3. R-Biopharm AG’s liability is limited to foreseeable, contract-typical losses in case of negligent breaches of obligations that are essential to achieving the agreement’s purpose and that the other party could reasonably rely on (material contract obligations). R Biopharm AG is not liable for losses resulting from non-material contract obligations.
4. ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTEES OF ANY KIND, EXPRESS OR IMPLIED, ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, COURSE OF DEALINGS BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. R-Biopharm AG assumes no liability for consequential damages, in particular loss of profit, interruptions, or other indirect damages.
5. The foregoing is not intended to limit liability to the extent such liability cannot be excluded or limited under applicable German law or convention, including cases of intend, willful misconduct, or gross negligence, personal injury or death, express warranties or assumptions of procurement risks, strict liability, or other non-waivable legal mandates.
6. The foregoing liability provisions apply equally to R-Biopharm AG, its directors, officers, employees, and agents.

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),

Jochen Hirsch, Ute Salzbrenner,

Dr. Hans Frickel, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321