RIDASCREEN® SET Total

Art. Nr.: R4106

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-Mail : info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® SET Total (Art. Nr.: R4106) 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.
Ein Kit ist ausreichend für 48 Bestimmungen.

Probenvorbereitung:	Extraktion nach vereinfachter Aufarbeitungsmethode (nur bedingt anwendbar, s. Punkt 9. „Proben-aufarbeitung“) durch Homogenisieren mit Puffer und Zentrifugieren
	Extraktion nach der „Offiziellen Europäischen Aufarbeitungsmethode“ (Dialysekonzentrationsmethode, s. Punkt 9.5.)
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung für 10 Proben.....ca. 1 h (einfache Aufarbeitung)
	Probenvorbereitung für 10 Proben.....ca. 19 h (offizielle Methode, Dialyse ü. N.)
	Testdurchführung (Inkubationszeit).....2 h 45 min
Nachweisgrenzen:	
Einfache Aufarbeitung:	flüssige 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

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

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

Produktangebot
RIDASCREEN®SET Total (R4105; 96 Bestimmungen)
RIDASCREEN® SET 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 Waschschritt 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 kann visuell oder photometrisch erfolgen. Nach Zugabe der Stopp-Lösung kann die Extinktion des Farbumschlags von blau nach gelb in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen werden.

4. Packungsinhalt

Jeder Testkit enthält alle Reagenzien für 48 Tests (inklusive Positiv- und Negativkontrolle).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Positive control Positivkontrolle	rot	gebrauchsfertig	rot gefärbt	1 ml
Negative control Negativkontrolle	weiß	gebrauchsfertig	ungefärbt	1 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10 x	100 ml
Conjugate 1 Konjugat 1	rot	gebrauchsfertig	grün gefärbt	6 ml
Conjugate 2 Konjugat 2	schwarz	gebrauchsfertig	blau gefärbt	6 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
- optional: Mikrotiterplatten-Photometer (450/620 ± 10 nm)

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

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

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

5.2. Reagenzien:

- PBS-Puffer, pH 7,4 (0,55 g NaH_2PO_4 x H_2O + 2,85 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 8,7 g NaCl ad 1000 ml dest. Wasser)
- destilliertes Wasser (optional: steriles Wasser)
- n-Heptan (für Proben mit hohem Fettgehalt)
- Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion = BHI) für die Voranreicherung potentiell toxinbildender Staphylokokkenstämme. BHI kann beispielsweise über Sifin, Berlin (TN 1216), Heipha, Eppelheim (3110r), Oxoid, Wesel (CM 225) oder andere Nährmedienhersteller bezogen werden.

Zusätzliche Reagenzien zur Durchführung der offiziellen europäischen Screeningmethode:

- Salzsäure (5N und 1N)

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

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

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

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

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

Der Test kann bei ordnungsgemäßer Lagerung mindestens bis zum Verfallsdatum (angegeben auf der Kitpackung) für eine ordnungsgemäße Analyse eingesetzt werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten.
- Extinktion kleiner 1,0 ($E_{450/620nm} < 1,0$) für die Positivkontrolle und eine Extinktion größer oder gleich 0,2 ($E_{450/620nm} \geq 0,2$) für die Negativkontrolle.

9. Probenvorbereitung

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

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

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

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

Eine Liste verschiedener SET-Wiederfindungsraten, die für eine breite Palette verschiedener 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
- den Überstand in ein anderes Zentrifugenröhrchen überführen, mit der gleichen Menge n-Heptan versetzten 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.

<u>Wichtiger Hinweis:</u> **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 °C ± 2 °C) zur abgewogenen Testportion hinzufügen. Gemisch mit einem Turrax, Mixer oder Labormischer homogenisieren. Mixersystem nach der Benutzung mit destilliertem Wasser spülen und das Spülwasser der zu analysierenden Probe hinzufügen.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9.5.3. Konzentration des Extrakts mittels Dialyse

Benötigt pro Einzelprobe:

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

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

- die 30% (w/v) PEG-Lösung in eine Laborglaswanne geben und die befüllten Dialysemembran hineinlegen. Den Probenextrakt über Nacht bei 5 °C ± 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 bis 17,5 g	3,5 g (3,9 g max.)

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

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist wichtig für den Erhalt eindeutiger Resultate. 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, anschließend sofort auswerten.
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 die speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

11.1. Qualitätskontrolle zur Gültigkeit des Tests

Visuell:

Positivkontrolle: blau (gelb nach Zugabe der Stopp-Lösung).

Negativkontrolle: farblos oder sehr schwach blau (farblos oder sehr schwach gelb nach Zugabe der Stopp-Lösung).

Eine Auswertung sollte nur erfolgen, wenn beide Bedingungen erfüllt sind.

Photometrisch:

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

Der Extinktionswert der Negativkontrolle 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 Waschschritte (siehe 10.2.)
- kontaminierte Pipetten (regelmäßig reinigen)

11.2. Interpretation der Ergebnisse

Visuell:

1. Eine Probe wird als POSITIV bewertet, wenn die Negativkontrolle farblos oder nur sehr schwach blau gefärbt ist und die Probe deutlich intensiver gefärbt ist. Eine positive Probe kann weniger stark gefärbt sein als die Positivkontrolle.

2. Eine Probe wird als NEGATIV bewertet, wenn die Negativkontrolle farblos oder nur sehr schwach blau gefärbt ist und die Probe weniger oder gleich gefärbt ist wie die Negativkontrolle.

Photometrisch:

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

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

12. 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.

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

RIDASCREEN® SET Total

Brief information

RIDASCREEN® SET Total (Art. No.: R4106) 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 48 determinations.

Sample preparation:	extraction according to a simplified method for working up of samples (partly applicable, s. point 9. „Sample preparation“) by homogenization with buffer and sample preparation
	extraction according to the „Official European Preparation Method“ (dialysis concentration method, s. point 9.5.)
Time requirement:	sample preparation for 10 samples.....ca. 1 h (simplified working up)
	sample preparation for 10 samples.....ca. 19 h (official method, dialysis overnight)
	test implementation (incubation time).....2 h 45 min
Limits of detection:	
Simplified working up	liquid samples ..... 0.25 ng/ml Toxin solid 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

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

Related products
RIDASCREEN®SET Total (R4105; 96 determinations)
RIDASCREEN® SET 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

The main causative agent of food poisoning are enterotoxins of *Staphylococcus aureus* next to the intoxication with Salmonella. 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 which behave like enterotoxins.
Generally, it is assumed that a population of 5 x 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 stuffing 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 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 which can bind the enterotoxines contained in a sample. Sample components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. By adding specific antibodies against the toxins as well as enzyme marked detector molecules the sandwich complex will be formed (antibody-antigen-antibody-complex). After adding enzyme substrate/chromogen to the wells the bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. This color change points to the presence of enterotoxins in the samples. The results can be read visually or photometrically. After addition of the stop solution which leads to a color change from blue to yellow the measurement can be made in a micro titer plate photometer.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including positive and negative control).

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	ready-to-use		48 wells
Positive control	red	ready-to-use	red stained	1 ml
Negative control	white	ready-to-use	colorless	1 ml
Wash buffer	brown	Concentrate	10 x	100 ml
Conjugate 1	red	ready-to-use	green stained	6 ml
Conjugate 2	black	ready-to-use	blue stained	6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready-to-use	red stained	13 ml
Stop Solution	yellow	ready-to-use		14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- analytical balance and weighing vessels
- Blender, Mixer or equivalent (for sample homogenization). For whey powder and all type of food difficult to mix, a turrax is highly recommended in order to have a homogeneous sample.

– 50 ml tubes
– optional: sterile filter cartridges
– 100 µl micro pipette
– Incubator 35 - 37 °C
– Multi channel pipette or microwell plate washer
– optional: microwell plate spectrophotometer (450/620 nm)

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

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

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

5.2. Reagents:

– PBS buffer, pH 7.4, (0.55 g NaH_2PO_4 x H_2O + 2.85 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 8.7 g NaCl, fill up to 1000 ml with distilled water)
– Distilled or osmosed water (optional: sterile water)
– n-heptane (for samples with high fat content)
– Brain-Heart-Infusion (BHI) for the pre-enrichment of potentially toxin forming Staphylococci strains. Ask your local producer/distributor of culture media for the supply with BHI

Additional reagents for EOSM:

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

6. Warnings and precautions for the users

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

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

7. Storage instructions

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

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

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

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

The test kit can be regularly used at least up to the expiry date (indicated on the kit package), if stored correctly.

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the substrate/chromogen solution prior to test implementation.
- a value of less than 1.0 absorbance units ($A_{450/620nm} < 1.0$) for the positive control as well as an absorbance of more or equal to 0,2 ($A_{450/620nm} \geq 0,2$) for the negative control.

9. Preparation of Samples

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

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

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

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

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

9.1. Simplified working up of milk

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

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

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

– centrifuge: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
– if necessary, remove upper fat layer
– use 100 µl per well in the assay

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

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

9.4. Bacterial cultures

Strains of the specie *S. aureus* (as well as *S. hyicus* or *S. intermedius*) which may have the potential to form toxins must be pre-enriched in Brain-Heart-Infusion (BHI) to ensure optimal formation of enterotoxins.

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

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

Remark: If measured OD-values are out of range of linearity (about 3.0, please consider manufactures' instructions) the filtrated culture supernatant should be further diluted with PBS buffer and analysed again.

The cell free culture supernatant may be stored at -20 °C (-4°F). Thawed culture supernatants should be analysed as soon as possible with RIDASCREEN® SET Total and not be frozen again.

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

9.5.1. Preparatory steps before toxin extraction

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

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

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

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

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

9.5.2. Extraction step

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9.5.3. Dialysis-concentration step

For each sample:

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

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

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

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

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

Recover the concentrated extract using:

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

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

During this step, it is recommended:

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

Transfer carefully the concentrated extract into a glass vial.

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

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

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

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

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

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

10.2. Test procedure

Thoroughly washing is important for the receipt of clear results. Avoid drying-out of wells between single working 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 wells with a cover film 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. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing step four more times.
4. Add 100 µl of conjugate 1 to each well. Ensure that the wells are completely empty before proceeding with this step. Cover the wells 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. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing step four more times.
6. Add 100 µl of conjugate 2 to 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. Fill the wells with 300 µl per well of wash buffer (10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing step four more times.
8. Add 100 µl of substrate/chromogen to 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 and immediately read the results.
9. A color change from red to blue indicates the presence of Staphyloccocus enterotoxins in the samples. Color development tends to concentrate along the edge of the wells. Tap the microwell plate gently to distribute the color evenly before reading.
10. Add 100 µl of the stop solution to each well. A color change from blue to yellow indicates the presence of Staphyloccocus enterotoxins in the samples.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm with a microwell plate photometer.

11. Results

A special software, the RIDA®SOFT Win.NET (Art. No. Z9996) is available to evaluate the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

11.1. Quality control for the test to be valid:

Visual:

Positive control: Blue (yellow after addition of stop solution).

Negative control: Clear or very pale blue (or very pale yellow if stopped).

An evaluation is valid only, if both criteria are fulfilled.

Photometrical:

Positive control must have reached an extinction of 1.0 or higher.

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

11.2. Interpretation of results

Visual:

1. A sample is considered POSITIVE when the negative control is colourless or very pale blue and the positive sample is significantly stronger in colour; however the positive sample needs not to be as dark as the positive control.
2. A sample is considered NEGATIVE when the negative control is colourless or very pale blue and the sample is less or equal to the colour of the negative control.

Photometrical:

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 = absorbance value of negative control + 0.15

1. A sample is considered POSITIVE when the test is valid and the absorbance of the sample is higher than or equal to the cut-off value.
2. A sample is considered NEGATIVE when the test is valid and the absorbance of the sample is lower than the cut-off value.

12. Identification of Enterotoxins

If samples are considered positive with 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.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

RIDASCREEN® SET Total

Avant-propos

RIDASCREEN® SET Total (Art. No. : R4106) est un kit de dosage 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 48 déterminations.

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 dyalise/ voir point 9.5)

Temps nécessaire :

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

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

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. dyalise :

Echantillons liquide ..... 0,05 ng/ml Toxine
Echantillons solides ..... 0,05 ng/g Toxine

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 différentier entre l'analyte et la substance ayant une réaction croisée.

Afin d'améliorer la qualité des résultats lors de la realisation de tests ELISA, nous suivons aussi notre manuel de bonnes pratiques ELISA (Good ELISA Practice GEP) dans la version. Ce manuel donne les standards minimum à observer pour l'utilisation des coffrets 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 Total (R4105; 96 déterminations)
RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (R4101)

1. Application du test

RIDASCREEN® SET Total (Art. No.: R4106) est un kit de dosage 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 x 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, laitages, à la glace, aux produits à base d'oeufs, aux salades, aux pâtisseries et aux fourrage de gâteaux ainsi que dans les préparations à base de ces produits alimentaires. Les

entérotoxines du groupe sérologique 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 par réaction antigène-anticorps des toxines principales de *S. aureus*. La surface des puits d'une plaque de microtitration est sensibilisée avec des anticorps spécifiques purifiés qui peuvent capturer les entérotoxines éventuellement présentes dans les échantillons testés.
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 le complexe sandwich (anticorps-antigène-anticorps-complexe).
Après l'ajout du substrat et du conjugué dans les puits, le conjugué va s'accrocher et la présence 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 lecteur de microplaque.

4. Composition du coffret

Chaque coffret contient le matériel suffisant pour 48 tests (contrôles positif et négatif inclus).

Component / Composant	Cap color / Couleur du capuchon	Format		Volume
Microtiter plate Microplaque	-	prêt à l´emploi		48 puits
Positive control Contrôle positif	rouge	prêt à l´emploi	colorée en rouge	1 ml
Negative control Contrôle négatif	blanc	prêt à l´emploi	incolore	1 ml
Wash buffer Tampon de lavage	marron	concentré	10 x	100 ml
Conjugate 1 Conjugué	rouge	prêt à l´emploi	colorée en vert	6 ml
Conjugate 2 Conjugué 2	noir	prêt à l´emploi	colorée en bleu	6 ml
Substrate/Chromogen Substrat/chromogène Red Chromogen Pro	marron	prêt à l´emploi	colorée en rouge	13 ml
Stop Solution Solution d'arrêt	jaune	prêt à l´emploi		14 ml

5. Matériel nécessaire non fourni

5.1. Equipement:

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

Equipement 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 de la vaisselle de laboratoire en verre ou en polypropylène (tubes, entonnoirs, béchers, flacons) pour éviter l'absorption de toxine

- Agitateur pour bécher (travail à T° ambiante)
- Centrifugeuse, 3130 à 10000g, capable de réfrigérer à 4°C, tubes à centrifuger
- Membrane de dyalise, MWCO : 6 – 8 kD, largeur : 23 ± 2 mm (Spectra/Por®1, ref: 132 650, Spectrum)
- Fermetures : largeur = 35 mm (e.g. Spectra/Por®, ref: 132 736, Spectrum)
- pH-mètre
- Tubes 50 ml
- Entonnoirs
- Tampon de laine de verre
- Bac
- Réfrigérateur (5°C ± 3 °C) and freezer (≤ -18 °C)
- Vortex
- Lecteur de microplaque (450/620 nm)

5.2. Réactifs :

− Tampon PBS, pH 7,4 (0,55g NaH_2PO_4 x H_2O, 2,85 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O + 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 contenant plus de 40% de matières grasses)
− Bouillon cœur-cervelle (Brain-Heart-Infusion – BHI) pour le pré-enrichissement de souches de Staphylocoque produisant potentiellement des toxines

Réactifs additionnels pour MOSE :

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

6. Précautions d´emploi

Ce test doit être réalisé uniquement par du personnel 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 (MSDS), disponibles sur www.r-biopharm.com.

7. Stockage

Le coffret doit être conservé entre 2 et 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 et 8 °C.

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

Ne pas utiliser le coffret après la date d'expiration (inscrite sur l'emballage). La dilution ou l'adultération des réactifs pourraient entrainer une perte de sensibilité du kit.

Les coffrets peuvent être utilisés au moins jusqu'à la date de péremption (indiquée sur les coffrets), dans les conditions de stockage prévues.

Les réactifs du test RIDASCREEN® SET Total sont indissociables. Ne pas utiliser des réactifs de différents lots.

8. Signes d´instabilité ou de détérioration

− Toute coloration bleue de la solution substrat/chromogène rouge avant la réalisation du test indique une contamination ou détérioration du réactif.
− Une valeur de DO inférieure à 1,0 ($E_{450/620\ nm}$ <1,0) pour le contrôle positif et une valeur de DO supérieur ou égal à 0,2 ($E_{450/620\ nm}$ ≥ 0,2) pour le contrôle négatif.

9. Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais.

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 coffret. 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 « *Official European Screening Method of the European Reference Laboratory for Coagulase-positive Staphylococci, Version 5, September 2010* » (rapport officiel disponible sur demande).

La méthode simplifiée pour la préparation des échantillons décrite en point 9.1 à 9.3 n'est pas forcément adaptée à l'extraction des SET dans des matrices difficiles (ex : poisson, chocolat, cornichon, légumes au vinaigre). Pour ces aliments en particulier, de faibles taux de recouvrement et une reconnaissance non spécifiques entre les protéines présentes dans la matrice et les anticorps ont été observées.

Une liste de taux de récupération pour les SET obtenu 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 / 3500 g / 10 °C (si 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
- Laisser l'échantillon obtenu atteindre la température ambiante (20 – 25 °C)
- 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 / 3500 g / 10 °C
- Si nécessaire enlever la couche de gras
- Utiliser 100 µl par puits

9.3. Méthode simplifiée pour les aliments contenant +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 / 3500 g / 10 °C
- Transférer le supernageant dans un autre récipient, ajouter le même volume de n-heptane et mélanger pendant 5 minutes.
- Centrifuger: 5 minutes / 3500 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 milieu BHI (Brain-Heart-Infusion) pour assurer la production optimale d'entérotoxines.

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

- centrifuger le surnageant de culture bactérienne liquide pendant 5 minutes / un minimum de 3500 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 recongeler.

9.5. Préparation 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 expédiés 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 mélangé et transférer cette préparation dans un bécher.

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

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

NOTE 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. Étape d'extraction

Ajouter 40 mL d'eau distillée ou d’eau tiède (38 ° C ± 2 ° C) à la préparation et homogénéiser le mélange en utilisant un mixeur. Rincer le système avec de l'eau distillée.

NOTE 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.**

NOTE 2: Au cours de l'acidification de l'échantillon afin de maintenir des entérotoxines dans une bonne forme, une attention particulière doit être donnée à: i) un pH-mètre doit être utilisé et ii) ***un pH compris entre 3,5 et 4,0*** *avant centrifugation doit être respecté.*

Veillez à ne pas à avoir un pH < 3,0 à l'aide d'acide chlorhydrique. Si le pH devient < 3,0, réaliser une autre préparation de 25 g et procédez comme décrit dans le paragraphe 9.5.1.

Centrifuger le mélange au moins à 3130 x g pendant 15 minutes à 4 ° C ou à température ambiante. Transférer le surnageant dans un bécher.

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

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

NOTE 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 comme décrit ci-dessus.

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. Récupérer toute la phase aqueuse neutralisée.

NOTE 6: Pendant la neutralisation de l'échantillon afin de maintenir des entérotoxines dans une bonne forme, une attention particulière doit être donnée à: i) un pH-mètre doit être utilisé et ii) un ***pH compris entre 7,4 et 7,6*** *après la neutralisation doit être respecté.*

Veillez à ne pas avoir un pH < 9,0. Si le pH est > 9.0, réaliser une autre préparation de 25 g et procédez comme décrit dans le paragraphe 9.5.1.

9.5.3. Dialyse: Etape de concentration

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-le avec la phase aqueuse neutralisée établi 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 suspension. Verrouiller l'autre extrémité de la membrane avec une deuxième fermeture.

NOTE 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 ° C ± 3 ° C.

NOTE 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 osmosée, 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 grammes pour les extraits de bâton).

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) avec les doigts afin de décoller et de récupérer le maximum des entérotoxines.
- Verser de petites gouttes du tampon PBS ou par d'eau osmosée (plusieurs ajouts) et de rincer à plusieurs reprises l'intérieur de la membrane afin de récupérer le maximum des entérotoxines.

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

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

Dans le cas de TIAC ou autre, 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 g	3,5 g – 5 g (ratio 5:1)
12,5 g to 17,5 g	3,5 g (3,9 g max.)

NOTE 4: Si l'extrait concentré est analysée sous 48 h, stockez-le à 5 ° C ± 3 ° C), sinon conserver à ≤ -18 ° C. L'extrait doit être complètement décongelé et homogénéisé avant l'essai.

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 de diluer, dissoudre les cristaux qui peuvent se former en incubant le tampon dans un bain d'eau à 37 °C. 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). Le tampon de dilution est stable à entre 2 et 8 °C pour une durée de 4 semaines environ.

10.2. Réalisation du test

Le lavage des puits doit être mené consciencieusement. Il conditionne l'obtention de bons résultats. 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.
2. Transférer 100µl d'aliquots des contrôles et des échantillons dans des puits individuels en enregistrant la position de chaque 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 à l'obscurité et lire les résultats immédiatement.
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 le taux d'absorbance à 450/620 nm à l'aide d'un photomètre.

11. Résultats

Un logiciel spécifique d'évaluation, RIDA®SOFT Win.NET (Art. No. : Z9996), est disponible pour gérer les tests immuno-enzymatiques RIDASCREEN®.

11.1. Contrôle de qualité pour que le test soit valable:

Visuelle:

Contrôle positif: Couleur bleue (ou jaune après l'addition de la solution d'arrêt).

Contrôle négatif: incolore ou bleu très clair (ou jaune très clair).

Une évaluation est validée seulement si les deux critères sont atteints.

Photométrique:

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

Le contrôle négatif doit avoir une densité optique inférieure à 0,2.

Si ces critères n'ont pas été remplis, les résultats des échantillons ne peuvent être validés. Les points suivants doivent être vérifiés avant de répéter le test :

- Vérifier la date de péremption du coffret
- S'assurer que les composants du coffret ont le temps d'atteindre la température ambiante (20 – 25 °C).
- Un cône de prélèvement neuf doit être utilisé pour chaque échantillon pour éviter tout risque de contamination croisée.
- Eau de lavage contaminée (utiliser de l'eau stérile pour le lavage)
- Les puits n'ont pas été lavés de façon adéquate (10.2.)
- Contamination de la pipette (nettoyer les pipettes régulièrement)

11.2. Interprétation des résultats

Visuelle:

1. Un échantillon est considéré comme POSITIF lorsque la couleur du contrôle négatif est incolore ou bleue très clair (jaune très claire) et l'échantillon est significativement plus coloré en bleu (jaune) que le contrôle négatif sans être obligatoirement aussi coloré que le contrôle positif.
2. Un échantillon est considéré NEGATIF lorsque la couleur du contrôle négatif est incolore ou bleue très clair (jaune très claire) et l'échantillon est moins ou aussi coloré que le contrôle négatif.

Photométrique:

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 l'absorbance du contrôle négatif + 0,15

1. Un échantillon est considéré comme POSITIF lorsque le test est validé et que la DO de l'échantillon est supérieure ou égale à la valeur seuil.
2. Un échantillon est considéré comme NEGATIF lorsque le test est validé et que la DO de l'échantillon est inférieur à la valeur seuil

12. 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.

Ces données correspondent à nos connaissances techniques actuelles et fournissent des informations sur nos produits et leur utilisation. R-Biopharm ne donne aucune garantie d'aucune sorte, exprimée ou implicite, en dehors du fait que les matières premières utilisées pour la fabrication de ce produit sont de qualité standard. Les produits défectueux seront remplacés. Il n'y a aucune garantie sur la valeur marchande ce produit, ou de son adéquation à un but quelconque. R-Biopharm ne pourra être tenu responsable pour aucun dommage, y compris dommages spéciaux ou indirects, ou pour des dépenses résultant directement ou indirectement de l'utilisation de ce produit.

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