

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Saxitoxin**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Saxitoxin (Paralytic Shellfish Poison, PSP)

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
saxitoxin (Paralytic Shellfish Poison, PSP)

Art. No.: R1901

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

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

Anschrift:

R-Biopharm AG  
Dolivostr. 10  
D-64293 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-0
Sekretariat Marketing	(0 61 51) 81 02-84

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-20 <a href="mailto:orders@r-biopharm.de">orders@r-biopharm.de</a>
-----------------	--

Marketing

	(0 61 51) 81 02-40 <a href="mailto:info@r-biopharm.de">info@r-biopharm.de</a>
--	--

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Kurzinformation .....	4
1. Verwendungszweck .....	5
2. Allgemeines .....	5
3. Testprinzip .....	5
4. Packungsinhalt .....	6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör .....	6
6. Vorsichtsmaßnahmen .....	7
7. Reagenzien und ihre Lagerung .....	7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall .....	7
9. Probenvorbereitung .....	8
10. Testdurchführung .....	8
11. Auswertung .....	9
12. Sensitivität .....	11
13. Spezifität .....	11
14. Reproduzierbarkeit .....	12
15. Wiederfindungsrate .....	12

## Contents

	Page
Brief information .....	13
1. Intended use .....	14
2. General .....	14
3. Test principle .....	14
4. Reagents provided .....	15
5. Materials required but not provided .....	15
6. Warnings and precautions for the users .....	16
7. Storage instructions .....	16
8. Indication of instability or deterioration of reagents .....	16
9. Preparation of samples .....	17
10. Test implementation .....	17
11. Results .....	18
12. Sensitivity .....	19
13. Specificity .....	20
14. Reproducibility .....	20
15. Recovery rate .....	21

## Appendix

Literature .....	22
------------------	----

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Saxitoxin (Art. Nr.: R1901)

Kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Saxitoxin und verwandten Algentoxinen in Muscheln.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: waschen, homogenisieren, kochen mit HCl und zentrifugieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 1,5 h  
Testdurchführung ..... 1,5 h  
(unabhängig von der Probenzahl)

Nachweisgrenze: 2 ppb

Wiederfindungsrate: ca. 90 %

Kreuzreaktionen: Saxitoxin ..... 100 %  
Decarbamoylsaxitoxin ..... 10 - 30 %  
Gonyautoxine II, III, B1, C1 und C2 ..... 10 - 30 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Saxitoxin-Tests wurde durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu entsprechenden Algentoxinen ermittelt. Da die verwendeten Toxine nicht als reine Standardsubstanzen erhältlich sind, ist eine Kontamination der jeweiligen Toxine mit Saxitoxin nicht auszuschließen. Daher können Kreuzreaktionen zu den angeführten Toxinen möglicherweise niedriger sein als angegeben.

## 1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN® Saxitoxin-Test ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Saxitoxin und verwandten Algentoxinen in Muscheln.

## 2. Allgemeines

Saxitoxin ist ein starkes Neurotoxin, das in verschiedenen Algen (z.B. Gonyaulax-Spezies) vorkommt. So kann Saxitoxin über die Nahrungskette in Muscheln gelangen und ist dann für die starke Toxizität von Muscheln verantwortlich.

Saxitoxin gehört zu einer Gruppe von Toxinen, die auch als Paralytic Shellfish Poison (PSP) bezeichnet werden. Es verursacht Atemlähmungen, die in ca. 8 % der Fälle zum Tode führen (Saxitoxin blockiert die Natriumkanäle von Nerven- und Muskelmembranen). Die letale Dosis für den Menschen liegt bei 1 - 3 mg. Schon 0,5 - 1,0 µg Saxotoxin können nach oraler Aufnahme erste Symptome wie Gefühlslosigkeit im Gesichtsbereich und Atemlähmung hervorrufen.

Eine anerkannte und zuverlässige Methode zum Nachweis dieser Algentoxine ist der "Mouse mean death time bioassay". Die Grenzen dieses Verfahrens liegen zum einen in der hohen Variabilität der Ergebnisse und zum anderen in der relativ geringen Empfindlichkeit (ca. 37 µg PSP/100 g Probe). Diese geringe Sensitivität ist insbesondere im Hinblick auf gesetzliche Grenzwerte, die in den einzelnen EU-Staaten zwischen 40 und 80 µg PSP/100 g Probe liegen, problematisch. Hinzu kommt, dass vom Standpunkt des Tierschutzes der Bioassay kritisch zu betrachten ist.

Als Alternative steht der RIDASCREEN® Saxitoxin-Test zur Verfügung, der den sensitiven und schnellen Nachweis von Saxitoxin und verwandten Algentoxinen in Muscheln erlaubt.

*Eine vergleichende Untersuchung von über 30 verschiedenen natürlich kontaminierten Muschelproben zeigte eine gute Übereinstimmung der RIDASCREEN® Saxitoxin-Ergebnisse mit der fluorimetrischen Methode (amtliche Methode nach §35 LMBG).*

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Antikörpern gegen Saxitoxin beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzymmarkiertes Saxitoxin (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes Saxitoxin konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Saxitoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat (Harnstoffperoxid) und Chromogen (Tetramethylbenzidin). Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge  $\geq 600$  nm); die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Saxitoxin-Konzentration in der Probe.

#### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Einzelkavitäten)  
beschichtet mit Antikörpern gegen Saxitoxin
- 6 x Standardlösungen, je 1,3 ml  
0 ppt (Nullstandard), 10 ppt, 30 ppt, 90 ppt, 270 ppt, 810 ppt  
Saxitoxin in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml) .....roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes Saxitoxin, Konzentrat
- 1 x Substrat (7 ml) .....grüner Verschluss  
enthält Harnstoffperoxid
- 1 x Chromogen (7 ml) ..... blauer Verschluss  
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) ..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffer (50 ml)  
Proben- und Konjugatverdünnungspuffer

#### 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

##### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mixer
- Magnetrührer
- Zentrifuge
- Messpipetten
- 10  $\mu$ l-, 50  $\mu$ l-, 100  $\mu$ l- und 500  $\mu$ l-Mikropipetten

## 5.2. Reagenzien:

– 0,1 M HCl

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten Saxitoxin. Da es sich um eine hochtoxische Substanz handelt, ist besondere Vorsicht geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe tragen).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden.

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

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

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Den Testkit auf keinen Fall einfrieren.

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

Die farblose Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Eine Blaufärbung der Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten weist auf einen Reagenzienverfall hin.

Eine Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für den Nullstandard weist ebenfalls auf einen Reagenzienverfall hin.

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1. Muscheln

- Muscheln nach dem Entfernen der Schalen mit Wasser spülen und homogenisieren
- 10 g Muschelhomogenat mit 10 ml 0,1 M HCl versetzen und unter Rühren 5 min kochen
- zentrifugieren: 10 min / ca. 3500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C) (eine evtl. Trübung des Überstands nach der Zentrifugation hat keinen Einfluss auf das Testergebnis)
- 20 µl des Überstands mit Probenverdünnungspuffer auf 2 ml auffüllen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
2. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.
3. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.
4. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Kavitäten ab. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.
5. Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten abdecken.

### 10.2. Saxitoxin-Enzymkonjugat

Das Saxitoxin-Enzymkonjugat (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da das rekonstituierte Konjugat nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat mit Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat vor Entnahme vorsichtig durchmischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 mit Puffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2,0 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).



### 10.3. Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen

Den Folienbeutel an der Querseite entlang der Verschlussleiste aufschneiden. Die benötigten Kavitäten zusammen mit dem Halterahmen entnehmen. Die nicht benötigten Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

### 10.4. Testdurchführung

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl dest. Wasser waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 60 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen. Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

## 11. Auswertung

Die Mittelwerte der erhaltenen Extinktionswerte der Standards bzw. der Proben durch den Extinktionswert des ersten Standards (Nullstandard) teilen und mit 100 multiplizieren. Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben.

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Saxitoxin-Konzentration in [ng/kg] auftragen. Die Eichkurve sollte im Bereich von 30 - 270 ng/kg (ppt) annähernd linear sein. Die der Extinktion der jeweiligen Proben entsprechende Saxitoxin-Konzentration in ng/kg aus der Eichkurve ablesen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Saxitoxin-Konzentration in ng/kg zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Muscheln ..... 200

**Anmerkung:**

**Für die Auswertung ELISA-Tests ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Tests entwickelte Software, die RIDA® SOFT Win, erhältlich.**

## 12. Sensitivität

Die mittlere untere Nachweisgrenze RIDASCREEN® Saxitoxin-Tests liegt bei 10 ng/kg (ppt). Bezogen auf das Probenvorbereitungsprotokoll resultiert daraus eine untere Nachweisgrenze von 2 µg/kg (ppb) Saxitoxin in Muscheln.



Abb. 1: Eichkurve eines RIDASCREEN® Saxitoxin Testkits

## 13. Spezifität

Die Spezifität RIDASCREEN® Saxitoxin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Algentoxinen ermittelt.

Kreuzreaktionen:	Saxitoxin .....	100 %
	Decarbamoylsaxitoxin .....	10 - 30 %
	Gonyautoxine II, III, B1, C1 und C2 .....	10 - 30 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Saxitoxin-Tests wurde durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu entsprechenden Algentoxinen ermittelt. Da die verwendeten Toxine nicht als reine Standardsubstanzen erhältlich sind, ist eine Kontamination der jeweiligen Toxine mit Saxitoxin nicht auszuschließen. Daher können Kreuzreaktionen zu den angeführten Toxinen möglicherweise niedriger sein als angegeben.

## 14. Reproduzierbarkeit

Die Präzision innerhalb einer Serie wurde aus den Resultaten von drei verschiedenen Experimenten ermittelt. Abbildung 2 zeigt das Inter-Assay-Präzisionsprofil von RIDASCREEN® Saxitoxin. Die Variationskoeffizienten (% CV) der Extinktionen, ermittelt mit den Standards, sind gegen die entsprechenden Saxitoxin-Konzentrationen aufgetragen. Die Variationskoeffizienten sind über den gesamten Bereich der Kurve konstant und so niedrig, dass eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gewährleistet ist.



Abb. 2: Inter-Assay-Präzisionsprofil von RIDASCREEN® Saxitoxin

## 15. Wiederfindungsrate

Die mittlere Wiederfindungsrate von künstlich kontaminierten Muschelproben beträgt ca. 90 % bei einem mittleren Variationskoeffizienten von 12 %.

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

# RIDASCREEN® Saxitoxin

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of saxitoxin (Paralytic Shellfish Poison, PSP)

## Brief information

RIDASCREEN® Saxitoxin (Art. No.: R1901)

Competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of saxitoxin and related toxins in mussels.

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

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: washing, homogenization, boiling with HCl and centrifugation

Time requirement: sample preparation (for 10 samples) ....approx. 1.5 h  
test implementation .....1.5 h  
(regardless of the number of samples)

Detection limit: 2 ppb

Recovery rate: approx. 90 %

Cross-reactivity: Saxitoxin ..... 100 %  
Decarbamoyl saxitoxin ..... 10 - 30 %  
Gonyautoxins II, III, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>..... 10 - 30 %

The specificity of the RIDASCREEN® Saxitoxin assay was established by analyzing the cross reactivity to the corresponding toxins. Because of the fact, that pure standard substances are not available, a contamination of the corresponding toxins with saxitoxin is possible. Therefore, the results obtained indicate approx. the above mentioned or less cross reactivities.

## 1. Intended use

The RIDASCREEN® Saxitoxin test is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of saxitoxin and related toxins in mussels.

## 2. General

Saxitoxin is a potential neurotoxin which occurs in various algae (Gonyaulax-species). Over the food chain it could reach mussels. Therefore, saxitoxin is then mainly responsible for the high toxicity of some mussels.

Saxitoxin, the principal component of paralytic shellfish poisons (PSP), is responsible for respiratory paralysis which in 8 % of cases leads to death. Saxitoxin blocks the sodium ion channels in nerve and muscle membranes. The lethal dose in humans is 1 to 3 mg. Numbness and respiratory arrest can occur already after oral ingestion of as little as 0.5 – 1.0 µg saxitoxin.

An established and reliable detection method for these algae toxins has been the "mouse mean death time bioassay". The limitations of this procedure are the high variability of the results and low sensitivity (approx. 37 µg PSP/100 g of sample). This low sensitivity is particularly problematic given the allowable limits of 40 and 80 µg PSP/100 g of sample respectively set by the individual member states of the EU. In addition, this method is to be critically reconsidered from the animal protection point of view.

As an alternative, the RIDASCREEN® Saxitoxin assay was developed for the rapid and sensitive detection of Saxitoxin and related toxins in mussels.

*In a comparative study using over 30 different naturally contaminated mussel samples the RIDASCREEN® Saxitoxin assay showed excellent correlation with the fluorimetric method (the german official method according to §35 LMBG).*

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with antibodies directed against saxitoxin. Standards or sample solutions and enzyme conjugated saxitoxin are added. Free and enzyme conjugated saxitoxin compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate (urea peroxide) and chromogen (tetramethylbenzidine) are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the colorless chromogen into a blue product.

The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm (optional reference wavelength  $\geq 600$  nm). The absorption is inversely proportional to the saxitoxin concentration in the sample.

#### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)  
coated with antibodies directed against saxitoxin
- 6 x Standard solutions, 1.3 ml each  
0 ppt (zero standard), 10 ppt, 30 ppt, 90 ppt, 270 ppt, 810 ppt  
saxitoxin in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (0.7 ml) .....red cap  
peroxidase conjugated saxitoxin, concentrate
- 1 x Substrate (7 ml solution).....green cap  
contains urea peroxide
- 1 x Chromogen (7 ml) ..... blue cap  
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) .....yellow cap  
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer (50 ml)  
Sample and conjugate dilution buffer

#### 5. Materials required but not provided

##### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- mixer
- magnetic stirrer
- centrifuge
- graduated pipettes
- 10  $\mu$ l-, 50  $\mu$ l-, 100  $\mu$ l- and 500  $\mu$ l-micropipettes

## 5.2. Reagents:

– 0.1 M HCl (hydrochloric acid)

## 6. Warnings and precautions for the users

Standards contain saxitoxin. Particular care should be taken. Do not allow the reagent to come in contact with the skin (use gloves).

The stop solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact of the reagent with the skin.

Do not use RIDASCREEN® Saxitoxin kit past the kit expiration date on the label. Dilution or adulteration of these reagents may result in loss of sensitivity.

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

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). DO NOT FREEZE.

Return any unused microwells to their original foil bag and reseal them together with the desiccant provided.

The colorless chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

Any coloration of the chromogen solution is indicative of deterioration and the reagent should be discarded.

A value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450 \text{ nm}} < 0.6$ ) for the zero standard may indicate deterioration of reagents.



## 9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

### 9.1. mussels

- after removing the shell, wash the mussel meat with water and homogenize
- mix 10 g of homogenized mussels with 10 ml HCl (0.1 M) and boil for 5 min while stirring
- centrifuge: 10 min /approx. 3500 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) (possible clouding of the supernatant after centrifugation does not have an effect on the test result)
- use 20 µl of the supernatant and fill up to 2 ml with sample dilution buffer
- employ 50 µl per well in the assay

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. Return all reagents to 2 - 8 °C (36 - 46 °F) immediately after use.
3. Do not allow microwells to dry between working steps.
4. Reproducibility in any EIA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the EIA test procedure.
5. Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plates is recommended.

### 10.2. Saxitoxin enzyme conjugate

The saxitoxin enzyme conjugate (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted enzyme conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the enzyme conjugate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 in buffer (e. g. 200 µl conjugate concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

### 10.3. Antibody-coated microtiter strips

The foil bag is cut open along the transverse side beyond the zip. The required wells are extracted together with the frame. Those wells not required are kept together with the drying agent, well sealed in the foil bag and should continuously be stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

### 10.4. Test procedure

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50µl of standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of diluted enzyme conjugate solution to the bottom of each well. Mix gently by rocking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all wells with 250 µl of distilled water and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by rocking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by rocking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm against an air blank. Read within 60 minutes after addition of stop solution.

## 11. Results

The mean values of the absorbance values obtained for the standards and the samples are divided by the absorbance value of the first standard (zero standard) and multiplied by 100. The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages.

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the saxitoxin concentration in [ng/kg]. The calibration curve should be virtually linear in 30 - 270 ng/kg (ppt) range. The saxitoxin concentration in ng/kg corresponding to the absorbance of each sample can be read from the calibration curve.

In order to obtain the saxitoxin concentration in ng/kg actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

mussels ..... 200

**Please note:**

For evaluation of the ELISA kits special software for the RIDASCREEN® tests has been developed by R-Biopharm. The RIDA® SOFT Win can be ordered by your local distributor.

**12. Sensitivity**

The mean lower detection limit of the RIDASCREEN® Saxitoxin test is 10 ng/kg. According to the sample preparation protocol, the detection limit is approx. 2 µg/kg (ppb) saxitoxin in mussels.



Fig. 1: Calibration curve of a RIDASCREEN® Saxitoxin kit

### 13. Specificity

The specificity of the RIDASCREEN® Saxitoxin test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding toxins.

Cross-reactivity:	Saxitoxin .....	100 %
	Decarbamoyl saxitoxin .....	10 - 30 %
	Gonyautoxins II, III, B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> und C <sub>2</sub> .....	10 - 30 %

The specificity of the RIDASCREEN® Saxitoxin assay was established by analyzing the cross reactivity to the corresponding toxins. Because of the fact, that pure standard substances are not available, a contamination of the corresponding toxins with saxitoxin is possible. Therefore, the results obtained indicate approx. the above mentioned or less cross reactivities.

### 14. Reproducibility

The precision within a series was determined from the results of three different experiments. Fig. 2 shows the interassay precision profile of RIDASCREEN® Saxitoxin. The coefficients of variation (% CV) obtained for the absorption values of the standards are entered against the corresponding saxitoxin concentrations. The coefficients of variation are so low with respect to the whole range of the figure that a high reproducibility of the results is ensured.

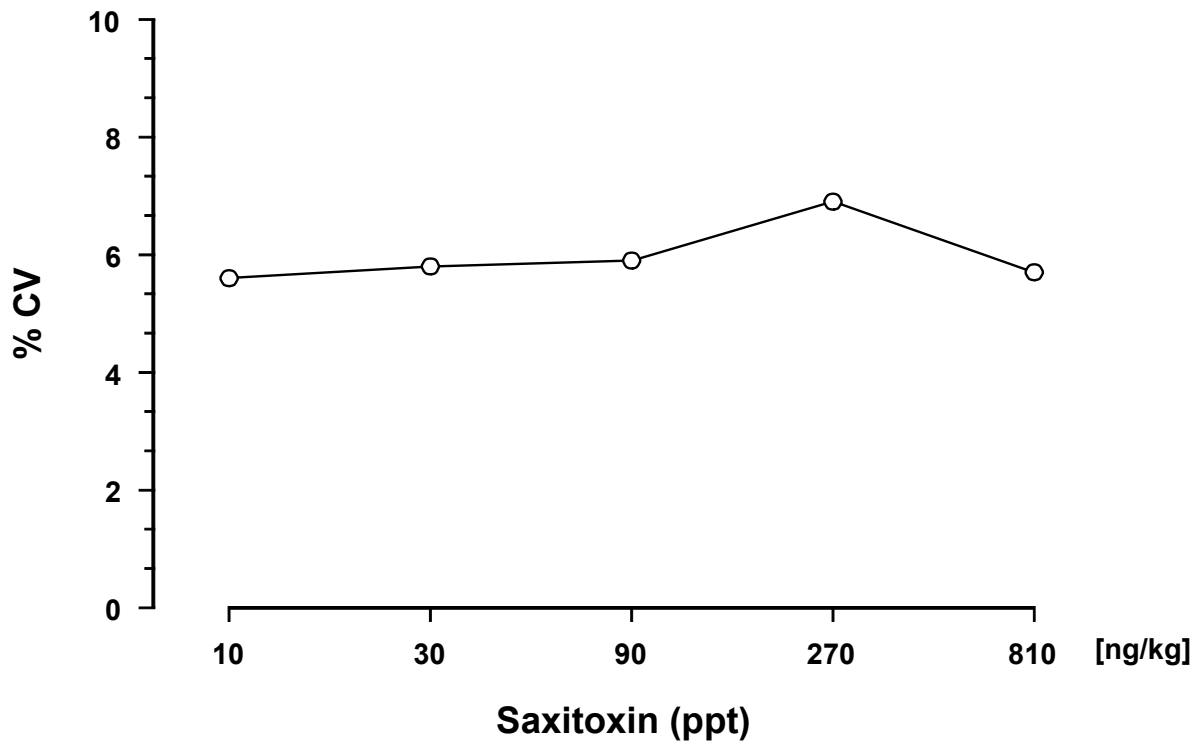


Abb. 2: Interassay precision profile of RIDASCREEN® Saxitoxin

## 15. Recovery rate

The recovery rate for artificial contaminated mussel samples is approx. 90 % with a mean coefficient of variation of 12 %.

## Appendix

### Literature

1. Usleber, E. et al.; Letters in Applied Microbiology, 13, 275-277 (1991):  
Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish
2. Schantz, E. J.; American Chemical Society, 9, 99-111 (1984):  
Historical Perspective on Paralytic Shellfish Poison
3. Sullivan, J. J. and Iwaoka, W. T.; J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 66, 2, 297-303 (1983):  
Seafood Toxins: High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Toxins Associated with Paralytic Shellfish Poisoning

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