



RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ)

Art. No. R3722

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von AMOZ

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of AMOZ

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 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

Fax: +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® Nitrofurantoin (AMOZ) (Art. Nr.: R3722) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AMOZ in Shrimps, Fisch, Fleisch (Rind, Schwein) und Geflügel (Huhn, Pute).

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

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

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren, derivatisieren, extrahieren, zentrifugieren, evaporieren und entfetten

Je nach Arbeitsablauf im Labor können eine 3-stündige oder eine über-Nacht Derivatisierung durchgeführt werden. Für die höchste Präzision wird die über-Nacht Methode empfohlen. Alle hier angegebenen Werte beziehen sich auf diese Methode, Details zur 3-stündigen Derivatisierung sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Zeitbedarf:

Variante I (kurz):

Probenvorbereitung..... ca. 3 h

Derivatisierung ca. 3 h

Variante II (über-Nacht)

Probenvorbereitung.....3 h

Derivatisierung über Nacht (ca. 16 h)

Testdurchführung (Inkubationszeit) 45 min

Nachweisgrenze (LOD):

bezogen auf die Standardsubstanz

Shrimps..... ca. 30 ng/kg

Fisch ca. 40 ng/kg

Fleisch (Rind) ca. 40 ng/kg

Fleisch (Schwein) ca. 65 ng/kg

Geflügel (Huhn, Pute)..... ca. 40 ng/kg

| | | |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------|
| Detection capability (cc β): | Shrimps..... | 300 ng/kg |
| bezogen auf die | Fisch | 300 ng/kg |
| Standardsubstanz | Fleisch (Rind) | 300 ng/kg |
| | Fleisch (Schwein) | 300 ng/kg |
| | Geflügel (Huhn, Pute)..... | 300 ng/kg |

| | | |
|---------------------|----------------------------|----------------|
| Wiederfindungsrate: | Shrimps..... | ca. 100 % |
| (bezogen auf die | Fisch | ca. 90 % |
| Standardsubstanz; | Fleisch (Rind) | ca. 110 % |
| dotierte Proben) | Fleisch (Schwein) | ca. 110 % |
| | Geflügel (Huhn, Pute)..... | ca. 90 - 100 % |

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ) Testsystems wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von der 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.

Spezifität:

| | | |
|-----------------|---|----------|
| im Puffersystem | NP-AMOZ (Standardsubstanz)..... | 100 % |
| | Furaltadon..... | ca. 70 % |
| | Andere Nitrofurantoin-Antibiotika, Derivate, Metabolite und Muttersubstanzen (NP-AOZ, NP-AHD, NP-SEM, AOZ, AMOZ, AHD, SEM, Furazolidon, Nitrofurantoin, Nitrofurazon) | < 1 % |
| | Chloramphenicol | < 1 % |

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 unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

| | |
|---|---------|
| RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) | (R3703) |
| RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD)..... | (R3713) |
| RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM) | (R3715) |
| RIDA® Nitrofuran (AMTZ) Dotierlösung..... | (R3799) |
| RIDA® Nitrofuran (AOZ) Dotierlösung..... | (R3798) |
| RIDA® Nitrofuran (AHD) Dotierlösung | (R3796) |
| RIDA® Nitrofuran (SEM) Dotierlösung | (R3797) |

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofuran (AMTZ) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AMTZ in Shrimps, Fisch, Fleisch und Geflügel.

2. Allgemeines

Nitrofurane sind synthetische Breitbandantibiotika, die aufgrund ihrer hervorragenden antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften häufig in der Tierproduktion eingesetzt werden. Sie werden aber auch zur Wachstumsbeschleunigung in der Shrimps-, Geflügel- und Schweineproduktion eingesetzt. In Langzeitversuchen mit Labortieren wurden bei der Muttersubstanz und deren Metaboliten karzinogene und mutagene Eigenschaften beobachtet. Dies führte zu einem Anwendungsverbot von Nitrofuranen bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Die Behandlung von Nutztieren mit den Nitrofuran-Antibiotika Furaltadon, Nitrofurantoin und Nitrofurazon wurde 1993 in der EU verboten, das Verbot von Furazolidon folgte 1995.

Die Rückstandsanalytik von Nitrofuranen basiert auf der Detektion der gewebegebundenen Metabolite der Muttersubstanzen. Da die Muttersubstanzen sehr schnell metabolisiert werden, sind sie nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar. Die Nitrofuran-Metabolite sind jedoch noch lange nach Verabreichung nachweisbar und werden deshalb zur Rückstandskontrolle von Nitrofuranen bestimmt.

| Muttersubstanz | Metabolit | Abkürzung |
|----------------|---|-----------|
| Nitrofurantoin | 1-Aminohydantoin | AHD |
| Furaltadon | 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinon | AMTZ |
| Furazolidon | 3-Amino-2-oxazolidinon | AOZ |
| Nitrofurazon | Semicarbazid | SEM |

Vor der Analyse müssen die Metabolite mittels Inkubation mit 2-Nitrobenzaldehyd in NP-AHD, NP-AMAZ, NP-AOZ und NP-SEM derivatisiert werden (siehe 5.2).

3. Testprinzip

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

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogenlösung. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur AMAZ-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

| Komponente | Deckelfarbe | Zustand | Inhalt |
|---|-------------|----------------------|---------------------|
| Microtiter plate Mikrotiterplatte | - | gebrauchsfertig | 96 Kavitäten |
| Standard 1 Standard 1 | weiß | gebrauchsfertig | 0 ng/L 1,3 ml |
| Standard 2 Standard 2 | weiß | gebrauchsfertig | 125 ng/L 1,3 ml |
| Standard 3 Standard 3 | weiß | gebrauchsfertig | 300 ng/L 1,3 ml |
| Standard 4 Standard 4 | weiß | gebrauchsfertig | 750 ng/L 1,3 ml |
| Standard 5 Standard 5 | weiß | gebrauchsfertig | 1500 ng/L 1,3 ml |
| Standard 6 Standard 6 | weiß | gebrauchsfertig | 3000 ng/L 1,3 ml |
| Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween | | Salz zum Auflösen | |
| Conjugate Konjugat | rot | gebrauchsfertig | 7,5 ml |
| Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro | braun | gebrauchsfertig | 13 ml |
| Stop solution Stopp Lösung | gelb | gebrauchsfertig | 14 ml |
| 2-Nitrobenzaldehyde 2-Nitrobenzaldehyd | | Feststoff | 100 mg |

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

| Gerät | Shrimps | Fisch | Fleisch | Geflügel |
|---|---------|-------|---------|----------|
| Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm) | • | • | • | • |
| Mixer/Homogenisator | • | • | • | • |
| variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten | • | • | • | • |
| Wasserbad (37 °C/50 °C) | • | • | • | • |
| Schüttler (Vortex) | • | • | • | • |
| Zentrifuge | • | • | • | • |
| Evaporator | • | • | • | • |

5.2. Reagenzien:

| Reagenz | Shrimps | Fisch | Fleisch | Geflügel |
|--|---------|-------|---------|----------|
| A.dest. | • | • | • | • |
| HCl (1M) | • | • | • | • |
| K ₂ HPO ₄ (0,1M) | • | • | • | • |
| NaOH (1M) | • | • | • | • |
| Ethylacetat | • | • | • | • |
| n-Hexan | • | • | • | • |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | • | • | • | • |

Für die Probenvorbereitung ist die Herstellung einer Derivatisierungslösung erforderlich: 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (siehe 4.) in Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Lösung jeweils vor Gebrauch frisch ansetzen, z.B. 7,6 mg 2-Nitrobenzaldehyd in 5 ml DMSO lösen.

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (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 Substrat-/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlich gefärbten Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Shrimps (3-Stunden bzw. über-Nacht Aufarbeitung)

- Shrimpsprobe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1M HCl und **100 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd in Dimethylsulfoxid (siehe 5.2) kräftig mischen

Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C oder über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M K_2HPO_4 , 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugeben, 30 s kräftig schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s gründlich mischen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der wässrigen (unteren) Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Fisch (3-Stunden bzw. über-Nacht Aufarbeitung)

- Fischprobe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1M HCl und **200 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd in Dimethylsulfoxid (siehe 5.2) kräftig mischen

Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C oder über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M K₂HPO₄, 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugegeben, 30 s kräftig schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
 - Bei fettreichen Fischen können ölige, nicht evaporierbare Rückstände entstehen. In diesem Fall wird die Probe als fertig evaporiert betrachtet.
- den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s gründlich mischen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der wässrigen (unteren) Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Fleisch und Geflügel (3-Stunden bzw. über-Nacht Aufarbeitung)

- Probe zerkleinern und mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Masse mit 4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1M HCl und **300 µl** 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd in Dimethylsulfoxid (siehe 5.2) kräftig mischen

Derivatisierung

- 3 h bei 50 °C oder über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubieren
- 5 ml 0,1 M K₂HPO₄, 0,4 ml 1 M NaOH und 10 ml Ethylacetat zugegeben, 30 s kräftig schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein neues Gefäß überführen und bei ca. 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- den Rückstand mit 1 ml n-Hexan lösen, 10s vortexen und mit 1 ml Waschpuffer 30 s gründlich mischen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der wässrigen (unteren) Phase pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.) nutzen. Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 100 µl Substrat-/Chromogen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 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 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden. Um die Matrixeffekte der Proben zu kompensieren wurde die Standardkonzentration angepasst.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die AMOZ-Konzentration [ng/L] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche AMOZ-Konzentration in ng/L bzw. ng/kg (ppt) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der **Verdünnungsfaktor 2**.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren sie bitte info@r-biopharm.de

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[®] Nitrofuran (AMOZ)

Brief information

RIDASCREEN[®] Nitrofuran (AMOZ) (Art. No.: R3722) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of AMOZ in shrimp, fish, meat (bovine and porcine) and poultry (chicken and turkey).

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

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

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: homogenization, derivatization, extraction, centrifugation, evaporation, defatting

Depending on the workflow in the laboratory, a 3-hour or an over-night derivatization may be performed. For highest precision, the over-night method is recommended. All specifications in this manual were determined using this sample preparation; details on the 3 hour method are published in the validation report.

Time requirement:

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| method I (short) | |
| sample preparation..... | 3 h |
| derivatization | 3 h |
| method II (over-night) | |
| sample preparation..... | 3 h |
| derivatization | over-night (approx. 16 h) |
| test implementation | 45 min |

Limit of Detection: (corresponding to the standard substance)

| | |
|---------------------------------|------------------|
| shrimp | approx. 30 ng/kg |
| fish | approx. 40 ng/kg |
| meat (bovine) | approx. 40 ng/kg |
| meat (porcine) | approx. 65 ng/kg |
| poultry (chicken, turkey) | approx. 40 ng/kg |

| | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Detection capability (cc β): | shrimp | 300 ng/kg |
| (corresponding to the | fish | 300 ng/kg |
| standard substance) | meat (bovine) | 300 ng/kg |
| | meat (porcine) | 300 ng/kg |
| | poultry (chicken, turkey) | 300 ng/kg |
| Recovery | shrimp | approx. 100 % |
| (corresponding to the | fish | approx. 90 % |
| standard substance; | meat (bovine) | approx. 110 % |
| spiked samples) | meat (porcine) | approx. 110 % |
| | poultry (chicken, turkey) | approx. 90 - 100 % |

The specificity of the RIDASCREEN[®] Nitrofurantoin (AMOZ) test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from the values 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.

Specificity:

in buffer

| | |
|---|----------|
| NP-AMOZ (Standard substance)..... | 100 % |
| Furaltadone | ca. 70 % |
| Other Nitrofurantoin-antibiotics, derivatives, metabolites und parent substances (NP-AOZ, NP-AHD, NP-SEM, AOZ, AMOZ, AHD, SEM, Furazolidone, Nitrofurantoin, Nitrofurazone)..... | < 1 % |
| Chloramphenicol | < 1 % |

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® Nitrofuran (AOZ) | (R3703) |
| RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD)..... | (R3713) |
| RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM) | (R3715) |
| RIDA® Nitrofuran (AMAZ) Dotierlösung..... | (R3799) |
| RIDA® Nitrofuran (AOZ) Dotierlösung..... | (R3798) |
| RIDA® Nitrofuran (AHD) Dotierlösung | (R3796) |
| RIDA® Nitrofuran (SEM) Dotierlösung | (R3797) |

1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofuran (AMAZ) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of AMAZ in shrimp, fish, meat (porcine and bovine) and poultry (chicken and turkey).

2. General

Nitrofurans are synthetic broad-spectrum antibiotics, which are frequently used in animal production due to their excellent antibacterial and pharmacokinetic properties. They have also been used as growth promoters during the production of shrimps, poultry and pigs. Long term animal experiments have shown that the parent compounds and their metabolites have carcinogenic and mutagenic characteristics. This led to the prohibition of nitrofurans for the treatment of animals used for food production. In 1993, the EU banned the nitrofurans furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone for use in animals used as sources of food, and in 1995 the use of furazolidone was also prohibited. The analysis of nitrofurans are based on the detection of the tissue bound metabolites of nitrofurans. The parent compounds are difficult to detect accurately since they are metabolized very rapidly after treatment. The tissue bound nitrofuran metabolites however are present for a long time after administration and they are used to detect nitrofuran abuse.

| Parent compound | Metabolite | Abbreviation |
|-----------------|--|--------------|
| Nitrofurantoin | 1-Aminohydantoin | AHD |
| Furaltadone | 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone | AMAZ |
| Furazolidone | 3-Amino-2-oxazolidinone | AOZ |
| Nitrofurazone | Semicarbazide | SEM |

Prior to analysis, the metabolites have to be derivatized by incubation with 2-Nitrobenzaldehyde into NP-AHD, NP-AMAZ, NP-AOZ and NP-SEM.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-AMOZ antibodies. The microtiter plate is already functionalized with anti-AMOZ antibodies, which are bound by the immobilized capture antibodies. Standards or sample and AMOZ conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated AMOZ compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step.

The conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the AMOZ concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

| Component | Cap color | Format | | Volume |
|--|-----------|---------------------|-----------|----------|
| Microtiter plate | - | Ready-to-use | | 96 wells |
| Standard 1 | White | Ready-to-use | 0 ng/L | 1,3 ml |
| Standard 2 | White | Ready-to-use | 125 ng/L | 1,3 ml |
| Standard 3 | White | Ready-to-use | 300 ng/L | 1,3 ml |
| Standard 4 | White | Ready-to-use | 750 ng/L | 1,3 ml |
| Standard 5 | White | Ready-to-use | 1500 ng/L | 1,3 ml |
| Standard 6 | White | Ready-to-use | 3000 ng/L | 1,3 ml |
| Wash buffer salt Tween | | Salt for dissolving | | |
| Conjugate | Red | Ready-to-use | | 7,5 ml |
| Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro | Brown | Ready-to-use | | 13 ml |
| Stop solution | Yellow | Ready-to-use | | 14 ml |
| 2-Nitrobenzaldehyde | | Solid | | 100 mg |

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

| Equipment | Shrimp | Fish | Meat | Poultry |
|--|--------|------|------|---------|
| Microtiter plate spectrophotometer (450 nm) | • | • | • | • |
| Blender/homogenisator | • | • | • | • |
| Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes | • | • | • | • |
| Waterbath (37 °C/50 °C) | • | • | • | • |
| Vortex | • | • | • | • |
| Centrifuge | • | • | • | • |
| Evaporator | • | • | • | • |

5.2. Reagents:

| Reagent | Shrimps | Fisch | Fleisch | Geflügel |
|--|---------|-------|---------|----------|
| A.dest. | • | • | • | • |
| HCl (1M) | • | • | • | • |
| K ₂ HPO ₄ (0,1M) | • | • | • | • |
| NaOH (1M) | • | • | • | • |
| Ethylacetate | • | • | • | • |
| n-Hexane | • | • | • | • |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | • | • | • | • |

For the derivatization step, a solution of 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde (see 4.) in Dimethylsulfoxide (DMSO) has to be prepared directly before use (i.e. dissolve 7.6 mg 2-Nitrobenzaldehyde in 5 ml DMSO).

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. 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.

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

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

8. Indication of deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

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

9.1. Shrimps (3h and over-night sample preparation)

- homogenize the sample, use stomacher or mixer
- prepare 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in Dimethylsulfoxide (DMSO) (see 5.2.)
- mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and **100** µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in DMSO (see 5.2) by shaking thoroughly

Derivatisation

- incubate for 3h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- add 5 ml 0.1 M K_2HPO_4 , 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, shake vigorously for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)
- dissolve the residue in 1 ml n-hexane and mix properly with 1 ml wash buffer for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl of the lower, aqueous phase per well in the assay

9.2. Fish (3h and over-night sample preparation)

- homogenize the sample, use stomacher or mixer
- prepare 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in Dimethylsulfoxide (DMSO) (see 5.2.)
- mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and **200** µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in DMSO (see 5.2) by shaking thoroughly

Derivatisation

- incubate for 3h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- add 5 ml 0.1 M K₂HPO₄, 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, shake vigorously for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)
 - if the sample has a high fat content, fatty residues that cannot be evaporated may occur. In this case the evaporation step is completed and sample preparation can be continued
- dissolve the residue in 1 ml n-hexane and mix properly with 1 ml wash buffer for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl of the lower, aqueous phase per well in the assay

9.3. Meat and poultry (3h and over-night sample preparation)

- homogenize the sample, use stomacher or mixer
- prepare 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in Dimethylsulfoxide (DMSO) (see 5.2.)
- mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml distilled water, 0.5 ml 1 M HCl and **300** µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde in DMSO (see 5.2) by shaking thoroughly

Derivatisation

- incubate for 3h at 50 °C (122 °F) or over-night (approx. 16 h) at 37 °C (98.6 °F)
- add 5 ml 0.1 M K₂HPO₄, 0.4 ml 1 M NaOH and 10 ml ethyl acetate, shake vigorously for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate to dryness at 60 °C (140 °F)
- dissolve the residue in 1 ml n-hexane and mix properly with 1 ml wash buffer for 30 sec
- centrifuge: 10 min / 4000 g / at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl of the lower, aqueous phase per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

As **wash buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the wash buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C). Use 1 part 10fold concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the conjugate to the bottom of each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 C) in the dark.
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C) in the dark.
6. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

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

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

Remark for the calculation without software:

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

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the AMOZ concentration [ng/L]. Standard concentrations were adjusted to compensate for matrix effects.

In order to obtain the AMOZ concentration in ng/L / ng/kg (ppt) 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 factor is 2**.

For further information or applications please contact your local distributor or R-Biopharm AG.

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.

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