



RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones

REF **R3113**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Chinolonen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of quinolones

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

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

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

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones (R3113) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chinolonen in Ei, Fleisch, Fisch und Shrimps.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für max. 48 Doppelbestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Ei, Shrimps: homogenisieren, extrahieren, zentrifugieren
Fleisch, Fisch: homogenisieren, extrahieren, zentrifugieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)..... ca. 30 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 Std. 15 min

Nachweisgrenze: Shrimps.....6 µg/kg (ppb)
(bezogen auf die Fisch 8 µg/kg
Standardsubstanz) Ei 9 µg/kg
Fleisch 10 µg/kg

Wiederfindungsrate: 80 - 110 %
(bezogen auf die
Standardsubstanz)

Spezifität: Ciprofloxacin (Standardsubstanz)100 %
Norfloxacin, Enrofloxacin,
Marbofloxacin, Danofloxacin,
Difloxacin, Flumequin, Ofloxacin.....> 100 %
Sarafloxacin43 %
Oxolinsäure24 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones - 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. 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

RIDA® Ciprofloxacin Dotierlösung (R3198)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chinolonen in Ei, Rind-, Schweine-, Schaf-, Hühner- und Putenfleisch sowie Fisch und Shrimps.

2. Allgemeines

Gyrasehemmer werden in 4 Untergruppen unterteilt. Ein Großteil der Chinolone gehört zur Untergruppe der Fluorchinolone, bei denen sich eine Fluorgruppe am zentralen Ring an der Position 6 befindet. Diese Fluorchinolone gehören zur sogenannten zweiten Generation von Chinolonen. Einige dieser Antibiotika sind in der Veterinärmedizin bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassen. Fluorchinolone weisen eine sehr hohe Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von bakteriellen Erregern auf und werden in der Veterinärmedizin besonders häufig bei Rindern, Schweinen und Hühnern angewendet. Der Einsatz von Fluorchinolonen hat in den vergangenen Jahren zugenommen, da die Chinolone in großen Mengen eingesetzt wurden, um auch Infektionskrankheiten, besonders in der Hühner-, Schweine- und Fisch- bzw. Shrimpszucht, zu verhindern.

Der umfangreiche Einsatz hat zur Bildung von Resistenzen geführt. Deshalb gelten in der Europäischen Union für einige Stoffe dieser Gruppe Rückstandshöchstmengen (Maximum Residue Limits, MRL) wie in der COMMISSION REGULATION (EU) No. 37/2010 beschrieben.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Chinolone-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Ciprofloxacin (Konjugat) und anti-Chinolone-Antikörper. Freies Chinolon und enzymmarkiertes

Ciprofloxacin konkurrieren um die Chinolon-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Chinolon-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Ciprofloxacin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das gebundene Enzym wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Chinolon-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 48 Doppelbestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig	96 Kavitäten
Standard 1 Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/l 1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,5 µg/l 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	1,5 µg/l 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	3 µg/l 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	6 µg/l 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	18 µg/l 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig	6 ml
Antibody Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig	6 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig	10 ml
Stop solution Stopp Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig	14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Über-Kopf-Schüttler oder Vortex
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien

- Methanol
- Shrimps-Extraktionspuffer: Methanol/Wasser (70:30, v/v) 1:2 (1+1) mit Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) verdünnen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

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

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich gereinigt bzw. entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Ei

- Probe homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Probe mit 9 ml Methanol/Wasser (35/65, v/v) versetzen
- 10 min kräftig schütteln (Über-Kopf-Schüttler oder Vortex)
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl Überstand im Test einsetzen

9.2. Fleisch (Rind, Schwein, Schaf, Huhn, Pute) und Fisch

- Probe homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Probe mit 4 ml Methanol/Wasser (70/30, v/v) versetzen
- 10 min kräftig schütteln (Über-Kopf-Schüttler oder Vortex)
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand 1:2 (1+1) mit Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) verdünnen
- 50 µl im Test einsetzen

9.3. Shrimps

- Probe homogenisieren
- 1 g der homogenisierten Probe mit 4 ml Shrimps-Extraktionspuffer (siehe Kapitel 5.2.) versetzen
- 10 min kräftig schütteln (Über-Kopf-Schüttler oder Vortex)
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl Überstand 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, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe Kapitel 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 L destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist bei 2 - 8 °C ca. 4 - 6 Wochen haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach 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 (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser).

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

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. Für jeden Standard bzw. jede Probe eine neue Pipettenspitze benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat (roter Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper (schwarzer Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h im Kühlschrank bei 2 - 8 °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 250 µl Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.

7. Je 100 µl Stopp Lösung (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET** (Z9996FF), erhältlich. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die Ciprofloxacin-Konzentration [µg/kg] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Chinolon-Konzentration in µg/kg (ppb) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Ei.....	10
Fleisch, Fisch	10
Shrimps.....	5

13. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- Chinolon-freie und chinolon-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2008-05-20	Freigabeversion
2015-08-21	Generelle Überarbeitung
2021-02-15	Generelle Überarbeitung Korrektur in „Produktangebot“ Neu: Kapitel 13. Empfehlung Versionsübersicht Symbolerklärung

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:

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

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones

Brief information

RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones (R3113) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of quinolones in egg, meat, fish and shrimp.

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for max. 48 duplicate determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Egg, shrimps: homogenization, extraction, centrifugation
Meat, fish: homogenization, extraction, centrifugation, dilution

Time requirement: Sample preparation (for 10 samples).... approx. 30 min
Test implementation (incubation time) 1 h 15 min

Limit of detection: Shrimps 6 µg/kg (ppb)
(corresponding to the standard substance) Fish..... 8 µg/kg
Egg 9 µg/kg
Meat..... 10 µg/kg

Recovery rate: 80 - 110 %
(corresponding to the Standard substance) Further information is contained in the validation report.

Specificity: Ciprofloxacin (standard substance).....100 %
Norfloxacin, Enrofloxacin,
Marbofloxacin, Danofloxacin,
Difloxacin, Flumequine, Ofloxacin> 100 %
Sarafloxacin43 %
Oxolinic acid24 %

The specificity of the RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones 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 manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA analyses with them. The manual can be retrieved, printed and downloaded from www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDA® Ciprofloxacin Spiking Solution (R3198)

1. Intended use

RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of quinolones in egg, meat (beef, pork, sheep, chicken, turkey), fish and shrimps.

2. General information

Gyrase inhibitors are divided into four subgroups. The majority of quinolones belong to the subgroup of fluoroquinolones, which have a fluoro-group attached at the central ring system, typically at the 6th position. The fluoroquinolones belong to the so called second generation quinolones. Some of these are admitted as antibiotics in veterinary medicine for food producing animals. Fluoroquinolones are broad spectrum antibiotics against a lot of bacterial species. They are used frequently in veterinary medicine especially for cattle, pigs and chicken. The usage of fluoroquinolone has increased in the past years because large amounts of fluoroquinolones were applied to prevent infectious diseases, especially in chicken, swine and fish/shrimp farming.

The wide use in food producing animals has generated microbial resistances. Therefore, in the European Union, maximum residue limits (MRL) apply to some substances of this group, as described in COMMISSION REGULATION (EU) No. 37/2010.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-quinolone antibodies. Standards or sample solution, ciprofloxacin enzyme conjugate and anti-quinolone antibodies are added. Free quinolones and ciprofloxacin conjugate compete for the quinolone antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-quinolone antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/Chromogen is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue end 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 quinolone concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for max. 48 duplicate 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 µg/l 1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	0.5 µg/l 1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	1.5 µg/l 1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	3 µg/l 1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	6 µg/l 1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	18 µg/l 1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for Dissolving	
Conjugate	Red	Ready to use	6 ml
Antibody	Black	Ready to use	6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 ml

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Centrifuge
- Up-side-down shaker or vortex
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2 Reagents

- Methanol
- Shrimp extraction buffer: dilute methanol/water (70:30, v/v) 1:2 (1+1) with wash buffer (see chapter 10.1.)

6. Warnings and precautions for the users

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

This kit may contain hazardous substances. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.de.

Ensure the proper and responsible cleanup and / or disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Storage instructions

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

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

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

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to addition in the wells
- Extinction less than 0.6 ($E_{450\text{ nm}} < 0.6$) for standard 1

9. Sample preparation

Working devices such as a mill, glass vials or spatulas must be cleaned before.

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

9.1. Egg

- Homogenize the sample
- Use 1 g of the homogenized sample and add 9 ml methanol/water (35/65, v/v)
- Mix vigorously for 10 min (with up-side-down shaker or vortex)
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the test

9.2. Meat (beef, pork, sheep, chicken, turkey) and fish

- Homogenize the sample
- Use 1 g of the homogenized sample and add 4 ml methanol/water (70/30, v/v)
- Mix vigorously for 10 min (with up-side-down shaker or vortex)
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Dilute the supernatant 1:2 (1+1) with wash buffer (see chapter 10.1.)
- Use 50 µl per well in the test

9.3. Shrimp

- Homogenize the sample
- Use 1 g of the homogenized sample and add 4 ml shrimp extraction buffer (see chapter 5.2.)
- Mix vigorously for 10 min (with up-side-down shaker or vortex)
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 µl of the supernatant per well in the test

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

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

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer (e.g. 100 ml concentrate + 900 ml distilled water).

Unused reagents should be immediately stored at 2 - 8 °C.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow wells to dry between work steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for 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. Use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of the conjugate (red cap) to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of the antibody (black cap) to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h in a refrigerator (2 - 8 °C / 35 - 46 °F).
5. 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 wash buffer (see chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

7. Add 100 µl of the stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET** (Z9996FF), is optionally available for evaluating RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 semi-logarithmic plot against the quinolone concentration [µg/kg].

12. Result interpretation

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

Egg	10
Meat, fish	10
Shrimp	5

13. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To analyze each sample material in duplicates
- To use also quinolone-free and quinolone containing (spiked) samples as test controls
- To perform spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure

Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2008-05-20	Release version
2015-08-21	General revision
2021-02-15	General revision Correction in “Related products” NEW: Chapter 13. Recommendation, Version overview, Explanation of symbols

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321