

RIDASCREEN[®] Nitrofurantoin AHD

Art. No. R3713

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von AHD

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of AHD

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 (AHD) (Art. Nr.: R3713) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von AHD in Shrimps und Fisch.

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

Zeitbedarf: Probenvorbereitung für 10 Proben
Probenvorbereitung Teil 1..... ca. 1,5 h
Inkubation..... 3 h
Probenvorbereitung Teil 2..... ca. 1,5 h
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1 h 15 min

Nachweisgrenze: Shrimps ca. 200 ng/kg (ppt)
(bezogen auf die Fisch..... ca. 76 ng/kg (ppt)
Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: Shrimps ca. 94 %
(bezogen auf die Fisch..... ca. 82 %
Standardsubstanz)

Die Spezifität des RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) 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.

Spezifität: Nitrophenyl- (NP) AHD (Standardsubstanz)..... 100 %
NP-AMOZ, NP-AOZ, NP-SEM..... < 1 %
Nitrofurantoin ca. 32 %
Furaltadon, Furazolidon, Nitrofurazon..... < 2 %
AHD, AMOZ, AOZ, SEM..... < 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® Nitrofurantoin (AMOZ).....	(R3711)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ)	(R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM)	(R3715)
RIDASCREEN® Chloramphenicol.....	(R1505)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Dotierlösung	(R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Dotierlösung.....	(R3799)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Dotierlösung.....	(R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Dotierlösung	(R3797)
RIDA® Chloramphenicol Dotierlösung	(R1599)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nitrofurantoin Metaboliten AHD in Shrimp und Fisch.

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 Shrimp-, 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 Nitrofurantoin bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Die Behandlung von Nutztieren mit den Nitrofurantoin-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. Vor der Analyse müssen die Metabolite mittels Inkubation mit 2-Nitrobenzaldehyd (2NBA) in Nitrophenyl- (NP) AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ und NP-SEM derivatisiert werden.

Muttersubstanz	Metabolit	nach Derivatisierung	
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD	NP-AHD
Furaltadon	3-Amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidinon	AMOZ	NP-AMOZ
Furazolidon	3-Amino-2-oxazolidinon	AOZ	NP-AOZ
Nitrofurazon	Semicarbazid	SEM	NP-SEM

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-AHD-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes AHD (Konjugat) und anti-AHD-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes AHD konkurrieren um die AHD-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-AHD-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes AHD wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das 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 AHD-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
2-Nitrobenzandehyd 2-Nitrobenzaldehyde	-	Feststoff		100 mg
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 ng/l	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	100 ng/l	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	300 ng/l	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	900 ng/l	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	2700 ng/l	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	8100 ng/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween	-	Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Antibody Antikörper	schwarz	Konzentrat	11x	0,7 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
- Schüttler (Vortex)
- Mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- Evaporator
- Magnetrührer
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0,1 M K₂HPO₄
- Ethylacetat
- n-Hexan
- Dimethylsulfoxid (DMSO)

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 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.

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

- Proben kühl und lichtgeschützt lagern
- Probe mit einem Mixer oder Pürierstab homogenisieren
- 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (siehe 4.) in Dimethylsulfoxid (DMSO) ansetzen (die Lösung muss jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt werden, z.B. 7,6 mg 2-Nitrobenzaldehyd in 5 ml DMSO lösen)

9.1 Shrimps

- 1 g homogenisierte Probe mit 4 ml demineralisiertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 100 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Derivatisieren wie unter 9.3 beschrieben

9.2. Fisch

- 1 g homogenisierte Probe mit 3,9 ml demineralisiertem Wasser, 0,5 ml 1 M HCl und 200 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyd (in DMSO) kräftig mischen
- Derivatisieren wie unter 9.3 beschrieben

9.3 Derivatisierung

- bei 50 °C für 3 Stunden inkubieren
- 5 ml 0,1 M K_2HPO_4 , 0,4 ml 1 M NaOH und 5 ml Ethylacetat zugeben, 30 s kräftig schütteln
- optional: Probe bis max. 50 °C zur besseren Phasentrennung erwärmen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 2,5 ml der Ethylacetatphase (obere Phase) in ein frisches Gefäß überführen und evaporieren
- den Rückstand in 1 ml n-Hexan lösen und mit 1 ml Probenpuffer (siehe 10.1.) gründlich mischen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- von der unteren, wässrigen Phase 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Die **anti-AHD-Antikörper** liegen als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Antikörperlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Antikörper-Konzentrat mit Waschpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Antikörper-Konzentrat vor Entnahme gut mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Waschpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Das **AHD-Konjugat** liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Waschpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Waschpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Waschpuffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Wasch-, Proben-, Antikörper- und Konjugatpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt. Benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l demineralisiertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml demineralisiertem Wasser lösen um ein 10fach Konzentrat herzustellen. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen das 10fach-Konzentrat 1:10 (1+9) mit demineralisiertem Wasser verdünnen. Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

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 verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl verdünnten Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °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 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Red Chromogen Pro 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 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 eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten 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 Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die AHD-Konzentration [ng/l] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche AHD-Konzentration in ng/kg 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 (AHD)

Brief information

RIDASCREEN[®] Nitrofuran (AHD) (Art. No.: R3713) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of AHD in shrimp and fish.

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 and defatting
Time requirement:	sample preparation for 10 samples sample preparation part 1..... approx. 1.5 h incubation..... 3 h sample preparation part 2 approx. 1.5 h test implementation (incubation time)..... 1 h 15 min
Detection limit: (corresponding to the standard substance)	Shrimp approx. 200 ng/kg (ppt) Fish..... approx. 76 ng/kg (ppt)
Recovery rate: (corresponding to the standard substance)	Shrimp 94 % Fish..... 82 %

The specificity of the RIDASCREEN[®] Nitrofuran (AHD) 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.

Specificity:	Nitrophenyl- (NP) AHD..... 100 % NP-AMOZ, NP-AOZ, NP-SEM < 1 % Nitrofurantoin approx. 32 % Furaltadone, Furazolidone, Nitrofurazone < 2 % AHD, AMOZ, AOZ, SEM < 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® Nitrofurantoin (AOZ)	(R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ).....	(R3711)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM)	(R3715)
RIDASCREEN® Chloramphenicol	(R1505)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Spiking Solution	(R3799)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution	(R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution	(R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution.....	(R3797)
RIDA® Chloramphenicol Dotierlösung	(R1599)

1. Intended use

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of the nitrofurantoin metabolite AHD in shrimp and fish.

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 Shrimp, 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. Prior to analysis, the metabolites have to be derivatized by incubation with 2-Nitrobenzaldehyde (2NBA) into Nitrophenyl-(NP) AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ and NP-SEM.

parent compound	metabolite		after derivatization
Nitrofurantoin	1-Aminohydantoin	AHD	NP-AHD
Furaltadon	3-Amino-5-morpholino methyl-2-oxazolidinon	AMOZ	NP-AMOZ
Furazolidon	3-Amino-2-oxazolidinon	AOZ	NP-AOZ
Nitrofurazon	Semicarbazide	SEM	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-AHD antibodies. AHD standards or sample solutions, AHD conjugate and anti-AHD antibodies are added. Free AHD and AHD conjugate compete for the anti-AHD antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-AHD 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 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 AHD concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap Colour	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
2-Nitrobenzandehyd	-	solid		100 mg
Standard 1	White	Ready to use	0 ng/l	1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	100 ng/l	1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	300 ng/l	1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	900 ng/l	1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	2700 ng/l	1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	8100 ng/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween	-	Salt for dissolving		
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Antibody	Black	Concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge
- shaker (Vortex)
- mixer (Stomacher, Ultraturrax)
- rotary evaporator
- magnetic stirrer
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 0.1 M K₂HPO₄
- ethyl acetate
- n-hexane
- Dimethylsulfoxide (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 (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.

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

8. Indication of instability or 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 standard 1

9. Preparation of Samples

- store the samples in a cool place, protected against light
- homogenize the sample completely, use stomacher or mixer
- prepare 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde (see 4.) in Dimethylsulfoxide (DMSO)
(this solution has to be prepared directly before use, i.e. dissolve 7.6 mg 2-Nitrobenzaldehyde in 5 ml DMSO)

–9.1. Shrimp

- mix 1 g of the homogenized sample with 4 ml demineralized water, 0.5 ml 1 M HCl and 100 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- derivatize as described under 9.3

–9.2. Fish

- mix 1 g of the homogenized sample with 3.9 ml demineralized water, 0.5 ml 1 M HCl and 200 µl 10 mM 2-Nitrobenzaldehyde (in DMSO) by shaking vigorously
- derivatize as described under 9.3

9.3. Derivatization

- incubate at 50 °C (122 °F) for 3 hours
- add 5 ml 0.1 M K₂HPO₄, 0.4 ml 1 M NaOH and 5 ml ethyl acetate, shake vigorously for 30 s
- optional: sample incubation up to 50 °C (122 °F) can be used for better phase separation
- centrifuge: 10 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 2.5 ml of the ethyl acetate layer (upper layer) into a new vial and evaporate
- dissolve the residue in 1 ml n-hexane and mix properly with 1 ml sample buffer (see 10.1.)
- centrifuge: 10 min / 3000 g / 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. Test preparation

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

The **anti-AHD antibody** is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody concentrate should be shaken thoroughly. For reconstitution, the antibody concentrate is diluted 1:11 (1+10) in wash buffer (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml wash buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

The **AHD conjugate** is provided as a concentrate. Since the diluted conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in wash buffer (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml wash buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

A PBS-Tween buffer is needed as **wash, sample, antibody and conjugate buffer**, please use the wash buffer salt (pouch) contained in the kit (see 4.). Dissolve the total content of the pouch in one liter of demineralized water. The ready to use wash 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 demineralized water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. Dilute the 10fold concentrated wash buffer 1:10 (1+9) with demineralized water to obtain the ready to use wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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. Use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 μl of the diluted conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 μl of the diluted antibody to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °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 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 μl of Red Chromogen Pro 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 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 / 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:

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

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 system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the AHD concentration [ng/l].

In order to obtain the AHD 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 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

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321