

RIDASCREEN[®] Streptomycin

Art. No. R3104

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Streptomycin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of streptomycin

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® Streptomycin (Art. Nr.: R3104) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Streptomycin in Milch und Milchpulver, Honig, Fleisch, Leber, Niere, Shrimps und Apfelsaft.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung: Milch: Verdünnung
Milchpulver: Rekonstitution, Verdünnung
Honig: Extraktion, chromatographische Reinigung mit RIDA® C18 column, Evaporation, Rekonstitution
Fleisch, Leber, Niere, Shrimps: Homogenisierung, Extraktion, Verdünnung
Apfelsaft: Zentrifugation, Verdünnung

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Milch..... ca. 5 min
Milchpulver..... ca. 30 min
Honig..... ca. 1,5 h
Fleisch, Leber, Niere, Shrimps ca. 45 min
Apfelsaft..... ca. 5 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

Nachweisgrenze: Milch..... ca. 5 µg/l (ppb)
(bezogen auf die Milch, aus Milchpulver rekonstituiert ca. 3 µg/l (ppb)
Standardsubstanz) Honig..... ca. 2 µg/kg (ppb)
Rind-/Schweinefleisch ca. 22 µg/kg (ppb)
Geflügel..... ca. 28 µg/kg (ppb)
Leber..... ca. 23 µg/kg (ppb)
Niere ca. 18 µg/kg (ppb)
Shrimps..... ca. 20 µg/kg (ppb)
Apfelsaft..... ca. 4 µg/l (ppb)

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 110 %
(bezogen auf die	Milchpulver.....	ca. 107 %
Standardsubstanz)	Honig.....	ca. 87 %
	Rind-/Schweinefleisch	ca. 89 %
	Geflügel.....	ca. 95 %
	Leber.....	ca. 90 %
	Niere	ca. 81 %
	Shrimps.....	ca. 76 %
	Apfelsaft.....	ca. 93 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Streptomycin 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:	Streptomycin (Standardsubstanz).....	100 %
	Dihydrostreptomycin	ca. 69 %
	Gentamicin, Neomycin, Spectinomycin, Kanamycin	< 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

RIDA® Streptomycin Dotierlösung.....(R3199)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Streptomycin (Art. Nr.: R3104) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Streptomycin in Milch und Milchpulver, Honig, Fleisch, Leber, Niere, Shrimps und Apfelsaft.

2. Allgemeines

Streptomycin gehört neben Penicillin zu den in der Veterinärmedizin im Rahmen der Mastitistherapie am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Bei Nichteinhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit sowie bei unsachgemäßer Anwendung können Streptomycinrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs auftreten. In hohen Konzentrationen wirkt Streptomycin oto- und nephrotoxisch. Im Zusammenhang mit Lebensmitteln sind jedoch die chronische Belastung mit niedrigen Konzentrationen und die damit verbundenen allergischen Reaktionen, die mögliche Schädigung der Darmflora sowie die Induzierung von Resistenzen bei pathogenen Mikroorganismen von größerer Bedeutung. Um gesundheitliche Risiken für den Konsumenten zu vermeiden und lebensmitteltechnologische Probleme zu verhindern, ist somit ein empfindliches und einfaches Verfahren zum Nachweis von Streptomycin nötig. In der EU-Verordnung sind die Höchstwerte für Streptomycin unter den Tierarzneimittelrückständen in Fleisch und Milch festgelegt: Muskel und Leber: 500 µg/kg, Nieren: 1000 µg/kg, Milch: 200 µg/l. In Honig wurde durch die EU-Referenzlaboratorien eine Nulltoleranz mit einer Mindestleistungsgrenze von $cc\beta = 40 \mu\text{g/kg}$ für Testsysteme festgelegt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Streptomycin-Antikörper beschichtet. Die Mikrotiterplatte ist bereits funktionalisiert mit anti-Streptomycin-Antikörpern, die an die immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden sind. Durch Zugabe von Standards bzw. Probe und enzymmarkiertem Streptomycin (Konjugat) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Streptomycin um die Streptomycin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Streptomycin 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 Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Streptomycin-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
Sample buffer Probenpuffer	weiß	gebrauchsfertig		50 ml
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	4,5 µg/l	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	13,5 µg/l	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	40,5 µg/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	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:

Gerät	Milch (-pulver)	Honig	Fleisch, Leber Niere, Shrimps	Apfelsaft
Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)	•	•	•	•
Messpipetten	•	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•	•
Zentrifuge		•	•	
Vortex	•	•	•	•
Schüttler		•	•	
Mixer			•	
Evaporator		•		

5.2. Reagenzien:

Reagenz	Honig
Extraktionspuffer	•
PBS-Puffer	•
100 % (v/v) Methanol	•
RIDA® C18 column (Art. Nr. R2002)	•

– Extraktionspuffer:

50 mM Heptansulfonsäure mit 25 mM Trinatriumphosphat, pH 2,0:

2 g Heptansulfonsäure (Na-Salz) + 1,9 g Trinatriumphosphat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) einwiegen und mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen; mit o-Phosphorsäure auf pH 2,0 einstellen

– PBS-Puffer:

0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

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 (E450 nm < 0,6) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl lagern.

9.1. Milch (Roh-, Frisch-, H-, Voll- und fettarm) und (Mager-) Milchpulver

- Milchpulver entsprechend den Herstellerangaben rekonstituieren
- Milch 1:10 (1+9) mit Probenpuffer verdünnen
- (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Honig

- Methanol/Wasser-Mischungen (siehe 5.2.) für die Konditionierung der C18 Säule 1 h vor Gebrauch ansetzen und vor dem Einsatz entstandene Luftblasen durch vortexen entfernen
- 1 g Honig in ein Gefäß einwiegen und mit Extraktionspuffer (siehe 5.2.) auf 10 ml auffüllen
- schütteln bis der Honig vollständig gelöst ist
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
(nach der Zentrifugation muss der Überstand klar sein)

Den Überstand mittels RIDA[®] C18 column reinigen (Flussrate: 1 Tropfen/s):

- zur Konditionierung die RIDA[®] C18 Säule mit 2 ml 100 % Methanol und dann mit 2 ml destilliertem Wasser waschen
- nach der Säulenkonditionierung 5 ml Überstand auftragen und langsam durch die Säule drücken (ca. 15 Topfen/min)
- Säule anschließend mit 3 ml destilliertem Wasser waschen
- Restflüssigkeit aus der Säule mit einem 2 minütigen Luft- oder Stickstoffstrom entfernen
- Probe langsam mit 1 ml 100 % Methanol eluieren (ca. 15 Topfen/min)
- Eluat bei 60 °C unter einem möglichst schwachem Luft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 2 ml PBS-Puffer (siehe 5.2.) aufnehmen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3 Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel), Leber, Niere (Rind, Schwein) und Shrimps

- Probe vollständig homogenisieren (Stomacher, Mixer oder Ultraturrax)
- 20 ml Waschpuffer zu 5 g homogenisierter Probe geben und 10 s vortexen
- 30 min schütteln
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand 1:10 (1+9) mit Waschpuffer verdünnen
(z.B. 50 µl Überstand + 450 µl Waschpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4 Apfelsaft

- Apfelsaft 1:10 (1+9) mit Probenpuffer verdünnen
(z. B. 50 µl Apfelsaft + 450 µl Probenpuffer)
- 50 µl 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, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ca. 4 - 6 Wochen ist bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat).
Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.
Das 10fach Konzentrat 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.
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. Je 100 µl Substrat/Chromogenlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 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.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 Streptomycin-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Streptomycin-Konzentration in $\mu\text{g/l}$ bzw. $\mu\text{g/kg}$ zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt folgender Verdünnungsfaktor:

Milch	10
Milch, aus Milchpulver rekonstituiert.....	10
Honig	4
Fleisch, Leber, Niere, Shrimps	50
Apfelsaft.....	10

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[®] Streptomycin

Brief information

RIDASCREEN[®] Streptomycin (Art. No.: R3104) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of streptomycin in milk and milk powder, honey, meat, liver, kidney, shrimp and apple juice.

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: milk: dilution
 milk powder: reconstitution, dilution
 honey: extraction, chromatographic clean-up with RIDA[®] C18 column, evaporation, reconstitution
 meat, liver, kidney, shrimp: homogenization, extraction, dilution
 apple juice: centrifugation, dilution

Time requirement: sample preparation for 10 samples

 milk.....approx. 5 min
 milk powder.....approx. 30 min
 honey approx. 1.5 h
 meat, liver, kidney, shrimp.....approx. 45 min
 apple juice.....approx. 5 min
 Test implementation (incubation time)45 min

Limit of Detection
(corresponding to the standard substance)

 milk.....approx. 5 µg/l (ppb)
 milk, reconstituted from milk powderapprox. 3 µg/l (ppb)
 honeyapprox. 2 µg/kg (ppb)
 beef, porkapprox. 22 µg/kg (ppb)
 poultryapprox. 28 µg/kg (ppb)
 liverapprox. 23 µg/kg (ppb)
 kidney.....approx. 18 µg/kg (ppb)
 shrimpapprox. 20 µg/kg (ppb)
 apple juice.....approx. 4 µg/l (ppb)

Recovery rate:	milk.....	approx. 110 %
(corresponding to the	milk powder.....	approx. 107 %
standard substance)	honey	approx. 87 %
	beef/pork	approx. 89 %
	poultry	approx. 95 %
	liver	approx. 90 %
	kidney.....	approx. 81 %
	shrimp	approx. 76 %
	apple juice.....	approx. 93 %

The specificity of the RIDASCREEN® Streptomycin 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:	streptomycin (standard substance)	100 %
	dihydrostreptomycin.....	approx. 69 %
	gentamicin, neomycin	
	spectinomycin, kanamycin.....	< 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

RIDA® Streptomycin Spiking Solution(R3199)

1. Intended use

RIDASCREEN® Streptomycin (Art. No.: R3104) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of streptomycin in milk and milk powder, honey, meat, liver, kidney, shrimp and apple juice.

2. General

Next to the β -lactam antibiotics in veterinary medicine streptomycin is one of the mostly used antibiotics for the treatment of mastitis. Residues of streptomycin may therefore occur in food of animal origin, if the withholding period is not obeyed or if it is used improperly. High concentrations of streptomycin show ototoxic and nephrotoxic effects. The chronic exposure of humans with low concentrations, as found in food, may cause allergies, impair the intestinal flora and induce resistance of pathogenic microorganisms. To protect the consumer against health risks and avoid food-technological problems, a sensitive and simple method for the detection of streptomycin is necessary. The EU-regulations for streptomycin are fixed in MRLs (maximum residue limits) for meat and milk (muscle and liver: 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kidney: 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and milk: 200 $\mu\text{g}/\text{l}$). In honey, the EU Community Reference Laboratories have determined a zero-tolerance with a minimum required performance limit of $\text{cc}\beta = 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ for test systems.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-streptomycin antibodies. The microtiter plate is already functionalized with anti-streptomycin antibodies, which are bound by the immobilized capture antibodies. Standards or sample and streptomycin conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated streptomycin compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. 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 streptomycin 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
Sample buffer	White	Ready to use		50 ml
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	4.5 µg/l	1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	13.5 µg/l	1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	40.5 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	Red	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. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

equipment	milk (powder)	honey	meat, liver kidney, shrimp	applejuice
microtiter plate				
spectrophotometer (450 nm)	•	•	•	•
graduated pipettes	•	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes	•	•	•	•
vortex	•	•	•	•
centrifuge		•	•	
shaker		•	•	
mixer (stomacher, ultraturrax)			•	
evaporator		•		

5.2. Reagents:

component	honey
extraction buffer	•
PBS-buffer	•
100 % (v/v) methanol	•
RIDA® C18 column (Art. No. R2002)	•

–extraction buffer:

50 mM heptane-sulfonic acid with 25 mM trisodiumphosphate, pH 2.0:
2.0 g heptane-sulfonic acid (sodium-salt) + 1.9 g trisodiumphosphate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$); fill up to 200 ml with distilled water, adjust with o-phosphoric acid to pH 2.0

–PBS-buffer:

0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl; fill up to 1000 ml with distilled water

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 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 solution 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

The samples should be stored in a cool place.

9.1. Milk (raw, fresh, pasteurized, full cream, skimmed) and (skimmed) milk powder

- reconstitute milk powder in accordance to the instructions of the manufacturer
- dilute milk 1:10 (1+9) with sample buffer
(e. g. 50 μ l milk + 450 μ l sample buffer)
- use 50 μ l per well in the assay

9.2. Honey

- prepare the methanol/ distilled water mixtures (see 5.2.) for the conditioning of C18 columns 1 h before use and remove air bubbles before use by vortexing
- weigh 1 g of honey into a vial and fill up to 10 ml with extraction buffer (see 5.2.)
- shake until the honey is dissolved completely
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
(after centrifugation, there has to be a clear supernatant)

Purify the extract with RIDA[®] C18 column (flow rate: 1 drop/s):

- for column conditioning, rinse the RIDA[®] C18 column first with 2 ml 100 % methanol and then with 2 ml of distilled water
- after column conditioning, apply 5 ml of the supernatant and press slowly through the column (approx. 15 drops/min)
- rinse the column with 3 ml of distilled water
- remove any excess fluid by flushing the cartridge with a stream of air or nitrogen for 2 min
- elute sample slowly with 1 ml 100 % methanol (approx. 15 drops/min)
- evaporate the eluate to complete dryness under an air or nitrogen stream at 60 °C
- reconstitute the dry residue in 2 ml PBS-buffer (see 5.2.)
- use 50 μ l per well in the assay

9.3. Meat (beef, pork, poultry), liver, kidney (porcine and bovine) and shrimp

- homogenize sample completely (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- mix 5 g of homogenized sample with 20 ml of wash buffer and vortex for 10 s
- shake for 30 min
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- dilute an aliquot of the supernatant 1:10 (1+9) with wash buffer (e. g. 50 µl supernatant + 450 µl wash buffer)
- use 50 µl per well in the assay

9.4 Apple juice

- dilute apple juice or supernatant from obtained not-from-concentrate apple juice 1:10 (1+9) with sample buffer (e. g. 50 µl apple juice + 450 µl sample buffer)
- use 50 µl per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**, please use the wash buffer salt contained in the kit (see 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.

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

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 conjugate to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 – 25 °C).
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 wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen 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 15 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software 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 streptomycin concentration [µg/l].

In order to obtain the streptomycin concentration in µg/l or µg/kg 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 factor is as follows:

milk,	10
milk, reconstituted from milk powder.....	10
honey	4
meat, liver, kidney, shrimp	50
apple juice	10

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