



# RIDASCREEN® Enro-/Ciprofloxacin

**REF R3111**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Enrofloxacin und Ciprofloxacin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of enrofloxacin und ciprofloxacin

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](mailto:orders@r-biopharm.de)

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

Marketing & Vertrieb  
E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

Marketing & sales  
E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN Enro-/Ciprofloxacin (R3111) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Enrofloxacin und dessen aktiven Metaboliten Ciprofloxacin in Milch (Rohmilch, Frischmilch, H-Milch) und Milchpulver (Magermilchpulver, Vollmilchpulver).

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: Milch: homogenisieren und direkt im Test einsetzen  
Milchpulver: lösen, homogenisieren und im Test anwenden

Zeitbedarf: Testdurchführung (Inkubationszeit) ..... 45 min

Nachweisgrenze: Frischmilch, H-Milch, Rohmilch, Milchpulver: 0,6 µg/l

Nachweisvermögen (CC $\beta$ ): Frischmilch, H-Milch, Rohmilch, Milchpulver: 0,8 µg/l

Wiederfindungsrate: Von Ciprofloxacin .....85 – 105 %  
Von 50 % Ciprofloxacin  
+ 50 % Enrofloxacin .....70 – 80 %

Spezifität: Ciprofloxacin .....100 %  
Enrofloxacin .....91 %  
Sarafloxacin .....17 %  
Danofloxacin .....15 %  
Norfloxacin .....15 %  
Difloxacin .....12 %  
Marbofloxacin.....12 %  
Ofloxacin, Flumequin, Oxolinic acid..... < 10 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Enro-/Ciprofloxacin 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 Werten 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](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## **Produktangebot**

RIDA® Ciprofloxacin Dotierlösung (Art. Nr. R3198)

### **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN® Enro-/Ciprofloxacin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Enrofloxacin und dessen aktiven Metaboliten Ciprofloxacin in Milch (Rohmilch, Frischmilch, H-Milch) und Milchpulver (Magermilchpulver, Vollmilchpulver).

### **2. Allgemeines**

Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht auf der Inhibition des für die bakterielle DNA-Synthese essenziellen Enzyms Gyrase. Daher weisen Fluorchinolone eine sehr hohe Wirksamkeit gegenüber den meisten gramnegativen und grampositiven Bakterien auf und werden in der Veterinärmedizin besonders häufig zur Behandlung von Rindern, Schweinen und Hühnern eingesetzt.

Der Einsatz von Fluorchinolonen hat in den vergangenen Jahren zugenommen, um die während der Tierzucht auftretenden Infektionskrankheiten zu verhindern. Insbesondere bei der Gruppe der Fluorchinolone wurde eine Assoziation zur Resistenzbildung vor allem bei *E. coli* festgestellt.

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. Ein in der Human- sowie Veterinärmedizin zugelassener Vertreter dieser Gruppe ist die Substanz Enrofloxacin (Metabolit: Ciprofloxacin). Die Rückstandshöchstmenge für die

Summe von Enrofloxacin und Ciprofloxacin in Milch (Rind, Schaf, Ziege) beträgt 100 µg/kg.

### **3. Testprinzip**

Grundlage des ELISA-Testsystems ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern und anti-Ciprofloxacin-Antikörpern beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und Enzymkonjugat. Freies Antigen (Enrofloxacin / Ciprofloxacin) und Enzymkonjugat konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. 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 Antigen-Konzentration (Enrofloxacin / Ciprofloxacin) in der Probe.

## 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Dilution buffer</b> Verdünnungspuffer	Transparent	Gebrauchsfertig		60 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,25 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	0,75 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	2,25 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	6,75 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	20,25 µg/l	1,3 ml
<b>Wash buffer salt</b> <b>Tween</b> Waschpuffer	-	Salz zum Auflösen		
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		7,5 ml
<b>Substrate/ Chromogen</b> Substrat/ Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1 Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Schüttler
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

### 5.2 Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 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](http://www.r-biopharm.de).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich 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 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1 Milch (Rohmilch, Frischmilch, H-Milch)

- 50 µl Probe pro Kavität direkt im Test einsetzen

### 9.2 Milchpulver (Magermilchpulver, Vollmilchpulver)

- Lösen des Milchpulvers 1:10 in VE- Wasser, z.B. 10 g Milchpulver + 90 ml VE-Wasser
- Schütteln / Vortexen bis Pulver vollständig gelöst ist
- 50 µl gelöstes Milchpulver 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. Packungsinhalt) 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.

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 benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards bzw. vorbereiteten Proben (siehe Abschnitt 9. Probenvorbereitung) als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen verwenden.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1. Testvorbereitungen) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Substrat/ Chromogen die 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 optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET** (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) entnommen werden.

### Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Konzentration in µg/l (µg/kg) 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:

Milch .....	1
Milchpulver (bezogen auf gelöstes Milchpulver) .....	1

## Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.

Proben, die außerhalb des Messbereichs mit  $> 20 \mu\text{g/l}$  gemessen werden, sollten 1:10 bis maximal 1:30 mit beiliegendem Probenverdünnungspuffer verdünnt werden.

## Weitere Applikationen

Eine Zusammenfassung der Leistungsdatenerhebung für den Automaten ThunderBolt® ist auf Anfrage erhältlich.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-09-15	Freigabeversion

## 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® Enro-/Ciprofloxacin

## Brief information

RIDASCREEN® Enro-/Ciprofloxacin (R3111) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in milk (raw milk, fresh milk and UHT milk) and milk powder (skim milk powder and whole milk powder).

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

Sample preparation:	Milk: homogenize and use directly in the test. Milk powder: dissolve, homogenize, and use in the test.
Time requirement:	Test procedure (incubation time)..... 45 min
Limit of detection:	Fresh milk, UHT milk, raw milk, milk powder: 0.6 µg/l
Detection capability (CC $\beta$ ):	Fresh milk, UHT milk, raw milk, milk powder: 0.8 µg/l
Recovery rate:	Of Ciprofloxacin..... 85 % - 105 % Of 50% Ciprofloxacin + 50% Enrofloxacin ..... 70 % - 80 %
Specificity:	Ciprofloxacin .....100 % Enrofloxacin .....91 % Sarafloxacin .....17 % Danofloxacin .....15 % Norfloxacin .....15 % Difloxacin .....12 % Marbofloxacin.....12 % Ofloxacin, Flumequine, Oxolinic acid..... < 10 %

The specificity of the RIDASCREEN® Enro-/Ciprofloxacin assay was determined by analyzing the cross-reactivity to the respective substances in the buffer system. In samples, the specificity may differ 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 rate in the relevant matrix. The test cannot distinguish 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. 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](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

## **Product offer**

RIDA® Ciprofloxacin Spiking Solution (Art. No. R3198)

### **1. Intended use**

RIDASCREEN Enro-/Ciprofloxacin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in milk (raw milk, fresh milk and UHT milk) and milk powder (skim milk powder and whole milk powder).

### **2. General**

The mechanism of action of fluoroquinolones is based on the inhibition of gyrase, an enzyme essential to bacterial DNA synthesis. Thus, fluoroquinolones have very high efficacy against most gram-negative and gram-positive bacteria and are widely used in veterinary medicine to treat cattle, pigs, and poultry.

The use of fluoroquinolones has increased in recent years to prevent infectious diseases from occurring during livestock production. Particularly in the group of fluoroquinolones, the development of resistance was found to be associated mostly with *E. coli*.

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. One representative of this group approved in human and veterinary medicine is enrofloxacin (metabolite: ciprofloxacin). The MRL for the sum of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk (cow, sheep, or goat) is 100 µg/kg.

### 3. Test principle

The ELISA test system is based on the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with capture antibodies and anti-ciprofloxacin antibodies. Standards, the sample solutions and enzyme conjugate are added. Free antigen (enrofloxacin/ciprofloxacin) and enzyme conjugate compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. For detection, substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue end product. Adding the stop solution causes a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm; the extinction is inversely proportional to the antigen concentration (enrofloxacin / ciprofloxacin) in the sample.

### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a maximum of 48 duplicate determinations (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Volume
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready-to-use	96 wells
<b>Dilution buffer</b>	Transparent	Ready-to-use	60 ml
<b>Standard 1</b>	White	Ready-to-use	0 µg/l 1.3 ml
<b>Standard 2</b>	White	Ready-to-use	0.25 µg/l 1.3 ml
<b>Standard 3</b>	White	Ready-to-use	0.75 µg/l 1.3 ml
<b>Standard 4</b>	White	Ready-to-use	2.25 µg/l 1.3 ml
<b>Standard 5</b>	White	Ready-to-use	6.75 µg/l 1.3 ml
<b>Standard 6</b>	White	Ready-to-use	20.25 µg/l 1.3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b>	-	Salt for dissolving	
<b>Conjugate</b>	Red	Ready-to-use	7.5 ml
<b>Substrate/ Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Brown	Ready-to-use	13 ml
<b>Stop solution</b>	Yellow	Ready-to-use	14 ml

## **5. Reagents required but not provided**

### 5.1 Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Shaker
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

### 5.2 Reagents

- Distilled or deionized 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 safety data sheets (SDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Ensure the proper and responsible 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 red-colored substrate/ chromogen is photosensitive, therefore, avoid direct exposure to 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 red-stained substrate/chromogen prior to test implementation
- A value of less than 0.8 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.8$ ) for standard 1.

## 9. Preparation of Samples

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

### 9.1 Milk (raw milk, fresh milk, UHT milk)

- Use 50 µl of the sample in each well directly in the test
- Dilution factor 1

### 9.2 Milk powder (skim milk powder, whole milk powder)

- Dissolve the milk powder 1:10 in demineralized water, e.g. 10 g milk powder + 90 ml demineralized water
- Shake / vortex until powder is completely dissolved
- Use 50 µl of dissolved milk powder per well in the test
- Dilution factor 1

## 10. Test implementation

### 10.1 Test preparation

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 enclosed buffer salt (see section 4. Reagents provided). To prepare the buffer, dissolve the entire contents of the pouch in 1 l distilled water. The dissolved wash buffer can be stored for approximately 4 to 6 weeks at 2 - 8 °C.

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml distilled water (10-fold concentrate). The solution can be stored for approximately 8 - 12 weeks at room temperature (20 - 25 °C). To prepare the ready-to-use solution, mix 1 part of the 10-fold concentrate with 9 parts of distilled water.

Return all reagents to 2 - 8 °C immediately after use.

## 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. Pipette 50 µl each of the standard and the samples (see section 9. Preparation of Samples) as duplicates into the respective wells. Use new pipette tips for each standard or sample.
3. Pipette 50 µl each of conjugate into the respective wells, mix carefully by shaking the plate per hand, and incubate for 30 minutes at room temperature (20 - 25 °C).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Wash each well using 250 µl diluted wash buffer (see 10.1 Test preparation). Repeat the washing step another two times.
5. Pipette 100 µl each of substrate/ chromogen into the wells. Mix carefully by hand and incubate in the dark for 15 minutes at room temperature (20 - 25 °C).
6. Pipette 100 µl stop solution into each well and mix carefully by hand. Measure the absorbance at 450 nm within 15 minutes after adding the stop solution.

## 11. Results

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET** (Art. No. Z9996FF), is optionally available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

### Interpretation of results

In order to obtain the enrofloxacin / ciprofloxacin concentration in µg/l (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 according to the instructions, the dilution factors are as follows:

Milk .....	1
Milk powder (referring to dissolved milk powder) .....	1

## Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To analyze each sample material in duplicates.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.

Samples measured outside the measuring range at  $> 20 \mu\text{g/l}$  should be diluted 1:10 up to maximal 1:30 with the enclosed sample dilution buffer.

## Further application notes

A summary of the performance data for the ThunderBolt<sup>®</sup> analyzer is available on request.

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

## Version overview

Version number	Chapter and title
2020-09-15	Release version

## 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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://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