

r-biopharm®



RIDASCREEN® Bacitracin

REF R2901

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Bacitracin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of bacitracin

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



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

Auftragsannahme

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

R-Biopharm AG switchboard

Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-mail: orders@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® Bacitracin (Art. Nr. R2901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Bacitracin in Milch, Fleisch, Eiern, Futtermitteln und Urin (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Milch: pH-Wert einstellen, Entfettung, Verdünnung
Fleisch, Eier, Futtermittel: Homogenisierung, Extraktion, Zentrifugation, Verdünnung
Urin: Verdünnung

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
Milch..... ca. 30 min
Fleisch..... ca. 45 min
Eier..... ca. 45 min
Futtermittel ca. 45 min
Urin ca. 15 min
Testdurchführung (Inkubationszeit) 1,5 h

Nachweisgrenze: Milch..... ca. 11 µg/kg (ppb)
(Matrix-abhängig) Fleisch..... ca. 9 µg/kg (ppb)
Eier..... ca. 11 µg/kg (ppb)
Futtermittel ca. 82 µg/kg (ppb)
Urin ca. 23 µg/kg (ppb)

Wiederfindung: Milch..... ca. 99 %
(bezogen auf die Fleisch..... ca. 122 %
Standardsubstanz) Eier..... ca. 110 %
Futtermittel ca. 87 %
Urin ca. 84 %

Spezifität:	Bacitracin Zinksalz (Summe von Bacitracin A, B und C)	100 %
	Virginiamycin.....	< 3 %
	Tylosin.....	< 2 %
	Spiramycin, Neomycin, Colistin	< 1 %

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Bacitracin 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Bacitracin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Bacitracin in Milch, Fleisch, Eiern, Futtermitteln und Urin.

2. Allgemeines

Bacitracin gehört zur Gruppe der Polypeptidantibiotika. Es wurde nach dem produzierenden *Bacillus*-Stamm und dem 7-jährigen Mädchen „Tracy“ benannt, aus deren offener Schienbeinfraktur der Stamm 1945 erstmals isoliert wurde. Bacitracin besteht aus einer Mischung unterschiedlicher Polypeptide, wobei Bacitracin A als Hauptkomponente die größte biologische Aktivität besitzt. Durch die Inhibition der Zellwandsynthese besitzt es eine bakterizide Breitbandwirkung gegen grampositive, als auch gegen gramnegative Bakterien.

Neben dem veterinärmedizinischen Einsatz kann Bacitracin in der Tierzucht auch als Wachstumsbeschleuniger eingesetzt werden. Dabei können Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs verbleiben und ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher darstellen. Der unsachgemäße Gebrauch von Antibiotika fördert zudem die Bildung von antibiotikaresistenten Keimen, welche eine zunehmende gesundheitliche Gefahr für die Bevölkerung darstellen. Bacitracin wurde daher durch die Verordnung 2821/98/EC aus der Liste der für die Tierernährung zugelassenen Zusatzstoffe (Richtlinie 70/524/EEG Anhang B) gestrichen. Zudem wurden Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln festgelegt (Verordnung 37/2010/EC).

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit anti-Bacitracin-Antikörpern beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzymmarkiertes Bacitracin (Konjugat). Freies und enzymmarkiertes Bacitracin konkurrieren um die Bacitracin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Bacitracin 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 Bacitracin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Sample buffer Probenpuffer	Weiß	Gebrauchsfertig		40 mL
Standard 1 Standard 1	Weiß	Gebrauchsfertig	0 µg/L	2 mL
Standard 2 Standard 2	Weiß	Gebrauchsfertig	0,625 µg/L	1 mL
Standard 3 Standard 3	Weiß	Gebrauchsfertig	1,25 µg/L	1 mL
Standard 4 Standard 4	Weiß	Gebrauchsfertig	2,5 µg/L	1 mL
Standard 5 Standard 5	Weiß	Gebrauchsfertig	5 µg/L	1 mL
Standard 6 Standard 6	Weiß	Gebrauchsfertig	10 µg/L	1 mL
Standard 7 Standard 7	Weiß	Gebrauchsfertig	20 µg/L	1 mL
Wash buffer Waschpuffer	Weiß	Konzentrat	20x	30 mL
Conjugate Konjugat	Rot	Konzentrat	100x	0,1 mL
Conjugate buffer Konjugat Puffer	Grün	Gebrauchsfertig		15 mL
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen	Braun	Gebrauchsfertig		12 mL
Stop Solution Stopp Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		15 mL

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

Gerät	Milch	Fleisch, Eier Futtermittel	Urin
Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)	•	•	•
Messpipetten	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•
pH-Meter	•		
Mixer		•	
Schüttler		•	
Vortex	•		
Zentrifuge	•	•	

5.2. Reagenzien:

Reagenz	Milch	Fleisch, Eier Futtermittel
0,1 M NaOH zur pH-Wert Einstellung	•	
80 % (v/v) Methanol in Probenpuffer		•

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards sind gesundheitsschädlich, sie enthalten Methanol. Daher sollte unter dem Abzug gearbeitet werden und Hautkontakt vermieden werden (Handschuhe tragen). Vorsicht ist geboten.

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.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, siehe Kapitel 10.2. Testdurchführung) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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 Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Milch

- pH mit 0,1 M NaOH auf $7 \pm 0,5$ einstellen
- Zentrifugieren: 5 min / 2000 g / 4 °C
- Fettschicht entfernen
- Entfettete Milch 1:10 (1+9) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen (z. B. 20 µl entfettete Milch + 180 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Fleisch, Eier und Futtermittel

- Probe vollständig homogenisieren
- 2 ml 80 % Methanol in Probenpuffer zu 1 g homogenisierte Probe geben
- Schütteln: 15 min / über Kopf
- Zentrifugieren: 10 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
 - Fleisch und Eier: Überstand 1:5 (1+4) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen
(z. B. 40 µl Überstand + 160 µl Probenpuffer)
 - Futtermittel: Überstand 1:20 (1+19) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen (z. B. 10 µl Überstand + 190 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Urin

- Urin 1:25 (1+24) in Probenpuffer verdünnen (z. B. 20 µl Urin + 480 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Eventuell vorhandene Präzipitate in den Konzentraten vor Verdünnung durch Schütteln bei Raumtemperatur auflösen.

Das **Waschpufferkonzentrat** 1:20 (1+19) mit demineralisiertem Wasser verdünnen (z. B. 2 ml Konzentrat + 38 ml demineralisiertes Wasser, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen). Der endverdünnte Waschpuffer kann bei 2 - 8 °C bis zum Ablauf des Verfallsdatums des Konzentrats gelagert werden.

Das **Bacitracin-Konjugat** liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Konjugat - Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat - Konzentrat vor der Entnahme zentrifugieren (1 min / 1000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)). Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:100 (1+99) mit Konjugat Puffer verdünnt werden (z. B. 20 µl Konzentrat + 1980 µl Konjugat Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

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.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Mehrkanal- oder einer Multistep-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

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 und je 50 µl verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Platte 1 h bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 300 µl Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. Je 100 µl Stopp - Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm sofort 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 Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) 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 halblogarithmisch gegen die Bacitracin-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Bacitracin-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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:

Milch.....	10
Fleisch, Eier.....	15
Futtermittel	40
Urin.....	25

13. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird außerdem empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.

14. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.






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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-02-07	Freigabeversion
2014-11-04	Generelle Überarbeitung Verbesserte Haltbarkeit des endverdünnten Waschpuffers
2015-07-31	Generelle Überarbeitung Berücksichtigung aktualisierter Etikettenbezeichnungen
2015-09-04	Generelle Überarbeitung
2023-05-24	Aktuelle Version Generelle Überarbeitung Vorgenommene Änderungen: – Kurzinformation: Präzisierung der Spezifität hinsichtlich Standardsubstanz

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® Bacitracin

Brief information

RIDASCREEN® Bacitracin (Art. No. R2901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of bacitracin in milk, meat, eggs, feed and urine (see chapter 1. Intended use).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: milk: pH adjustment, defatting, dilution
 meat, eggs and feed: homogenization, extraction,
 centrifugation, dilution
 urine: dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)
 milk..... approx. 30 min
 meat..... approx. 45 min
 eggs approx. 45 min
 feed approx. 45 min
 urine approx. 15 min
 test implementation (incubation time) 1.5 h

Limit of detection: milk..... approx. 11 µg/kg (ppb)
(depending on matrix) meat..... approx. 9 µg/kg (ppb)
 eggs approx. 11 µg/kg (ppb)
 feed approx. 82 µg/kg (ppb)
 urine approx. 23 µg/kg (ppb)

Recovery rate: milk..... approx. 99 %
(corresponding to the meat..... approx. 122 %
standard substance) eggs approx. 110 %
 feed approx. 87 %
 urine approx. 84 %

Specificity:	Bacitracin zinc salt (sum of bacitracin A, bacitracin B, and bacitracin C).....	100 %
	Virginiamycin.....	< 3 %
	Tylosin	< 2 %
	Spiramycin, Neomycin, Colistin	< 1 %

Further information is contained in the validation report.

The specificity of the RIDASCREEN® Bacitracin 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 brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

1. Intended use

RIDASCREEN® Bacitracin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of bacitracin in milk, meat, eggs, feed and urine.

2. General information

Bacitracin belongs to the group of polypeptide antibiotics. It was named after the *Bacillus* strain producing it and the 7 year old girl 'Tracy' from whose open tibial fracture the strain was isolated in 1945 for the first time. Bacitracin is a mixture of different polypeptides, wherein bacitracin A as major component has the highest biological activity. Through inhibition of cell wall synthesis, it has a broad spectrum bactericidal effect against both gram-positive and gram-negative bacteria.

In addition to veterinary application, bacitracin can be used as antimicrobial growth promoter in animal husbandry. Thereby, residues can remain in foodstuff of animal origin and may pose a health risk to consumers. Improper

use of antibiotics also promotes the formation of antibiotic resistant bacteria, which raise an increasing health problem for the population. Consequently, Bacitracin has been deleted by the regulation 2821/98/EC from the list of approved animal feed additives (Directive 70/524/EEG Appendix B) and maximum residue limits in foodstuffs have been set (Regulation 37/2010/EC).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with antibodies directed against bacitracin. Bacitracin standards or sample and bacitracin conjugate are added. Free bacitracin and bacitracin conjugate compete for the bacitracin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, 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 bacitracin concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Sample buffer	White	Ready to use		40 mL
Standard 1	White	Ready to use	0 µg/L	2 mL
Standard 2	White	Ready to use	0.625 µg/L	1 mL
Standard 3	White	Ready to use	1.25 µg/L	1 mL
Standard 4	White	Ready to use	2.5 µg/L	1 mL
Standard 5	White	Ready to use	5 µg/L	1 mL
Standard 6	White	Ready to use	10 µg/L	1 mL
Standard 7	White	Ready to use	20 µg/L	1 mL
Wash buffer	White	Concentrate	20x	30 mL
Conjugate	Red	Concentrate	100x	0.1 mL
Conjugate buffer	Green	Ready to use		15 mL
Substrate/Chromogen	Brown	Ready to use		12 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		15 mL

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

Equipment	milk	meat, eggs, feed	urine
microtiter plate spectrophotometer (450 nm)	•	•	•
graduated pipettes	•	•	•
variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes	•	•	•
pH-meter	•		
mixer		•	
shaker		•	
vortex	•		
centrifuge	•	•	

5.2. Reagents:

Reagent	milk	meat, eggs, feed
0.1 M NaOH for pH adjustment	•	
80 % (v/v) methanol in sample buffer		•

6. Warnings and precautions for the users

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

The standards are harmful to health. They contain methanol. It should be worked under a chemical hood and skin contact should be avoided (use gloves). Particular care should be taken.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2.). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

7. Storage instructions

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

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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 test implementation
- Value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for zero standard

9. Sample preparation

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

9.1. Milk

- Adjust pH to 7 ± 0.5 with 0.1 M NaOH
- Centrifuge: 5 min / 2000 g / 4 °C (39.2 °F)
- Remove upper fat layer
- Dilute defatted milk sample 1:10 (1+9) in sample buffer and vortex (e.g. 20 µL defatted milk + 180 µL sample buffer)
- Use 50 µL per well in the assay

9.2. Meat, eggs and feed

- Homogenize sample completely
- Add 2 mL of 80 % methanol in sample buffer to 1 g of homogenized sample
- Shake: 15 min / over-head
- Centrifuge: 10 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
 - Meat and eggs: dilute supernatant 1:5 (1+4) with sample buffer and vortex (e.g. 40 µL supernatant + 160 µL sample buffer)

- Feed: dilute supernatant 1:20 (1+19) with sample buffer and vortex (e.g. 10 µL supernatant + 190 µL sample buffer)
- Use 50 µL per well in the assay

9.3. Urine

- Dilute urine 1:25 (1+24) in sample buffer (e.g. 20 µL urine + 480 µL sample buffer)
- Use 50 µL per well in the assay

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

Eventually occurring precipitates in the concentrates have to be dissolved by shaking at room temperature before dilution.

Dilute **wash buffer** concentrate 1:20 (1+19) with demineralized water (e.g. 2 mL concentrate + 38 mL demineralized water, sufficient for 4 microtiter strips). Diluted wash buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until the shelf life of the concentrate expires.

The **bacitracin conjugate** is provided as a concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before dilution, centrifuge the conjugate concentrate in the vial shortly (1 min / 1000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)). For reconstitution, the concentrate is diluted 1:100 (1+99) in conjugate buffer (e.g. 20 µL conjugate concentrate + 1980 µL conjugate buffer, sufficient for 4 microtiter strips).

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

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

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore cover the microtiter plates.

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 standard or prepared sample to separate duplicate wells and add 50 µL of diluted conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
3. 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 wells with 300 µL of wash buffer (see chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µL of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
5. Add 100 µL of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm immediately after addition of stop solution.

6. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food&Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

For the evaluation it should be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. 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 system of coordinates semilogarithmic against the bacitracin concentration [µg/kg].

7. Result interpretation

In order to obtain the bacitracin concentration in µg/kg (ppb) 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 as follows:

milk.....	10
meat, eggs.....	15
feed	40
urine	25

8. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.

9. Further application notes

Further application notes are available on request.

For 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
2014-02-07	Release version
2014-11-04	General revision Improved expiry of the final diluted wash buffer
2015-07-31	General revision Considering updated label designations
2015-09-04	General revision
2023-05-24	Current version General revision Changes made: – Brief information: Clarification of the specificity with regard to standard substance

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),
Jochen Hirsch, Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321