

r-biopharm®



RIDASCREEN® DNSH

REF R3740

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH)

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH)

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® DNSH (Art. Nr. R3740) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nifursol Metaboliten 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) in Fleisch, Fisch und Meeresfrüchten (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 wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung:	Homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 4,5 h Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 60 min
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	Fleisch ca. 0,13 µg/kg (ppb) Fisch und Meeresfrüchte ca. 0,15 µg/kg
Nachweisvermögen (CC β): (bezogen auf die Standardsubstanz)	Fleisch ca. 0,25 µg/kg Fisch und Meeresfrüchte ca. 0,25 µg/kg
Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	Fleisch (Ø) ca. 92 % Fisch und Meeresfrüchte (Ø) ca. 95 %
Spezifität:	DNSH (Standardsubstanz)..... 100 % Nifursol..... 119 % AHD..... < 0.1 % AMOZ..... < 0.1 % AOZ < 0.1 % SEM < 0.1 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® DNSH 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.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Nitrofuranen

RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD)	(Art. Nr. R3713)
RIDASCREEN® Nitrofuran (AMÖZ)	(Art. Nr. R3722)
RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ)	(Art. Nr. R3703)
RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM)	(Art. Nr. R3724)
RIDA® Nitrofuran (AHD) Spiking Solution	(Art. Nr. R3796)
RIDA® Nitrofuran (AMÖZ) Spiking Solution	(Art. Nr. R3799)
RIDA® Nitrofuran (AOZ) Spiking Solution	(Art. Nr. R3798)
RIDA® Nitrofuran (SEM) Spiking Solution	(Art. Nr. R3797)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® DNSH (Art. Nr. R3740) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Nifursol Metaboliten 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) in Fleisch (Geflügel, Schwein, Rind), Fisch und Meeresfrüchten (Garnelen, Krabben).

2. Allgemeines

Nifursol ist ein Nitrofuran-Antibiotikum, das in der Europäischen Union und anderen Ländern als Futtermittelzusatzstoff verboten ist. Nifursol wird in lebenden Organismen zu 3,5-Dinitrosalicylsäurehydrazid (DNSH) metabolisiert. DNSH ist ein Marker für den Nachweis der illegalen Verwendung von Nifursol in der Tierhaltung. Der Nachweis von DNSH durch LC-MS/MS erfordert die Derivatisierung dieses Metaboliten mit 2-Nitrobenzaldehyd zu NP-DNSH, wie bei anderen Nitrofuran-Metaboliten wie SEM, AHD, AMOZ und AOZ. Der in diesem Test verwendete Antikörper detektiert DNSH ohne Derivatisierung mit 2-Nitrobenzaldehyd. Gemäß der Verordnung (EU) 2019/1871 der Kommission gilt ab dem 28. November 2022 ein Referenzwert für Maßnahmen (*reference point for action*, RPA) von 0,5 µg/kg für DNSH und andere Nitrofuranmetabolite.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen DNSH beschichtet. Im ersten Schritt des Tests werden Standards und Proben hinzugefügt. Das in den Standardlösungen oder in den Proben vorhandene DNSH binden an den immobilisierten Antikörper. Nach Inkubation wird die überstehende Flüssigkeit entfernt. Dann wird DNSH-Enzymkonjugat hinzugegeben, das an jeden verfügbaren Antikörper bindet. Nicht gebundenes enzymmarkiertes DNSH 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-Reagenz führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur DNSH-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Extraction buffer Extraktionspuffer	Gebrauchsfertig		2 x 50 ml
Dilution buffer Verdünnungspuffer	Konzentrat	10x	30 ml
Standard 1 (meat) Standard 1 (Fleisch)	Lyophilisat	4,4 µg/kg	2 x
Standard 2 (seafood) Standard 2 (Meeresfrüchte)	Lyophilisat	3,6 µg/kg	2 x
Wash buffer Waschpuffer	Konzentrat	20x	30 ml
Conjugate Konjugat	Konzentrat	100x	200 µl
Protease enzyme Protease Enzym	Konzentrat	40x	2 x 1,3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen	Gebrauchsfertig		12 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gebrauchsfertig		12 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g) und Einwaageschalen
- Abzug
- Vortexer
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 4000 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 15 ml centrifuge tubes von Greiner)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 - 300 µl
- Gegebenenfalls: Schüttler für Mikrotiterplatten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Multipipette mit 2,5 ml Kombispitzen
- Aluminiumfolie oder Parafilm
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Acetonitril
- 1 M Salzsäure (HCl)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten DNSH, Vorsicht ist geboten, Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

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 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 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.

- 1 ml verdünntes Protease Enzym (siehe Kapitel 10.1) zu 1 g homogenisierter Probe geben und vortexen (10 s)
- Probe 1 Std. bei 50 °C inkubieren
- 100 µl 1 M Salzsäure (HCl) zur Probe geben, 10 s vortexen
- Probe 3 Std. bei 50 °C inkubieren
- 1 ml Acetonitril zu den Proben hinzugeben und 10 s vortexen
- 1 ml Extraktionspuffer zu der Probe geben und 30 s vortexen/schütteln
- Probe 5 min bei 4000 g zentrifugieren (20 - 25 °C)
- Obere Acetonitrilphase abnehmen und 1:8 (1+7) mit Verdünnungspuffer verdünnen (siehe Kapitel 10.1) (z. B. 50 µl oberen Phase + 350 µl Verdünnungspuffer)
- Gut mischen und 100 µl direkt im Test verwenden

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der **Verdünnungspuffer** liegt als 10-fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch gemischt und 1:10 (1 + 9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 10 ml Pufferkonzentrat + 90 ml dest. Wasser). Vor der Verwendung frisch zubereiten.

Der **Waschpuffer** liegt als 20-fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:20 (1 + 19) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 1 ml Pufferkonzentrat + 19 ml dest. Wasser). Für jeden Mikrotiterstreifen werden 20 ml verdünnter Waschpuffer benötigt. Vor der Verwendung frisch zubereiten.

Das **Konjugat** liegt als 100-fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel

Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat im Fläschchen durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (1 min, 1000 x g) vorbereiten. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:100 (1 + 99) mit Verdünnungspuffer verdünnt werden (z. B. 20 µl Konzentrat + 1980 µl Verdünnungspuffer). Für 2 Mikrotiterstreifen werden 1,6 ml des verdünnten Konjugats benötigt. Unbenutztes Konjugatkonzentrat bei 2 - 8 °C lagern.

Das **Protease Enzym** liegt als 40-fach Konzentrat vor. Vor dem Pipettieren sollte das Konzentrat vorsichtig gut gemischt werden. Das Protease Enzym muss 1:40 (1 + 39) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 0,5 ml Enzym + 19,5 ml dest. Wasser). Für jede Probe wird 1 ml verdünntes Protease Enzym benötigt.

Der **Standardverdünnungspuffer** wird zur Verdünnung der Standards benötigt. Es handelt sich um den Verdünnungspuffer mit 12,5 % Acetonitril. Bereiten Sie den Standardverdünnungspuffer frisch vor der Verwendung zu (z. B. 1,25 ml Acetonitril + 8,75 ml Verdünnungspuffer). Gut mischen.

Die **Standards** liegen lyophilisiert vor. Bereiten Sie eine Verdünnungsreihe der DNSH-Standards vor. Für eine optimale Kalibrierung wählen Sie den Standard, der den verwendeten Proben entspricht. Die rekonstituierten Standards sind bei - 20 °C (- 4 °F) für 4 Wochen stabil.

Fleisch:

2 ml des Standardverdünnungspuffers zum Standard "Fleisch" hinzufügen und mischen. Diese Lösung enthält eine DNSH-Konzentration, die 4,4 µg/kg DNSH in einer Probe entspricht. 0,4 ml dieser Lösung in ein sauberes Gefäß pipettieren und 0,6 ml des Standardverdünnungspuffers hinzufügen. Auf diese Weise fortlaufend die Verdünnungen für 1,76, 0,70, 0,28 und 0,11 µg/kg herstellen.

Meeresfrüchte:

2 ml des Standardverdünnungspuffers zum Standard "Meeresfrüchte" hinzufügen und mischen. Diese Lösung enthält eine DNSH-Konzentration, die 3,6 µg/kg DNSH in einer Probe entspricht. 0,4 ml dieser Lösung in ein sauberes Gefäß pipettieren und 0,6 ml des Standardverdünnungspuffers hinzufügen. Auf diese Weise fortlaufend die Verdünnungen für 1,44, 0,58, 0,23 und 0,09 µg/kg herstellen.

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 Multikanal- oder einer Multistepper-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 100 µl Standardverdünnungspuffer (siehe Kapitel 10.1) in Doppelbestimmung als **Blank** (z. B. in G1, G2) und als **Maximalsignal** (z. B. in A1, A2) in die Kavitäten pipettieren.
3. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung 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. **Bitte beachten:** Kavitäten noch nicht waschen.
5. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren (mit Ausnahme der Blanks; z. B. in G1, G2), vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) (im Dunkeln) inkubieren.
6. 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 verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
7. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm umgehend 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.

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:

Die mittleren Absorptionswerte der Blanks (G1 und G2) werden von den einzelnen Werten für die Standards und Proben abgezogen.

Die Absorptionswerte der sechs Standards und der Proben (Mittelwerte der Duplikate) werden durch den mittleren Absorptionswert des Nullstandards (maximales Signal) geteilt und mit 100 multipliziert.

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem halblogarithmisch gegen die DNSH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

12. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

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 Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Antibiotikafreie und Antibiotika-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.






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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-10-11	Freigabeversion
2022-12-19	Aktuelle Version Redaktionelle Änderungen Fehlerkorrektur in Kapitel 10.1 bei der Volumenangabe (nur im deutschen Teil)

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® DNSH

Brief information

RIDASCREEN® DNSH (Art. No. R3740) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nifursol metabolite 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in meat and seafood (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: homogenization and extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)..... approx. 4.5 h
test implementation (incubation time)..... 60 min

Limit of detection: meat..... approx. 0.13 µg/kg (ppb)
(depending on matrix) fish and shellfish..... approx. 0.15 µg/kg

Detection capability (CC β):
(depending on matrix) meat..... approx. 0.25 µg/kg
fish and shellfish..... approx. 0.25 µg/kg

Recovery rate: meat (Ø)..... approx. 92 %
(corresponding to the fish and shellfish (Ø) approx. 95 %
standard substance)

Specificity: DNSH (standard substance)..... 100 %
Nifursol..... 119 %
AHD..... < 0.1 %
AMOZ..... < 0.1 %
AOZ < 0.1 %
SEM < 0.1 %

The specificity of the RIDASCREEN® DNSH 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/>.

Related product and accessories for nitrofurantoin determination

RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AHD)	(Art. No. R3713)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AMOZ)	(Art. No. R3722)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ)	(Art. No. R3703)
RIDASCREEN® Nitrofurantoin (SEM)	(Art. No. R3724)
RIDA® Nitrofurantoin (AHD) Spiking Solution	(Art. No. R3796)
RIDA® Nitrofurantoin (AMOZ) Spiking Solution	(Art. No. R3799)
RIDA® Nitrofurantoin (AOZ) Spiking Solution	(Art. No. R3798)
RIDA® Nitrofurantoin (SEM) Spiking Solution	(Art. No. R3797)

1. Intended use

RIDASCREEN® DNSH (Art. No. R3740) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nifursol metabolite 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in meat (poultry, pork, beef) and seafood (fish, shrimp, and prawn).

2. General information

Nifursol is a nitrofurantoin antibiotic banned as a feed additive in the European Union and other countries. Nifursol is metabolized to 3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH) in living organisms. DNSH is a marker for the detection of illegal use of nifursol in animal husbandry. The detection of DNSH by LC-MS/MS requires derivatization of this metabolite with 2-nitrobenzaldehyde to NP-DNSH, like other nitrofurantoin metabolites such as SEM, AHD, AMOZ and AOZ. The antibody used in this test detects DNSH without derivatization with 2-nitrobenzaldehyde. In accordance with Commission Regulation (EU) 2019/1871 a reference point for action (RPA) of 0.5 µg/kg for DNSH and other nitrofurantoin metabolites applies from 28 November 2022.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against DNSH. In the first step of the assay standards and samples are added. DNSH present in the standard solutions or in the samples bind to the immobilized antibody. After incubation, the content of the wells is emptied. Then DNSH enzyme conjugate is added to each well and it binds to any available antibody. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme 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 absorbance is inversely proportional to the DNSH 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	Format		Volume/Amount
Microtiter plate	Ready to use		96 wells
Extraction buffer	Ready to use		2 x 50 mL
Dilution buffer	Concentrate	10x	30 mL
Standard 1 (meat)	Lyophilized	4.4 µg/kg	2 x
Standard 2 (seafood)	Lyophilized	3.6 µg/kg	2 x
Wash buffer	Concentrate	20x	30 mL
Conjugate	Concentrate	100x	200 µL
Protease enzyme	Concentrate	40x	2 x 1.3 mL
Substrate/Chromogen	Ready to use		12 mL
Stop solution	Ready to use		12 mL

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g) and weighing vessels
- Fume hood
- Vortex mixer
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 4,000 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 15 mL centrifuge tubes from Greiner)
- If available: 8-channel micropipette 100 - 300 µL
- If available: microtiter plate shaker
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- Multipipette with 2.5 ml combitips
- Aluminium foil or parafilm
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Acetonitrile
- 1 M hydrochloric acid (HCl)

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 contain DNSH. Particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

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 (36 - 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 (36 - 46 °F).

The 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 substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for the zero standard

9. Sample preparation

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

- Add 1 mL of diluted protease enzyme (see chapter 10.1) to 1 g of homogenized sample and vortex for 10 s
- Incubate the sample for 1 h at 50 °C (122 °F)
- Add 100 µL of 1 M hydrochloric acid (HCl) to the sample, vortex for 10 s
- Incubate the sample for 3 h at 50 °C (122 °F)
- Add 1 mL of acetonitrile to the samples and vortex for 10 s
- Add 1 mL of extraction buffer to the sample and vortex/shake for 30 s
- Centrifuge the sample for 5 min at 4000 g (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Dilute the upper acetonitrile layer 1:8 (1 + 7) in the dilution buffer (see chapter 10.1) (e. g. 50 µL upper layer + 350 µL dilution buffer)
- Mix well and use 100 µL directly in the test

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The **dilution buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, mix the concentrated buffer and dilute 1:10 (1 + 9) with distilled water (e.g. 10 mL buffer concentrate + 90 mL dist. water). Prepare fresh before use.

The **wash buffer** is provided as a 20-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:20 (1 + 19) with distilled water (e.g. 1 mL buffer concentrate + 19 mL dist. water). For each strip 20 mL of diluted rinsing buffer is required. Prepare dilutions freshly before use.

The **conjugate** is provided as a concentrate (100-fold). Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Spin down the conjugate in the vial by a short centrifugation step (1 min, 1000 x g). The conjugate concentrate has to be diluted 1:100 (1 + 99) with dilution buffer (e.g. 20 µL concentrate + 1980 µL dilution buffer). For two strips 1.6 mL of diluted conjugate is required. Store unused concentrated conjugate at 2 - 8 °C.

The **protease enzyme** is provided as a concentrate (40-fold). Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully and mixed well. The protease enzyme has to be diluted 1:40 (1 + 39) with dist. water (e.g. 0.5 mL

enzyme + 19.5 mL dist. water). For each sample 1 mL of diluted protease enzyme is required.

The **standard dilution buffer** is needed to dilute the standards. It is the dilution buffer containing 12.5 % of acetonitrile. Prepare standard dilution buffer fresh before use (e. g. 1.25 mL acetonitrile + 8.75 mL dilution buffer). Mix well.

The **standards** are provided lyophilized. Prepare a dilution range of DNSH standards. For optimum calibration select the standard corresponding to the samples used. The reconstituted standards are stable at - 20 °C (- 4 °F) for 4 weeks.

Meat:

Add 2 mL of the **standard dilution buffer** to DNSH “meat” standard and mix. This solution contains DNSH concentration corresponding to 4.4 µg/kg of DNSH in a sample. Pipette 0.4 mL of this solution into a clean tube and add 0.6 mL of the standard dilution buffer. Continue to make a dilution range of 1.76, 0.70, 0.28 and 0.11 µg/kg.

Seafood:

Add 2 mL of the **standard dilution buffer** to the DNSH “seafood” standard and mix. This solution contains DNSH concentration corresponding to 3.6 µg/kg of DNSH in a sample. Pipette 0.4 mL of this solution into a clean tube and add 0.6 mL of the standard dilution buffer. Continue to make a dilution range of 1.44, 0.58, 0.23 and 0.09 µg/kg.

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (36 - 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. Pipette 100 μL of the standard dilution buffer in duplicate as **blank** (e. g. wells G1, G2) and 100 μL of the standard dilution buffer in duplicate to the wells as **maximum signal** (e. g. wells A1, A2).
3. Pipette 100 μL of each standard or sample (prepared according to chapters 9. and 10.1) in duplicate to the remaining wells, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$) (in the dark).
4. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. **Note:** do not wash.
5. Add 100 μL of the diluted conjugate (see chapter 10.1) to each well, except blanks (e. g. wells G1, G2), mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$) (in the dark).
6. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 300 μL diluted washing buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
7. 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 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$) in the dark.
8. Pipette 100 μL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction immediately at 450 nm.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT[®] Win.NET (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:

Subtract the mean absorbance values of the blanks (G1, G2) from the individual ones of the wells containing the standards and the samples.

The absorbance values of the six standards and the samples (mean values of the duplicates) are divided by the mean absorbance value of the zero standard (maximum signal) and multiplied by 100.

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

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 DNSH concentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]. The DNSH concentration in meat and seafood expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ can be read directly from the calibration curve.

12. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

13. 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.
- Carry along test controls for quality control. Antibiotic-free and antibiotic containing (spiked) samples can be used.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

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
2022-10-11	Release version
2022-12-19	Current version Editorial changes and volume information error correction in chapter 10.1 (only german part)

Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

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

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

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

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

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch,

Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321