

RIDASCREEN[®] Sulfamethazin

Art. No. R3011

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Sulfamethazin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of sulfamethazine

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

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

E-Mail : info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Sulfamethazin (Art. Nr.: R3011) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfamethazin in Milch, Fleisch, Honig, Leber, Niere, Fisch, Shrimps und Ei.

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

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

Probenvorbereitung: Milch: direkter Einsatz
 Fleisch: Homogenisierung, Zentrifugation
 Honig: Extraktion, Aufreinigung über RIDA® C18 Säule, Evaporation, Rekonstitution, Fällung
 Leber, Niere, Fisch: Homogenisierung, Zentrifugation, Fällung
 Shrimps, Ei: Homogenisierung, Extraktion, Evaporation, Rekonstitution

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)
 Je nach Probenmatrix ca. 5 min bis 2 h
 Testdurchführung (Inkubationszeit) 45 min

Nachweisgrenze: Milch..... ca. 4 µg/L
(bezogen auf die Fleisch (Rind, Schwein)..... ca. 5 µg/kg
Standardsubstanz) Fleisch (Geflügel) ca. 10 µg/kg
 Honig* ca. 10 µg/kg
 Leber..... ca. 6 µg/kg
 Niere ca. 10 µg/kg
 Fisch ca. 7 µg/kg
 Shrimps..... ca. 15 µg/kg
 Ei..... ca. 16 µg/kg

*bei Honig kann die Nachweisgrenze matrixbedingt abweichen

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 110 %
(bezogen auf die	Fleisch (Rind, Schwein).....	ca. 94 %
Standardsubstanz)	Fleisch (Geflügel)	ca. 115 %
	Honig.....	ca. 88 %
	Leber.....	ca. 89 %
	Niere	ca. 96 %
	Fisch	ca. 88 %
	Shrimps.....	ca. 111 %
	Ei.....	ca. 107 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Sulfamethazin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von der im Puffersystem ermittelten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Spezifität:

im Puffersystem	Sulfamethazin (Standardsubstanz).....	100 %
	Sulfamerazin	ca. 4 %
	Sulfacetamid, Sulfachloropyridazin, Sulfachloropyridazin –(phenyl-13C6), Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfadoxin, Sulfaguanidin, Sulfamethoxazol, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamethizol, Sulfamoxol, Sulfanilamid, Sulfaphenazol, Sulfapyridin, Sulfaquinoxalin, Sulfisoxazol	< 1 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot

RIDA® Sulfamethazin Dotierlösung	(R3098)
RIDASCREEN® Sulfonamide	(R3004)
RIDA® Sulfonamide-Sulfamethoxypyridazin Dotierlösung	(R3099)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Sulfamethazin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sulfamethazin in Milch, Fleisch, Honig, Leber, Niere, Fisch, Shrimps und Ei.

2. Allgemeines

Sulfonamide werden in der Kälber- und Schweinemast häufig als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt. Zusammen mit Antifolaten wie z. B. Trimethoprim werden sie in der Veterinärmedizin auch häufig zur Behandlung von Darminfektionen, Mastitiden, Lungenentzündungen und anderen systemischen Infektionen verwendet. Die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit Sulfonamiden ist deshalb möglich und wurde weltweit auch häufig nachgewiesen. Insbesondere das Vorkommen des karzinogenen Sulfamethazins ist im Hinblick auf den Verbraucherschutz problematisch. Laut EU-Recht gilt die Höchstmenge für alle Stoffe der Sulfonamidgruppe von 100 µg/kg in Muskulatur, Fett, Leber, Niere und Milch.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Sulfamethazin-Antikörper beschichtet. Die Mikrotiterplatte ist bereits funktionalisiert mit anti-Sulfamethazin-Antikörpern, welche an die immobilisierten Fänger-Antikörper gebunden sind. Durch Zugabe von Standards bzw. Probe und enzymmarkiertem Sulfamethazin (Konjugat) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Sulfamethazin um die Sulfamethazin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Sulfamethazin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopplösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Sulfamethazin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	3 µg/L	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	9 µg/L	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	27 µg/L	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	81 µg/L	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	162 µg/L	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		7,5 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

Gerät	Milch	Fleisch	Honig	Leber	Niere	Fisch	Shrimps Ei
Mikrotiterplatten- Photometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•
Messpipetten		•	•	•	•	•	•
Variable 2 - 10 µl Mikropipette			•		•	•	
variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•	•	•	•	•
Mixer		•		•	•	•	•
Schüttler		•		•	•	•	•
Zentrifuge		•	•	•	•	•	•
Evaporator			•				•
Vortex	•	•	•	•	•	•	•
RIDA® C-18 Säule			•				

5.2. Reagenzien:

Reagenz	Milch	Fleisch	Honig	Leber	Niere	Fisch	Shrimps Ei
Extraktionspuffer			•				
Methanol			•				•
Carrez I			•	•	•	•	
Carrez II			•	•	•	•	

Extraktionspuffer für Honig: 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5:

4,1 g Natriumacetat (CH_3COONa) in 900 ml dest. Wasser lösen, mit HCl auf pH 5 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

Carrez-Reagenz I:

1,52 g Kaliumhexacyanoferrat(II) $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ in 10 ml dest. Wasser lösen

Carrez-Reagenz II:

2,99 g Zinksulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ in 10 ml dest. Wasser lösen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das Substrat-/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlich gefärbten Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1. Milch

- eine repräsentative Probenmenge bis zur Homogenität vortexen
- 50 µl Milch pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel)

- eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- eventuell vorhandene obere Fettschicht komplett absaugen (z.B. mit einer Pasteurpipette)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

9.3. Honig

- 1 g Honig in 6 ml Extraktionspuffer (siehe 5.2.) lösen
- zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)

Den kompletten Probenextrakt mittels RIDA® C18 column (Art. Nr. R2002) aufreinigen:

- Säule mit 2 ml Methanol waschen
- Säule mit 2 ml Extraktionspuffer äquilibrieren
- den gesamten Probenextrakt aufbringen
- Säule mit 8 ml Extraktionspuffer waschen
- durch Nachdrücken von Luft oder N₂ die Flüssigkeit vollständig aus der Säule entfernen
- Probe langsam mit 1 ml Methanol (100%) eluieren (ca. 15 Tropfen/min)

- Eluat unter schwachem Luft- oder N₂-Strom bei 60 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 1 ml Waschpuffer aufnehmen
- 10 µl Carrez I hinzugeben, vortexen
- 10 µl Carrez II hinzugeben, vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Leber

- eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät homogenisieren
- zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand abnehmen
- 20 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 20 µl Carrez II zugeben, vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

9.5.Niere

- eine repräsentative Probenmenge von Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand abnehmen
- 10 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 10 µl Carrez II zugeben, vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

9.6.Fisch

- eine repräsentative Probenmenge von Haut und Fett befreien und mit einem geeigneten Gerät vollständig homogenisieren
- zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Waschpuffer zugeben
- 10 sec vortexen, dann 5 min kräftig mischen (Über-Kopf-Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)

- 1 ml Überstand abnehmen
- 5 µl Carrez I zugeben, vortexen
- 5 µl Carrez II zugeben, vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

9.7. Shrimps/ Ei

- eine repräsentative Probenmenge mit einem geeigneten Gerät homogenisieren
- zu 1 g homogenisierter Probe 2 ml Methanol zugeben
- 30 sec kräftig vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand in ein neues Röhrchen überführen und bei 60 °C unter schwachem Luft- oder N₂-Strom bis zur Trockene evaporieren
- den trockenen Rückstand in 1 ml Waschpuffer (siehe 10.1.) aufnehmen
- 50 µl des Überstandes pro Kavität in den Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). 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.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.

2. Je 50 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. 100 µl Substrat-/Chromogen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigegeführten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Sulfamethazin-Konzentration [µg/L] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Sulfamethazin-Konzentration in µg/L bzw. µg/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	1
Fleisch	3
Honig	1
Leber.....	3
Niere	3
Fisch	3
Shrimps.....	3
Eier	3

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

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®] Sulfamethazin

Brief information

RIDASCREEN[®] Sulfamethazin (Art. No.: R3011) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of sulfamethazine in milk, meat, honey, liver, kidney, fish, shrimp and egg.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	<u>milk</u> : direct use <u>meat</u> : homogenization, centrifugation <u>honey</u> : extraction, clean-up with RIDA [®] C18 column, evaporation, reconstitution, precipitation <u>liver, kidney, fish</u> : homogenization, centrifugation, precipitation <u>shrimp, egg</u> : homogenization, extraction, evaporation, reconstitution
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) according to sample matrix..... 5 min to 2 h test implementation (incubation time) 45 min
Limit of Detection (corresponding to the standard substance)	milk..... approx. 4 µg/L meat (bovine, porcine)..... approx. 5 µg/kg meat (poultry) approx. 10 µg/kg honey* approx. 10 µg/kg liver approx. 6 µg/kg kidney..... approx. 10 µg/kg fish approx. 7 µg/kg shrimp approx. 15 µg/kg egg approx. 16 µg/kg

* For honey the LOD can deviate due to matrix effects.

Recovery	milk.....	approx. 110 %
(corresponding to the	meat (bovine, porcine).....	approx. 94 %
standard substance)	meat (poultry)	approx. 115 %
	honey	approx. 88 %
	liver	approx. 89 %
	kidney.....	approx. 96 %
	fish	approx. 88 %
	shrimp	approx. 111 %
	egg.....	approx. 107 %

The specificity of the RIDASCREEN® Sulfamethazin test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate 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 for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

Specificity:

in buffer system	Sulfmethazine (standard substance)	100 %
	Sulfamerazine	approx. 4 %
	Sulfacetamide, sulfachloropyridazine, sulfachloropyridazine -(phenyl-13C6), sulfadiazine, sulfadimethoxin, sulfadoxine, sulfaguanidine, sulfamethoxazole, sulfamethoxypyridazine, sulfamethizole, sulfamoxole, sulfanilamide, sulphaphenazole, sulfapyridine, sulfaquinoxaline, sulfisoxazole.....	< 1%

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDA [®] Sulfamethazin Spiking Solution	(R3098)
RIDASCREEN [®] Sulfonamide	(R3004)
RIDA [®] Sulfonamide-Sulfamethoxypyridazin spiking solution	(R3099)

1. Intended use

RIDASCREEN[®] Sulfamethazin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of sulfamethazine in milk, meat, honey, liver, kidney, fish, shrimp and egg.

2. General

Sulfonamides are widely used as feed additives, mainly for fattening of calves and pigs. Combined with inhibitors of dihydrofolate reductase such as trimethoprim, tetroxoprim, or pyrimethamine sulfonamides are also used in veterinary medicine for the treatment of intestinal infections, mastitis, pneumonitis and other (systemic) diseases. Sulfonamide residues may therefore occur in food of animal origin such as meat and milk. Particularly the transmission of the carcinogenic sulfamethazine represents a threat to human health. The EU established a maximum residue limit (MRL) for all substances of the sulfonamide-group of 100 µg/kg (ppb) in muscle, fat, liver, kidney and milk.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-sulfamethazine antibodies. The microtiter plate is already functionalized with anti-sulfamethazine antibodies, which are bound by the immobilized capture antibodies. Standards or sample and sulfamethazine conjugate are added into the wells. Free and enzyme conjugated sulfamethazine competes for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The 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 sulfamethazine concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 Wells
Standard 1	white	Ready to use	0 µg/L	1.3 ml
Standard 2	white	Ready to use	3 µg/L	1.3 ml
Standard 3	white	Ready to use	9 µg/L	1.3 ml
Standard 4	white	Ready to use	27 µg/L	1.3 ml
Standard 5	white	Ready to use	81 µg/L	1.3 ml
Standard 6	white	Ready to use	162 µg/L	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	red	Ready to use		7.5 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	yellow	Ready to use		14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

Equipment	milk	meat	honey	liver	kidney	fish	shrimp egg
microtiter plate spectrophotometer (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•
graduated pipettes		•	•	•	•	•	•
variable 5 - 10 µl micropipettes			•		•	•	
variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes	•	•	•	•	•	•	•
mixer		•		•	•	•	•
shaker		•		•	•	•	•
centrifuge		•	•	•	•	•	•
evaporator			•				•
vortex	•	•	•	•	•	•	•
RIDA® C-18 column			•				

5.2. Reagents:

Reagent	milk	meat	honey	liver	kidney	fish	shrimp egg
extraction buffer			•				
methanol			•				•
Carrez I			•	•	•	•	
Carrez II			•	•	•	•	

Extraction buffer for honey: 50 mM sodium acetate buffer, pH 5

- Dissolve 4.1 g sodium acetate (CH_3COONa) in 900 ml distilled water, adjust pH to 5 with HCl and fill up to 1000 ml with distilled water

Carrez I:

- Carrez I: 1.52 g Potassium ferrocyanide(II) $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$; fill up to 10 ml with distilled water

Carrez II:

- Carrez II: 2.99 g Zinc sulfate $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$; fill up to 10 ml with distilled water

6. Warnings and precautions for the users

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

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

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C. Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C.

The substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

8. Indication of deterioration of reagents

- any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

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

9.1. Milk

- vortex a representative sample amount for homogenization
- use 50 µl milk per well in the assay

9.2. Meat

- remove fat from a representative amount of meat and homogenize the meat with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- centrifuge: 10 min / 4000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- if there is an upper fat layer, remove it completely (e.g. with a pasteur pipette)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.3. Honey

- dissolve 1 g of honey in 6 ml of extraction buffer (see 5.2.)
- centrifuge: 10 min / 3,000 g / room temperature (20 - 25 °C)

Purify all of the sample extract with RIDA[®] C-18 column (Art. No. R2002):

- wash the column with 2 ml methanol
- equilibrate the column with 2 ml of extraction buffer
- apply all of the sample extract and wash with 8 ml extraction buffer
- completely remove any fluid from the column by flushing the column with N₂ or air
- elute sample slowly with 1 ml of 100 % methanol (approx. 15 drops per second)
- evaporate the eluate to dryness under an nitrogen or air stream at 60 °C
- reconstitute the dry residue in 1 ml washing buffer
- add 10 µl of Carrez I, vortex
- add 10 µl of Carrez II, vortex
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.4. Liver

- remove fat from a representative amount of sample and homogenize the liver with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- vortex vigorously for 10 seconds and then shake upside down for 5 minutes
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- to 1 ml of the supernatant add 20 µl Carrez I, vortex
- add 20 µl Carrez II, vortex
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.5. Kidney

- remove fat from the sample and homogenize the kidney with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 2 ml washing buffer (see 10.1.) to 1 g of homogenized sample
- vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- to 1 ml of the supernatant add 10 µl Carrez I, vortex
- add 10 µl Carrez II, vortex
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.6. Fish

- remove fat and skin from a representative amount of the sample and homogenize the fish with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 2 ml washing buffer (see 5.1.) to 1 g of homogenized sample
- vortex for 10 seconds and then shake vigorously upside down for 5 minutes
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- to 1 ml of the supernatant add 5 µl Carrez I, vortex
- add 5 µl Carrez II, vortex
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

9.7. Shrimp/egg

- homogenize the sample with an Ultra-Turrax or a mixer
- add 2 ml methanol to 1 g of homogenized sample
- vortex vigorously for 30 seconds
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C)
- transfer 1 ml of the supernatant into a new vial and evaporate to complete dryness under nitrogen or air stream at 60 °C

- reconstitute the dried residue in 1 ml washing buffer (see 10.1.)
- use 50 µl of the supernatant per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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 wash buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C). Use 1 part 10fold concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the conjugate to the bottom of each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C) in the dark.
6. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win.NET (Art. No. Z9996), is available to evaluate the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

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

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the sulfamethazine concentration [µg/L].

In order to obtain the sulfamethazine concentration in µg/L / 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 factors are as follows:

milk	1
meat.....	3
honey	1
liver	3
kidney	3
fish	3
shrimp	3
egg.....	3

For further information or applications please contact your local distributor or R-Biopharm AG.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

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

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

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321