



## Arbeitsanleitung

Streptomycin

96 Tests

Enzymimmunoassay  
zur quantitativen  
Bestimmung von  
Streptomycin in  
Nahrungsmitteln

Best.-Nr.: STR-E02

Version: 1. Dezember 2022

**Gold Standard Diagnostics  
Kassel GmbH**

Otto-Hahn-Str. 16  
D-34123 Kassel

Tel.: +49 (0) 561 491742-0  
Fax: +49 (0) 561 491742-20

[info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com)

[www.kassel.goldstandarddiagnostics.com](http://www.kassel.goldstandarddiagnostics.com)

Empfindlichkeit	1 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	70-120%
Inkubationszeit	60 min

### Allgemeines

Streptomycin besteht aus drei Strukturelementen, die durch Glycosidbindungen miteinander verknüpft sind und gehört zur Gruppe der Aminoglycosidantibiotika. Streptomycin wird von dem zur Klasse der Actinobakterien gehörenden *Streptomyces griseus* gebildet und richtet sich gegen gram-negative Bakterien und den Tuberkel-Bazillus. Therapeutisch wird Streptomycin zur Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. Wegen seiner Nebenwirkungen (Schädigungen des Hörnervs, des Gleichgewichtssinns und der Nieren) wird es selten in der Humanmedizin angewandt, findet aber eine gewisse Verbreitung im veterinären Bereich. Nach der Behandlung von Mastitis säugender Muttertiere wurden erhöhte Streptomycinkonzentrationen in Leber, Nieren, Muskelgewebe und Milch gefunden. Die erlaubten Höchstmengen in diesen Fällen sind 500 µg/kg, 1000 µg/kg, 500 µg/kg und 200 µg/kg. Eine andere Anwendung des Antibiotikums unter dem Handelsnamen Plantomycin ist die Behandlung des sogenannten Feuerbrands von Obstbäumen. Um die Aufnahme durch den Menschen zu reduzieren, wurden in der Europäischen Union erlaubte Höchstmengen festgesetzt. Der deutsche Grenzwert für Streptomycin in Honig gemäß der Rückstandshöchstmengenverordnung (RHmV) beträgt 20 µg/kg.

### Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Streptomycin Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Maus-Immunglobuline gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Streptomycin enthaltende Probe bzw. Standards sowie ein Streptomycin-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Das Streptomycin der Probe/Standards bindet an den Antikörper, während dieser Komplex seinerseits mit dem anti-Maus-Antikörper auf der Platte reagiert. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird ohne vorheriges Waschen ein Streptomycin-Peroxidase Konjugat zur Absättigung unbesetzter Antikörperbindungsstellen hinzu-pipettiert. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 15 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Streptomycin-Konzentration

ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

### Vorsichtsmaßnahmen

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

### Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt

entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.

4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

### Reagenzien

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit anti-Maus-Antikörper.
2. Streptomycin-Standards: 6 Fläschchen mit je 1 mL (0, 2, 5, 20, 50, 200 ng/mL), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. Anti-Streptomycin Antikörper (Maus): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (Streptomycin-Peroxidase), 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, rot gefärbt, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Probenverdünner (PBS), 2 x 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
8. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
10. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
11. Arbeitsanleitung.

## Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

### Geräte

- 50, 100, 500 und 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Ultra-Turrax, Mixer, Vortex

### Reagenzien

- Bidest. Wasser
- 0,01 M PBS (8,77g/L NaCl, 0,7 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2,9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,3)
- Extraktionspuffer (2,0 g Heptansulfonsäure Na-Salz, 1,9 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O ad 200 mL bidest. Wasser, mit o-Phosphorsäure auf pH 2,0 einstellen)
- Methanol (100%)
- Carrez I (150 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat)
- Carrez II (300 g/L Zinksulfat-7-hydrat)

## Probenvorbereitung

### Honig (Screening-Methode)

- 2 g Honig in 10 mL bidest. Wasser lösen.
- Lösung 1:4 mit Probenverdünner weiter verdünnen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=20

### Honig (Sensitive Methode; C18 SPE)

- 1 g Honig auf 10 mL mit Extraktionspuffer auffüllen und vollständig auflösen. Anschließend durch Zentrifugation (10 min bei 3000 g) klären.
- C18 SPE-Säule mit 2 mL Methanol (100%) und dann mit 2 mL bidest. Wasser spülen.
- 5 mL Probenextrakt langsam durch die Säule drücken (ca. 1 mL/min).
- Säule mit 3 mL bidest. Wasser spülen.
- Säule 2 Minuten durch Luft- oder Stickstoffstrom trocknen.
- 1 mL Methanol (100%) auf die Säule geben und Probe eluieren (ca. 1 mL/min).
- Eluat im Luft- oder Stickstoffstrom bei 50-60°C bis zur Trockne eindampfen.
- Rückstand in 2 mL Probenverdünner aufnehmen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=4

### Shrimps

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) zerkleinern und homogenisieren.
- 1 g Probe mit 4 mL 0,01 M PBS mischen und 30 Minuten kräftig schütteln.
- 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Klaren Überstand 1:4 mit Probenverdünner verdünnen und im Test einsetzen.

- Probenverdünnungsfaktor: F=16

### Fleisch

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) zerkleinern und homogenisieren.
- 1 g Probe mit 4 mL 0,01 M PBS mischen und 30 Minuten kräftig schütteln.
- 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Klaren Überstand 1:6 mit Probenverdünner verdünnen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=24

### Leber

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) zerkleinern und homogenisieren.
- 1 g Probe mit 4 mL 0,01 M PBS mischen und 30 Minuten kräftig schütteln.
- 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Klaren Überstand 1:8 mit Probenverdünner verdünnen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=32

### Milch

- Probe auf 2-8°C kühlen und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Fettphase abtrennen oder durchstechen, Milch 1:8 mit Probenverdünner verdünnen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=8

### Vollei, roh

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer, Vortex) homogenisieren.
- Zu 5 mL Eiprobe 250 µL Carrez I zugeben, mischen und 250 µL Carrez II hinzufügen.
- Probe mischen und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Überstand 1:15 mit Probenverdünner verdünnen und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=16,5

## Testdurchführung

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des anti-Streptomycin Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Ohne vorheriges Waschen 50 µL Streptomycin-Peroxidase Konjugat in jede Vertiefung zugeben.

5. Platte abdecken und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
7. 100 µL Substratlösung zugeben.
8. Platte abdecken und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beenden.
10. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

### Berechnung der Ergebnisse

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Streptomycin abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren sind unter dem Punkt *Probenvorbereitung* aufgeführt.

**Anmerkung: Bedingt durch Matrixeffekte können negative Proben einen geringen Hintergrundwert aufweisen. Bei Validierungsexperimenten wurde dieser bei ca. 1-2 ng/mL gemessen. Dieser Wert muss als Nachweisgrenze der Methode betrachtet werden.**

### Typische Standardkurve

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der

Extinktion des 0 ng/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Streptomycin (ng/mL)      OD-% von 0 ng/mL

0	100
2	73
5	53
20	33
50	14
200	7

### Technische Daten

#### *Empfindlichkeit*

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Gold Standard Diagnostics Streptomycin Tests** beträgt 1 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

#### *Wiederfindung*

Honig	100%
Shrimps	70%
Fleisch	90%
Leber	95%
Milch	120%
Vollei	85%

#### *Intraassay-Präzision*

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Streptomycin-Tests wurde mit 6% bestimmt.

#### *Kreuzreaktionen relativ zu Streptomycin (=100%)*

Dihydrostreptomycin	70%
Gentamycin	< 0.001%
Neomycin	< 0.001%

### Literatur

1. Suhren G, Knapstein K; *Analyst.* 1998 Dec;123(12): 2797-801:  
Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods.
2. Edder P, Cominoli A, Corvi C; *J Chromatogr A.* 1999 Jan 15; 830(2):345-51:  
Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection.
3. Haasnoot W, Stouten P, Cazemier G, Lommen A, Nouws JF, Keukens HJ; *Analyst.* 124(3): 301 (1999):  
Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney.