

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Tetracycline ELISA



DETCYE01



96 wells



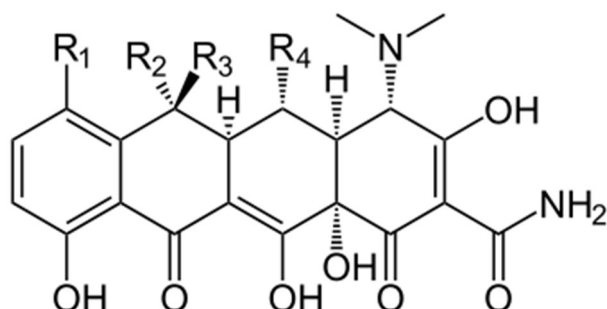
Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

TABLE OF CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1.	GENERAL INFORMATION	3
2.	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3.	PRECAUTIONS.....	3
4.	HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS.....	4
5.	REAGENTS.....	4
6.	ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED).....	4
7.	SAMPLE PREPARATION	5
8.	PROCEDURE.....	6
9.	CALCULATION OF RESULTS.....	6
10.	TYPICAL STANDARD VALUES.....	6
11.	PERFORMANCE.....	7
12.	REFERENCES	7
1.	ALLGEMEINES	8
2.	TESTPRINZIP	8
3.	VORSICHTSMAßNAHMEN	8
4.	GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN.....	9
5.	REAGENZIEN	9
6.	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN	9
7.	PROBENVORBEREITUNG.....	10
8.	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9.	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	11
10.	TYPISCHE STANDARDKURVE	11
11.	TECHNISCHE DATEN	12
12.	LITERATUR.....	12
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

Sensitivity	0.024 ng/mL
Recovery (spiked samples)	82 - 103%
Incubation Time	80 min

1. GENERAL INFORMATION



Tetracyclines belong to the group of antibiotics. The first identified tetracycline, Chlortetracycline, was isolated from *Streptomyces aureofaciens* by Benjamin Minge Duggar in 1948. In the following years many other tetracyclines were detected and characterized. Tetracyclines bind specifically to prokaryotic ribosomes, thereby inhibiting bacterial protein biosynthesis. In most countries tetracyclines are accepted in food production. Since the ingestion of tetracyclines presents a potential risk to the consumer the maximum amount of tetracycline residues in food is regulated in most countries. For example in the EU Regulation No 37/2010 the maximum residue limits for the sum of the parent drug and its 4-epimer are defined as 100 µg/kg (ppb) for muscle and milk. Thus a monitoring of food with respect to the concentration of tetracyclines is obligatory.

The **Demeditec Tetracycline ELISA** represents a highly sensitive detection system and is particularly capable of the rapid quantification of tetracycline contaminations in meat, milk, milk powder, cheese, shrimps and honey.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Tetracycline** quantitative test is based on the principle of the enzyme-linked immunosorbent assay. An antibody directed against tetracyclines is coated on the surface of a microtiter plate. Tetracyclines containing samples or standards and a tetracycline-peroxidase conjugate are given into the wells of the microtiter plate. The conjugate competes with the tetracyclines of the samples/standards for the limited number of antibody sites. After 60 minutes incubation at room temperature the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of tetracyclines is indirectly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
3. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB** **MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-tetracycline antibody.
2. **CAL** **1** – **6** **100x** Tetracycline Standards (0; 0.04; 0.1; 0.4; 1; 4 ng/mL): 6 vials with 1 mL each as 100x concentrate, dyed red. Dilute 20 µL of standard with 1980 µL pre-diluted extraction and sample dilution buffer to achieve the concentrations mentioned above.

For milk/milk powder containing samples dilute 20 µL of standard with 1980 µL Tetracycline Standard Diluent 2 (DETCYSV2) instead of pre-diluted extraction and sample dilution buffer to achieve the concentrations mentioned above. Stored at 4°C the diluted standards are stable for at least 12 hours

Note: The concentrations above refer to the 100x diluted standards.

3. **ENZ** **CONJ** **LYO** Conjugate (Tetracycline-Peroxidase): 3 vials with 2.5 mL each, dyed red, lyophilized. The provided conjugate is freeze dried and has to be reconstituted before the test. For dissolution add 2.5 mL of distilled water per vial and shake well for 5 minutes. The redissolved conjugate can be stored frozen at -20 °C for at least 1 month. Repeated freezing and thawing should be avoided.
4. **SUB** **TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP** **SOLN** Stop Solution (0.5 M H₂SO₄): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM** **DIL** **10x** Extraction and sample dilution buffer (Tris): 2 x 60 mL as 10x concentrate, dyed red. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least one week. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
7. **WASH** **SOLN** **10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 50 - 1000 µL micropipets
- Volumetric flask
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Water bath
- Plastic bag to store unused microtiter strips

Reagents

- Double distilled water
- Hexan

7. SAMPLE PREPARATION

Due to high risk of cross-contamination all applied instruments like applicator, mortar, glass vials etc. have to be cleaned thoroughly before and after each sample.

The following sample preparation should be applied for milk and other liquid samples:

1. Defat milk if applicable. Therefore the milk has to be centrifuged for 15 min at 4°C and at least 2000 g. Afterwards the upper fat layer should be removed.
2. Dilute 1 mL of previously defatted milk in 9 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the solution is shaken for 5 min at room temperature. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

The following sample preparation should be applied for solid samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample drawing, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 10 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is shaken for 10 min at 40°C (Cheese, Honey, Meat) or at 60°C (Nonfat dry milk).
3. The samples are centrifuged for 15 minutes with at least 2000 g. For a better separation of fat the centrifuge should be cooled to 4°C if applicable. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. Further treatment:
 - a) Milk- and shrimps samples:
 - b) Dilute 100 µL of particle-free solution with 100 µL of pre-diluted sample extraction buffer. 100 µL of the diluted extract are applied per well.
 - c) Dilution factor = 20
 - d) Meat samples:

Extract 1 mL of particle-free solution with 2 mL Hexan and discard the Hexan layer. Dilute 100 µL of extract with 100 µL of pre-diluted sample extraction buffer. 100 µL of the diluted extract are applied per well.
Dilution factor = 20
 - e) Cheese samples:

Extract 1 mL of particle-free solution with 2 mL Hexan and discard the Hexan layer. Dilute 100 µL of extract with 400 µL of pre-diluted sample extraction buffer. 100 µL of the diluted extract are applied per well.
Dilution factor = 50
 - f) Honey samples:
 - g) Dilute 100 µL of particle-free solution with 400 µL of pre-diluted sample extraction buffer. 100 µL of the diluted extract are applied per well.
 - h) Dilution factor = 50
 - i) Nonfat dry milk:

Dilute 50 µL of particle-free solution with 450 µL of pre-diluted sample extraction buffer. 100 µL of diluted extract are applied per well.
Dilution factor = 100

In case of too high concentrated samples, the sample extracts have to be further diluted with **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. The additional dilution factor has to be accounted for when calculating the results.

8. PROCEDURE

In order to compensate matrix effects for milk or milk powder containing samples, the dilution of the standards should be done with separately available Tetracycline Standard Diluent 2 (DETCYSV2). For any other samples the standards should be diluted with pre-diluted extraction and sample dilution buffer.

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 μL **diluted** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Add 50 μL of **redissolved** tetracycline-peroxidase conjugate into each well.
4. Incubate for 60 minutes at room temperature.
5. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 μL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbences.
6. Pipet 100 μL of substrate solution into each well.
7. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
8. Stop enzyme reaction by adding 100 μL of stop solution (0.5 M H_2SO_4) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
9. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ng/mL on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. The diluted samples must be further converted by the appropriate **sample dilution factor** for calculating the sample concentration in ppb. The factors for each sample matrix are listed in the sample preparation section.

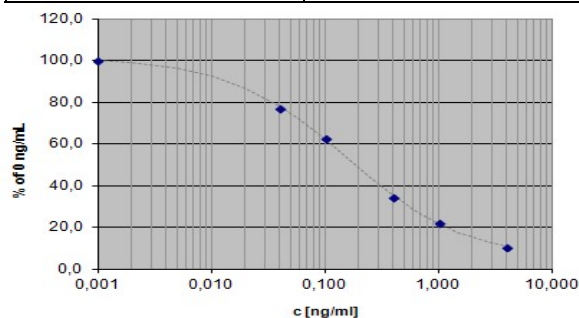
Example:

A honey sample prepared as described above results in 0.6 ng/mL. The concentration of the sample is calculated as follows: $C_{\text{sample}} = 0.6 \text{ (ng/mL)} * 50 \text{ (ppb*ml/ng)} = 30 \text{ ppb}$

10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 0 ng/mL standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Tetracycline (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
0.04	77
0.1	63
0.4	35
1	22
4	11



11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Tetracycline test** is 0.024 ng/mL.

The limit of quantification (LOQ) of the **Tetracycline test** is 0.072 ng/mL.

Validation experiments with common matrices resulted in the following LODs and LOQs [ppb].

Matrix	LOD	LOQ
Meat	0.5	1.4
Milk	1.1	2.0
Nonfat Dry Milk	6.7	14.0
Cheese	1.4	3.2
Shrimps	0.5	1.1
Honey	2.2	3.3

Recovery

Meat	87%
Milk	94%
Nonfat Dry Milk	90%
Cheese	82%
Shrimps	89%
Honey	103%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (meat, milk, nonfat dry milk, cheese, shrimps and honey) resulted in a dilution linearity of 83-110%.

Precision

Intra-assay Precision	4%
Inter-assay Precision	13%

Reactivity

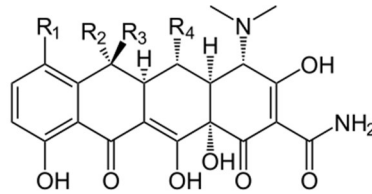
Tetracycline	100%
4-Epitetracycline	111%
Rolitetracycline	82%
Chlortetracycline	42%
Doxycycline	41%
Demeclocycline	37%
Oxytetracycline	34%
4-Epioxytetracycline	34%
4-Epichlortetracycline	11%
Methacycline	9%
Minocycline	1%

12. REFERENCES

1. Lee H-J, et al. (2001) – Enzyme-linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs. J Vet Med Sci, 63(5):553-556

Empfindlichkeit	0,024 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	82 - 103%
Inkubationszeit	80 min

1. ALLGEMEINES



Tetracycline gehören zur Gruppe der Antibiotika. Chlortetracyclin war das erste identifizierte Tetra-zyklin-Derivat, welches Benjamin Minge Duggar aus *Streptomyces aureofaciens* isolierte. In den folgenden Jahren wurden weitere Tetracycline entdeckt und charakterisiert. Tetracycline binden spezifisch an prokaryotische Ribosome, wodurch die bakterielle Proteinsynthese blockiert wird. In den meisten Ländern ist der Einsatz von Tetracyclinen im Rahmen der Nahrungsmittelproduktion (Tierhaltung) zugelassen. Da die Aufnahme von Tetracyclinen ein potentiell Risiko für den Verbraucher darstellt, sind in den meisten Ländern Höchstmengen für Tetracyclin-Rückstände in Nahrungsmitteln festgelegt. In der EU Verordnung Nr. 37/2010 ist der Rückstandshöchstwert für die Summe der Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer mit 100 µg/kg für Muskel und Milch festgelegt. Somit ist eine Überwachung von Nahrungsmitteln bezüglich der Rückstände von Tetracyclinen zwingend erforderlich.

Der **Demeditec Tetracyclin ELISA** stellt ein hochsensibles Nachweissystem dar und ist insbesondere zur schnellen Quantifizierung von Tetracyclinen in Fleisch, Milch, Milchpulver, Käse, Shrimps und Honig geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Tetracyclin** Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Tetracycline gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Tetracyclin enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Tetracyclin-Peroxidase-Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Tetracyclin um die limitierten Antikörper-Bindungsstellen statt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 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 Konzentration der Tetracycline ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

3. 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.).

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungen auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
3. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

5. 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. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Anti-Tetrazyklin-Antikörper.
2. **CAL 1 – 6 100x** Tetrazyklin Standards: 6 Fläschchen mit je 1,0 mL (0; 0,04; 0,1; 0,4; 1; 4 ng/mL Tetrazyklin), als 100x-Konzentrat, rot eingefärbt.
Gebrauchslösung: 20 µL Standard mit 1980 µL endverdünntem Extraktions- und Verdünnungspuffer verdünnen, um die oben genannten Konzentrationen zu erhalten. Gebrauchslösung für die Analyse Milch/Milchpulver enthaltender Proben: 20 µL Standard mit 1980 µL Tetracyclin Standard Verdünner 2 (DETCYSV2) verdünnen, um die oben genannten Konzentrationen zu erhalten. Die endverdünnten Standards sind bei 4°C mindestens 12 Stunden haltbar.
Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die 100x verdünnten Standards.
3. **ENZ CONJ LYO** Konjugat (Tetrazyklin-Peroxidase), 3 Fläschchen mit jeweils 2,5 mL, rot eingefärbt, lyophilisiert. Das Konjugat ist gefriergetrocknet und muss vor dem Test wieder aufgelöst werden. Die Lyophilisate werden jeweils in 2,5 mL destilliertem Wasser gelöst und für 5 min geschüttelt, um sicherzustellen, dass alle Partikel gelöst sind. Das wieder aufgelöste Konjugat ist bei -20°C mind. 1 Monat haltbar.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL 10x** Extraktions- und Verdünnungspuffer (Tris), 2 x 60 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. **WASH SOLN 10x** 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.
8. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 50 - 1000 µL-Mikropipetten
- Messkolben
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Wasserbad
- Wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

Reagenzien

- Bidest. Wasser
- Hexan

7. PROBENVORBEREITUNG

Aufgrund der hohen Gefahr von Kreuzkontaminationen müssen alle verwendeten Arbeitsgeräte wie Spatel, Mörser, Glasgefäße etc. vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden.

Die folgende Probenvorbereitung sollte für Milch und andere flüssige Proben verwendet werden:

1. Milch ggf. entfetten. Hierfür die Milch für 15 min bei 4°C und mindestens 2000 g zentrifugieren und anschließend die obere Fett-Phase entfernen.
2. 1 mL der zuvor entfetteten Milch in 9 mL des **verdünnten** Extraktionspuffers verdünnen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur schütteln. Anschließend wird mit Punkt 3 der Feststoff-Extraktion fortgefahren.

Folgende Probenvorbereitung sollte für Feststoff-Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchmischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 10 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wird die Suspension für 10 Minuten bei 40°C (Käse, Honig, Fleisch) bzw. bei 60°C (Magermilchpulver) geschüttelt.
3. Die Proben werden bei mindestens 2000 g für 15 min zentrifugiert. Für eine bessere Abtrennung von Fett sollte die Zentrifuge ggf. auf 4°C gekühlt sein. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Weitere Durchführung:
 - a) Milch- und Shrimpsproben:
100 µL der partikelfreien Lösung werden mit 100 µL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. 100 µL des verdünnten Extrakts werden im Test eingesetzt.
Verdünnungsfaktor = 20
 - b) Fleischproben:
1 mL partikelfreie Lösung mit 2 mL Hexan ausschütteln und die Hexan-Phase verwerfen. 100 µL des Extrakts werden mit 100 µL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. 100 µL des verdünnten Extrakts werden im Test eingesetzt.
Verdünnungsfaktor = 20
 - c) Käseproben:
1 mL partikelfreie Lösung mit 2 mL Hexan ausschütteln und die Hexan-Phase verwerfen. 100 µL des Extrakts werden mit 400 µL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. 100 µL des verdünnten Extrakts werden im Test eingesetzt.
Verdünnungsfaktor = 50
 - d) Honigproben:
100 µL der partikelfreien Lösung werden mit 400 µL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. 100 µL des verdünnten Extrakts werden im Test eingesetzt. Verdünnungsfaktor = 50
 - e) Magermilchpulver:
50 µL der partikelfreien Lösung werden mit 450 µL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. 100 µL des verdünnten Extrakts werden im Test eingesetzt. Verdünnungsfaktor = 100

Im Fall zu hoch konzentrierter Proben müssen die Probenextrakte ggf. mit **verdünntem** Extraktions- und Verdünnungspuffer weiter verdünnt werden. Der resultierende zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Um Matrixeffekte auszugleichen, sollte die Endverdünnung der Standards für die Messung von Milch- oder Milchpulverproben in separat erhältlichem Tetracyclin Standard Verdünner 2 (DETCYSV2) erfolgen. Für sonstige Proben werden die Standards in endverdünntem Extraktions- und Verdünnungspuffer endverdünnt.

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. 50 µL des wieder aufgelösten Tetrazyklin-Peroxidase Konjugats in die Vertiefungen pipettieren.
4. Platte für 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.
5. 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.
6. 100 µL Substratlösung zugeben.
7. Platte für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.
9. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion (OD 450 nm) berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Die Ergebnisse der verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Probenverdünnungsfaktor multipliziert werden, um den tatsächlichen Gehalt der Probe in ppb zu erhalten. Die Probenverdünnungsfaktoren sind im Abschnitt Probenvorbereitung aufgelistet.

Beispiel:

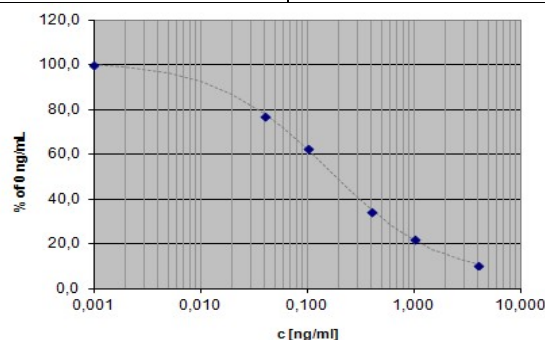
Ein Honigextrakt, welcher wie oben beschrieben hergestellt wurde, resultiert mit einem Testergebnis von 0,6 ng/mL. Die Konzentration der Probe wird wie folgt berechnet:

$$C_{\text{Probe}} = 0,6 \text{ (ng/mL)} * 50 \text{ (ppb*ml/ng)} = 30 \text{ ppb}$$

10. 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.

Tetrazyklin (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
0.04	77
0.1	63
0.4	35
1	22
4	11



11. TECHNISCHE DATEN**Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze (LOD) des **Tetrazyklin Tests** beträgt 0,024 ng/mL.

Die mittlere untere Quantifizierungsgrenze (LOQ) des **Tetrazyklin Tests** beträgt 0,072 ng/mL.

Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden LODs und LOQs [ppb].

Matrix	LOD	LOQ
Fleisch	0,5	1,4
Milch	1,1	2,0
Magermilchpulver	6,7	14,0
Käse	1,4	3,2
Shrimps	0,5	1,1
Honig	2,2	3,3

Wiederfindung

Fleisch	87%
Milch	94%
Magermilchpulver	90%
Käse	82%
Shrimps	89%
Honig	103%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über vier Stufen (Fleisch, Milch, Magermilchpulver, Käse, Shrimps und Honig) ergab Verdünnungslinearitäten von 83-110%.

Präzision

Intra-Assay Präzision	4%
Inter-Assay Präzision	13%












Reaktivität

Tetrazyklin	100%
4-Epitetrazyklin	111%
Rolitetrazyklin	82%
Chlortetrazyklin	42%
Doxyzyklin	41%
Demeclozyklin	37%
Oxytetrazyklin	34%
4-Epioxyteracycline	34%
4-Epichlortetracycline	11%
Methazyklin	9%
Minozyklin	1%

12. LITERATUR

- Lee H-J, et al. (2001) – Enzyme-linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs. J Vet Med Sci, 63(5):553-556

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore