

Product information

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



User's Manual

Chloramphenicol ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Chloramphenicol in food and urine



DECAPE02



96

Sensitivity	0.03 ng/mL
Recovery (spiked samples)	90-115 %
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Due to its outstanding antibacterial properties, chloramphenicol is an often used antibiotic in the production of milk, meat and eggs. In humans it leads to haematotoxic side effects (1,2), like the chloramphenicol induced aplastic anemia. This has caused low limits in Germany, e.g. 1 µg/kg for milk, meat and eggs (3).

Till now the chloramphenicol concentration was determined by radioimmunoassay (4,5) or by gas chromatography (6). However, compared with conventional methods, enzyme immunoassays show some essential advantages (7,8). There is no need to work with radioactive material, the required assay time is shorter and the sensitivity is better than with chromatographic methods.

The **Chloramphenicol** test provides a rapid, sensitive and reliable assay for the determination of chloramphenicol in food and urine. 40 samples can be assayed in duplicate within 60 minutes.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Chloramphenicol** quantitative test is based on the principle of the enzyme-linked immunosorbent assay. An antibody binding protein is coated on the surface of a microtiter plate. Chloramphenicol containing samples or standards and an antibody directed against chloramphenicol are given into the wells of the microtiter plate. The chloramphenicol contained in samples or standards will bind to the antibody which reacts with the binding protein coated onto the microtiter plate. After 30 minutes incubation at room temperature a chloramphenicol-peroxidase conjugate is added into the wells without a preceding washing step to saturate free antibody binding sites. After additional 15 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 15 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 chloramphenicol 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. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. 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.
4. 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. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with an antibody binding protein.
2. Chloramphenicol Standards (0; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5 ng/mL): 6 vials with 1 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. Anti-Chloramphenicol Antibody (sheep): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
4. Conjugate (Chloramphenicol-Peroxidase): 6 mL, dyed red, ready-to-use.
5. Substrate Solution (TMB): 15 mL, prestained red, ready-to-use.
6. Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL, ready-to-use.
7. Sample Diluent (PBS): 2 x 60 mL, dyed red, ready-to-use.
8. 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.
9. Two plastic foils to cover the strips during the incubation.
10. Plastic bag to store unused microtiter strips.
11. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 50, 100, 500 and 1000 µL-micropipets
- ELISA reader (450 nm)
- Centrifuge
- Ultra-Turrax, mixer
- Evaporator

Reagents

- Double distilled water
- Ethyl acetate
- n-Hexane
- Potassiumhexacyanoferrate(II)-3-hydrate (150 g/L; Carrez I)
- Zinxsulfate-7-hydrate (300 g/L; Carrez II)

7. SAMPLE PREPARATION

Milk (direct assay)

- Refrigerate fresh milk samples at 2-8°C and centrifuge afterwards at 3000 g for 10 minutes.
- Remove the upper fat layer and test the sample directly in the ELISA after warming to room temperature. For skimmed milk samples the centrifugation step can be omitted.
- Sample dilution factor: F=1

Milk (Ethyl acetate extraction)

- Add 250 µL Carrez I to 5 mL milk sample, mix well and add 250 µL Carrez II afterwards.
- Mix sample, refrigerate to 2-8°C and centrifuge at 3000 g for 10 minutes.
- Transfer 4.4 mL of the clear supernatant to a clean glass vial, add 8 mL ethyl acetate and agitate vigorously for 10 minutes.
- For phase separation centrifuge for 10 minutes at 3000 g (room temperature).
- Transfer 4 mL of the upper ethyl acetate phase to a clean glass vial and evaporate the solvent at 50-70°C under a nitrogen stream to dryness.
- Dissolve the dry residue with 400 µL sample diluent by shaking vigorously and test the sample in the ELISA.
- Sample dilution factor: F=0.2

Honey

- Dissolve 2 g honey in 4 mL double distilled water.
- Add 4 mL ethyl acetate and agitate vigorously for 10 minutes.
- Transfer 1 mL of the upper ethyl acetate phase to a clean glass vial and evaporate the solvent at 50-70°C under a nitrogen stream to dryness.
- Dissolve the dry residue with 500 µL sample diluent by shaking vigorously and test the sample in the ELISA.
- Sample dilution factor: F=1

Shrimps, Meat, Fish Meal

- Mill and homogenize sample with an appropriate device (mixer, ultra-turrax).
- Mix 3 g sample with 3 mL double distilled water, add 6 mL ethyl acetate and agitate vigorously for 10 minutes.
- For phase separation centrifuge for 10 minutes at 3000 g (room temperature).
- Transfer 4 mL of the upper ethyl acetate phase to a clean glass vial and evaporate the solvent at 50-70°C under a nitrogen stream to dryness.
- Add 1 mL n-hexane to the residue.
- Add 500 µL sample diluent to the mixture and agitate vigorously for 1 minute.
- For phase separation centrifuge for 10 minutes at 3000 g (room temperature).
- Test the lower, aqueous phase in the ELISA.
- Sample dilution factor: F=0.25

Whole Egg (raw)

- Homogenize sample with an appropriate device (mixer, ultra-turrax).
- To 2 g sample add 12 mL ethyl acetate and agitate vigorously for 10 minutes.
- For phase separation centrifuge for 10 minutes at 3000 g (room temperature).
- Transfer 6 mL of the upper ethyl acetate phase to a clean glass vial and evaporate the solvent at 50-70°C under a nitrogen stream to dryness.
- Add 1 mL n-hexane to the residue.
- Add 1 mL sample diluent to the mixture and agitate vigorously for 1 minute.
- For phase separation centrifuge for 10 minutes at 3000 g (room temperature).
- Test the lower aqueous phase in the ELISA.
- Sample dilution factor: F=1

Urine

- Centrifuge the samples at 3000 g for 10 minutes.
- Test the clear supernatant directly in the assay.
- Sample dilution factor: F=1

8. PROCEDURE

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate. Immediately add 50 µL anti-chloramphenicol antibody into each well.
3. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate for 30 minutes at room temperature.
4. Without preceding washing add 50 µL chloramphenicol-peroxidase conjugate into each well.
5. Cover the microtiter plate with a plastic foil and incubate additional 15 minutes at room temperature.
6. 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 absorbencies.
7. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
8. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 15 minutes at room temperature.
9. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
10. 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.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of chloramphenicol in ng/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. The diluted samples must be further converted by the appropriate sample dilution factor. The factors are listed for each sample matrix in the sample preparation section.

Note: Due to the extraction with ethyl acetate negative samples may show a certain blank value. In repetitive performed experiments with negative samples for each matrix the following blank values were identified.

Milk (direct assay)	< 0.1 ng/mL
Milk (ethyl acetate extraction)	< 0.1 ng/mL
Honey	< 0.2 ng/g
Shrimps	< 0.2 ng/g
Meat	< 0.2 ng/g
Fish meal	< 0.2 ng/g
Whole egg	< 0.05 ng/g
Urine	< 0.2 ng/mL

These values are defined as the cut-off of the method for the respective matrices. Lower concentrations have to be considered as negative.

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.

Chloramphenicol (ng/mL)	% binding of 0 ng/mL
0	100
0.05	84
0.1	70
0.5	28
1	17
5	8

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The sensitivity of the **Chloramphenicol test** is 0.03 ng/mL (based on the standard curve).

Recovery

Milk (direct assay)	94 %
Milk (ethyl acetate extraction)	98 %
Honey	98 %
Shrimps	96 %
Meat	108 %
Fish meal	90 %
Whole Egg	95 %
Urine	90 %

Intra-assay Precision

The intra-assay variation of the chloramphenicol test was determined to 8%.

Cross-reactivity

Cross-reactivity	relative to chloramphenicol (=100%)
Chloramphenicol Glucuronide	88%
Chloramphenicol Base	< 0.1%
Ampicillin	< 0.1%
Penicillin	< 0.1%
Tetracycline	< 0.1%

12. REFERENCES

1. Skarandies, G., Hausmann, K.: Knochenmarkschädigung nach Chloramphenicol-Behandlung in Hamburg und Umgebung; Med. Klin. 67, 569 (1972).
2. Schmid, A.: Chloramphenicolrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft als potentielle Ursache der aplastischen Anämie des Menschen; Dtsch. tierärztl. Wschr. 90, 201 (1983).
3. Bundesgesundheitsblatt: Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung; BGBL. I, 1251 (1984).
4. Arnold, D. et al: Radioimmunologische Bearbeitung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern; Archiv Lebensmittelhyg. 35, 131 (1984).
5. Arnold, D., Somogyi, A.: Trace analysis of Chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay; J. AOAC 68, 984 (1985).
6. Bergner-Lang, B., Kächele, M.: Schnellmethode zur gaschromatographischen Bestimmung von Chloramphenicol in Milch; Deut. Lebensm. Rundschau 81, 278 (1985).
7. Märtlbauer, E., Terplan, G.: Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch; Archiv Lebensmittelhyg. 38, 3 (1985).

Empfindlichkeit	0,03 ng/mL
Wiederfindung (aufgestockte Proben)	90-115 %
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Chloramphenicol ist ein Breitbandantibiotikum, das wegen seiner hervorragenden antibakteriellen Eigenschaften in der Tiermast häufig eingesetzt wird. Es führt beim Menschen allerdings zu hämatotoxischen Nebenwirkungen (1,2), vor allem der Chloramphenicol-induzierten aplastischen Anämie, für die bisher keine Dosis-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden konnte. Dies führte zur Festlegung sehr niedriger Höchstmengen, die in Deutschland für Milch, Fleisch und Eier bei 1 µg/kg liegen (3).

Die Chloramphenicol-Grenzwerte wurden bisher radioimmunologisch (4,5) oder gaschromatographisch (6) überwacht. Enzymimmunoassays weisen jedoch im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden wesentliche Vorteile auf (7,8). Das Arbeiten mit radioaktivem Material entfällt und der Zeitaufwand ist im Vergleich zur gaschromatographischen Methode wesentlich geringer.

Der **Chloramphenicol Test** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Chloramphenicol in Nahrungsmitteln und Urin nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 60 Minuten im Doppelansatz bestimmt werden.

2. TESTPRINZIP

Der **Chloramphenicol Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Antikörperbindendes Protein ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Chloramphenicol enthaltende Probe bzw. Standards sowie ein Chloramphenicol-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Das Chloramphenicol der Probe/Standards bindet an den Antikörper, während dieser Komplex seinerseits mit dem bindenden Protein auf der Platte reagiert. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird ohne vorheriges Waschen ein Chloramphenicol-Peroxidase Konjugat zur Absättigung unbesetzter Antikörperbindungsstellen hinzupipettiert. 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 Chloramphenicol-Konzentration 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. 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.

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. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Antikörper-bindendem Protein.
2. Chloramphenicol Standards: 6 Fläschchen mit je 1 mL (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 ng/mL), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. Anti-Chloramphenicol Antikörper (Schaf): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (Chloramphenicol-Peroxidase), 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, rot gefärbt, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 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.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

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

Reagenzien

- Bidest. Wasser
- Essigsäureethylester
- n-Hexan
- Carrez I (150 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat)
- Carrez II (300 g/L Zinksulfat-7-hydrat)

7. PROBENVORBEREITUNG

Milch (direkter Einsatz)

- Vollmilchproben bei 2-8°C kühlen und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Fettschicht abtrennen und Milchprobe direkt (nach Erwärmen auf Raumtemperatur) im Test einsetzen. Bei Magermilchproben kann auf Zentrifugation verzichtet werden.
- Probenverdünnungsfaktor: F=1

Milch (Essigsäureethylester-Extraktion)

- Zu 5 mL Milchprobe 250 µL Carrez I zugeben, mischen und 250 µL Carrez II hinzufügen.
- Probe mischen, auf 2-8°C kühlen und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- 4,4 mL Überstand in ein sauberes Glasröhrchen überführen, 8 mL Essigsäureethylester zugeben und 10 Minuten kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 4 mL Essigsäureethylester-Überstand in sauberes Glasröhrchen überführen und bei 50-70°C unter Stickstoff-Strom bis zur Trockene eindampfen.
- Trockenen Rückstand mit 400 µL Probenverdünner aufnehmen, gründlich schütteln und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=0,2

Honig

- 2 g Honig in 4 mL bidest. Wasser lösen.
- 4 mL Essigsäureethylester zugeben und 10 Minuten kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 1 mL Essigsäureethylester-Überstand in sauberes Glasröhrchen überführen und bei 50-70°C unter Stickstoff-Strom bis zur Trockene eindampfen.
- Trockenen Rückstand mit 500 µL Probenverdünner aufnehmen, gründlich schütteln und im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=1

Shrimps, Fleisch, Fischmehl

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) zerkleinern und homogenisieren.
- 3 g Probe mit 3 mL bidest. Wasser versetzen, 6 mL Essigsäureethylester zugeben und 10 Minuten kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 4 mL Essigsäureethylester-Überstand in sauberes Glasröhrchen überführen und bei 50-70°C unter Stickstoff-Strom bis zur Trockene eindampfen.
- Trockenen Rückstand in 1 mL n-Hexan aufnehmen.
- 500 µL Probenverdünner zugeben und 1 Minute kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- Untere wässrige Phase im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=0,25

Vollei, roh

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) homogenisieren.
- 2 g Probe mit 12 mL Essigsäureethylester versetzen und 10 Minuten kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 6 mL Essigsäureethylester-Überstand in sauberes Glasröhrchen überführen und bei 50-70°C unter Stickstoff-Strom bis zur Trockene eindampfen.
- Trockenen Rückstand in 1 mL n-Hexan aufnehmen.
- 1 mL Probenverdünner zugeben und 1 Minute kräftig schütteln.
- Zur Phasentrennung 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren (Raumtemperatur).
- Untere wässrige Phase im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=1

Urin

- Proben 10 Minuten bei 3000 g zentrifugieren.
- Klaren Überstand direkt im Test einsetzen.
- Probenverdünnungsfaktor: F=1

8. 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-Chloramphenicol Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Ohne vorheriges Waschen 50 µL Chloramphenicol-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 (1 N saure Lösung) beenden.
10. 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 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 Chloramphenicol 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 die Extraktion mit Essigsäureethylester können negative Proben Hintergrundwerte aufweisen. Bei wiederholt durchgeführten Experimenten mit negativen Proben wurden matrixabhängig die folgenden Leerwerte festgestellt:

Milch (direkt)	< 0,1 ng/g
Milch (Essigsäureethylester)	< 0,1 ng/mL
Honig	< 0,2 ng/mL
Shrimps	< 0,2 ng/g
Fleisch	< 0,2 ng/g
Fischmehl	< 0,2 ng/g
Vollei	< 0,05 ng/g
Urin	< 0,2 ng/mL

Diese Werte gelten als Cut-Off der Methode für die jeweilige Matrix. Geringere Konzentrationen sind als negativ zu betrachten.

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.

Chloramphenicol (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
0,05	84
0,1	70
0,5	28
1	17
5	8

11. TECHNISCHE DATEN**Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Chloramphenicol Tests** beträgt 0,03 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

Wiederfindung

Milch (direkt)	94 %
Milch (Essigsäureethylester)	98 %
Honig	98 %
Shrimps	96 %
Fleisch	108 %
Fischmehl	90 %
Vollei	95 %
Urin	90%

Intraassay-Präzision

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Chloramphenicol-Tests wurde mit 8 % bestimmt.











Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen	relativ zu Chloramphenicol (=100%)
Chloramphenicol-Glucuronid	88%
Chloramphenicol-Base	< 0,1%
Ampicillin	< 0,1%
Penicillin	< 0,1%
Tetracyclin	< 0,1%

12. LITERATUR

1. Skarandies, G., Hausmann, K.: Knochenmarkschädigung nach Chloramphenicol-Behandlung in Hamburg und Umgebung; Med. Klin. 67, 569 (1972).
2. Schmid, A.: Chloramphenicolrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft als potentielle Ursache der aplastischen Anämie des Menschen; Dtsch. tierärztl. Wschr. 90, 201 (1983).
3. Bundesgesundheitsblatt: Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung; BGBL. I, 1251 (1984).
4. Arnold, D. et al: Radioimmunologische Bearbeitung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern; Archiv Lebensmittelhyg. 35, 131 (1984).
5. Arnold, D., Somogyi, A.: Trace analysis of Chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay; J. AOAC 68, 984 (1985).
6. Bergner-Lang, B., Kächele, M.: Schnellmethode zur gaschromatographischen Bestimmung von Chloramphenicol in Milch; Deut. Lebensm. Rundschau 81, 278 (1985).
7. Märtlbauer, E., Terplan, G.: Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch; Archiv Lebensmittelhyg. 38, 3 (1985).
8. Beck, M. et al: Untersuchung von Eiern auf Chloramphenicol-Rückstände: Vergleich eines Radioimmunoassays (RIA) mit einem enzymimmunologischen Verfahren (ELISA); Archiv Lebensmittelhyg. 38, 93 (1987).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température 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
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità