

r-biopharm®



## RIDASCREEN® Tetracyclin

**REF** R3505

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Tetracyclin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of tetracycline

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb

E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

R-Biopharm AG switchboard

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

Order department

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

E-mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & sales

E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup>, RIDASCREEN<sup>®</sup> und RIDASOFT<sup>®</sup>  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA<sup>®</sup>, RIDASCREEN<sup>®</sup> and RIDASOFT<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG.  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Tetracyclin (Art. Nr. R3505) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Milchpulver, Käse, Joghurt, Honig, Fleisch, Fisch, Shrimps und Vollei (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:       Milch, Honig: Verdünnung  
                                  Milchpulver: Rekonstituierung, Verdünnung  
                                  Käse: Homogenisierung, Extraktion  
                                  Joghurt: Inkubation, Zentrifugation, Verdünnung  
                                  Fleisch, Fisch, Shrimps, Vollei: Homogenisierung,  
                                  Extraktion

Zeitbedarf:                    Probenvorbereitung (für 10 Proben)

Milch .....	ca. 30 min
Milchpulver .....	ca. 45 min
Käse .....	ca. 90 min
Joghurt .....	ca. 40 min
Honig .....	ca. 30 min
Fleisch .....	ca. 45 min
Fisch, Shrimps .....	ca. 30 min
Vollei.....	ca. 50 min

Testdurchführung (Inkubationszeit).. 1 Std. 30 min

Nachweisgrenze:            Milch       ..... ca. 0,7 µg/l (ppb)  
(Matrix-abhängig)        Milchpulver gelöst..... ca. 0,8 µg/kg  
                                  Käse ..... ca. 1,0 µg/kg || Joghurt ..... | ca. 0,6 µg/kg |
Honig .....	ca. 2,0 µg/kg
Fleisch .....	ca. 0,7 µg/kg
Fisch.....	ca. 1,0 µg/kg
Shrimps .....	ca. 0,5 µg/kg
Vollei.....	ca. 1,2 µg/kg

Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	Milch .....	ca. 111 %
	Milchpulver gelöst.....	ca. 120 %
	Käse .....	ca. 70 %
	Joghurt .....	ca. 95 %
	Honig .....	ca. 98 %
	Fleisch .....	ca. 78 %
	Fisch.....	ca. 74 %
	Shrimps .....	ca. 91 %
	Vollei.....	ca. 56 %
Spezifität:	Tetracyclin (Standardsubstanz) .....	100 %
	Chlortetracyclin .....	ca. 70 %
	Rolitetracyclin .....	ca. 34 %
	Demeclocyclin .....	ca. 26 %
	Oxytetracyclin .....	ca. 13 %
	Minocyclin.....	ca. 3 %
	Doxycyclin .....	ca. 2 %

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

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Tetracyclin

RIDA® Tetracyclin Dotierlösung (Art. Nr. R3599)

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Tetracyclin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Milchpulver, Käse, Joghurt, Honig, Fleisch, Fisch, Shrimps und Vollei.

## 2. Allgemeines

Aureomycin (Chlortetracyclin) wurde 1948 von Duggan als Stoffwechselprodukt der Aktinomycetenspezies *Streptomyces aureofaciens* isoliert. Dies war das erste Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline. In Deutschland sind Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin in der Veterinärmedizin zugelassen. Deshalb können Gesundheitsgefährdungen für den Verbraucher entstehen.

Nach EU-Recht, Verordnung Nr. 37/2010 sind für Tetracyclin (die Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer) in allen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten folgende Rückstandshöchstmengen festgelegt: 100 µg/kg im Muskel und in Milch.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit einem Tetracyclin-Protein-Konjugat beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung sowie anti-Tetracyclin-Antikörper. Freies und immobilisiertes Tetracyclin konkurrieren um die Tetracyclin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift werden enzymmarkierte Sekundärantikörper (Konjugat) hinzugegeben, die an die gebundenen anti-Tetracyclin-Antikörper binden. Nicht gebundene, enzymmarkierte Antikörper werden 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 Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Tetracyclin-Konzentration in der Probe.

## 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Sample buffer 1</b> Probenpuffer 1	Weiß	Gebrauchsfertig		60 ml
<b>Sample buffer 2</b> Probenpuffer 2	Braun	Gebrauchsfertig		60 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	Weiß	Konzentrat 10x	0 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	Weiß	Konzentrat 10x	0,5 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	Weiß	Konzentrat 10x	1,5 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	Weiß	Konzentrat 10x	3 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	Weiß	Konzentrat 10x	6 µg/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	Weiß	Konzentrat 10x	18 µg/l	1,3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b> Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen		
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	Schwarz	Gebrauchsfertig		6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von  $\pm 0,01$  g)
- Mixer (Stomacher, Ultra-Turrax oder Homogenisator; für Fleisch-, Fisch-, Shrimpproben)
- Zentrifuge (mind. 3000 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler

- Wasserbad (60 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers) (für Joghurtproben)
- Optional: Ultraschallbad (für Milchpulver- und Honigproben)
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

## 5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser

Für Honig-, Fleisch-, Fisch- und Shrimpproben:

- 20 mM PBS-Puffer:  
0,55 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  + 2,85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  + 9 g NaCl, pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, ad 1000 ml dest. Wasser

Für Käseproben:

- Methanol 10 % (v/v)

Für Fleischproben:

- n-Hexan

Für Volleipproben:

- 50 mM Bernsteinsäure-Puffer:  
5,9 g Bernsteinsäure in 500 ml dest. Wasser lösen, mit 1 N NaOH auf pH 4,0 einstellen und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

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

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, siehe Kapitel 10.2. Testdurchführung) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

## **7. Reagenzien und ihre Lagerung**

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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

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

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

## **8. Anzeichen für Reagenzienverfall**

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für Standard 1



## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1 Milch

#### Milch mit Fettgehalt > 1,5 %

- Fetthaltige Milch zum Entfetten zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / 10 °C (ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, sollte die Milchprobe vor der Zentrifugation auf 10 °C abgekühlt werden)
- Anschließend die obere Fettschicht vollständig entfernen (z. B. Absaugen mit einer Pasteurpipette) und die entfettete Milch in einem neuen Gefäß 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- Pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

#### Milch mit Fettgehalt ≤ 1,5 %

- Magermilchproben 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- Pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

### 9.2 Milchpulver

- 10 g Milchpulver abwiegen und destilliertes Wasser (vortemperiert auf 60 °C) bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml hinzufügen
- 10 min schütteln / rotieren, ggf. länger bis sich das Milchpulver vollständig gelöst hat
- Optional für schwer lösliche Milchpulver: 3 min in einem Ultraschallbad inkubieren
- Zentrifugieren: 10 min / 3.500 g / 10 °C
- Anschließend die obere Fettschicht vollständig entfernen (z. B. Absaugen mit einer Pasteurpipette) und die entfettete Milch in einem neuen Gefäß 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- Pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

### 9.3 Käse

- Zu 5 g Käse 20 ml Methanol 10 % (v/v) hinzugeben
- Probe homogenisieren (Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- Die homogenisierte Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 10 min über Kopf schütteln
- Zentrifugieren: 15 min / 3.000 g / 4 °C

- 1 ml der mittleren wässrigen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugieren: 5 min / 20.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand 1:5 (1+4) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 100 µl Überstand + 400 µl Probenpuffer 2)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### 9.4 Joghurt

- 5 g der Probe in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 15 min bei 50 °C inkubieren (z. B. in einem Wasserbad)
- Vortexen bis die Probe vollständig homogenisiert ist
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / 10 °C
- Den Überstand 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Überstand + 450 µl Probenpuffer 2)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### 9.5 Honig

- 1 g Honig in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 1:50 (1+49) mit 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4 (siehe Kapitel 5.2.) verdünnen (z. B. 1 g Honig + 50 ml 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4)
- Optional für schwer lösliche Honigproben: 5 min in einem Ultraschalbad inkubieren
- 2 min intensiv vortexen
- Vor dem Einsatz der Proben die Probengefäße kurz „über Kopf“ schwenken
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### 9.6 Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel)

- Probe homogenisieren (Fleischwolf, Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- 1 g der homogenisierten Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 9 ml 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4 (siehe Kapitel 5.2.) hinzugeben
- Probe und Puffer mischen (Vortex)
- 10 min extrahieren (Schüttler)
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml des Überstandes in ein frisches Gefäß überführen
- 2 ml Hexan zugeben
- 10 s vortexen
- Zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

## 9.7 Fisch und Shrimps

- Probe homogenisieren (Fleischwolf, Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- 1 g homogenisierte Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 9 ml 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4 (siehe Kapitel 5.2.) hinzugeben
- Probe und Puffer mischen (Vortex)
- Zur Extraktion 10 min schütteln / rotieren
- Zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der oberen wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

## 9.8 Vollei

- Eiweiß und Eigelb von einem Ei vollständig homogenisieren
- 4 g der Mischung in ein 50 ml Propylengefäß überführen und 20 ml 50 mM Bernsteinsäure-Puffer hinzugeben
- Schütteln oder rotieren: 15 min / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Zentrifugieren: 15 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Den Überstand 1:10 (1+9) mit 20 mM PBS-Puffer verdünnen (z. B. 100 µl Überstand + 900 µl 20 mM PBS-Puffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1 Testvorbereitungen

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

Die **Standards** liegen als Konzentrat vor. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Tetracyclin-Standards je 50 µl Konzentrat mit 450 µl **Probenpuffer** verdünnen (Verdünnung 1:10) und gut mischen. Es sollten keine Plastik-, sondern Glasgefäße verwendet werden.

Für Honig-, Fleisch-, Fisch-, Shrimp- und Volleiprüben bitte **Probenpuffer 1** zur Verdünnung der Standards verwenden.

Für Milch- und Milchpulver, Käse-, und Joghurtproben bitte **Probenpuffer 2** zur Verdünnung der Standards verwenden.

Standard 1:	50 µl Standardkonzentrat (0 µg/l)	+ 450 µl Puffer	0 µg/l
Standard 2:	50 µl Standardkonzentrat (0,5 µg/l)	+ 450 µl Puffer	0,05 µg/l
Standard 3:	50 µl Standardkonzentrat (1,5 µg/l)	+ 450 µl Puffer	0,15 µg/l
Standard 4:	50 µl Standardkonzentrat (3 µg/l)	+ 450 µl Puffer	0,3 µg/l
Standard 5:	50 µl Standardkonzentrat (6 µg/l)	+ 450 µl Puffer	0,6 µg/l
Standard 6:	50 µl Standardkonzentrat (18 µg/l)	+ 450 µl Puffer	1,8 µg/l

**Die Standards müssen für jede Versuchsreihe frisch hergestellt werden.**

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe Kapitel 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

## 10.2 Testdurchführung

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

Es wird empfohlen den Antikörper, das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der vorverdünnten Standards bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren,
3. Je 50 µl anti-Tetracyclin-Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 1 h 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
5. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf

saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).

7. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

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

## 12. Interpretation der Ergebnisse

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Tetracyclin-Konzentration in µg/l (µg/kg) 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, Joghurt, Fleisch,	
Shrimp, Fisch.....	10
Milchpulver .....	10
Käse .....	25
Honig .....	50
Vollei.....	60

### 13. Grenzen der Methode

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

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

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

### 14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Antibiotikafreie und Antibiotika-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt<sup>®</sup> / Bolt<sup>™</sup>) sich an [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de) zu wenden.









**Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).**

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2011-05-23	Freigabeversion
2015-10-30	Generelle Überarbeitung
2021-12-16	Generelle Überarbeitung Vorgenommene Änderungen <ul style="list-style-type: none"><li>– Revalidierung des Tests: die Matrices Wurst, Butter, Quark, Fruchtojoghurt, Kefir, Sahne und Saure Sahne wurden nicht berücksichtigt</li><li>– 4. Testinhalt: Abfüllmenge für Konjugat und Substrat/Chromogen wurde von 10 mL auf 13 mL erhöht</li><li>– Ergänzungen in den Kapiteln 6 und 7</li><li>– Neu: Kapitel 13. Grenzen der Methode und 14. Empfehlung</li></ul>
2023-01-09	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"><li>– Fehlerkorrektur in Kapitel 10.2: das Konjugat liegt gebrauchsfertig vor</li></ul>

## Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

## Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.



# RIDASCREEN® Tetracyclin

## Brief information

RIDASCREEN® Tetracyclin (Art. No. R3505) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracyclins in milk, milk powder, cheese, yoghurt, honey, meat, fish, shrimp and whole egg.  
(see chapter 1. Intended use).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:           milk, honey: dilution  
  milk powder: reconstitution, dilution  
  cheese: homogenization, extraction  
  yoghurt: incubation, centrifugation, dilution  
  honey: dissolve  
  meat, fish, shrimp, whole egg: homogenization,  
  extraction

Time requirement:           sample preparation (for 10 samples)  
  milk ..... approx. 30 min  
  milk powder ..... approx. 45 min  
  cheese ..... approx. 90 min  
  yoghurt ..... approx. 40 min  
  honey ..... approx. 30 min  
  meat ..... approx. 45 min  
  fish, shrimp ..... approx. 30 min  
  whole egg ..... approx. 50 min  
  test implementation (incubation time) ... 1 h 30 min

Limit of detection:           milk ..... approx. 0.7 µg/L  
(depending on matrix)   milk powder ..... approx. 0.8 µg/kg  
  cheese ..... approx. 1.0 µg/kg  
  yoghurt ..... approx. 0.6 µg/kg  
  honey ..... approx. 2.0 µg/kg  
  meat ..... approx. 0.7 µg/kg  
  fish ..... approx. 1.0 µg/kg  
  shrimp ..... approx. 0.5 µg/kg  
  whole egg ..... approx. 1.2 µg/kg

Recovery rate: (corresponding to the Standard substance)	milk .....	approx. 111 %
	milk powder .....	approx. 120 %
	cheese .....	approx. 70 %
	yoghurt .....	approx. 95 %
	honey.....	approx. 98 %
	meat .....	approx. 78 %
	fish .....	approx. 74 %
	shrimp.....	approx. 91 %
	whole egg .....	approx. 56 %
Specificity:	Tetracycline (standard substance).....	100 %
	Chlortetracycline .....	approx. 70 %
	Rolitetracycline .....	approx. 34 %
	Demeclocycline .....	approx. 26 %
	Oxytetracycline .....	approx. 13 %
	Minocycline.....	approx. 3 %
	Doxycycline .....	approx. 2 %

The specificity of the RIDASCREEN® Tetracyclin test was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

### **Related product and accessories for tetracyclin determination**

RIDA® Tetracyclin Spiking solution (Art. No. R3599)

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Tetracyclin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracyclins in milk, milk powder, cheese, yoghurt, honey, meat, fish, shrimp and whole egg.

## 2. General information

Aureomycin (chlortetracycline) was isolated 1948 by Duggan as a metabolite of the actinomyces species *streptomyces aureofaciens*. This was the first antibiotic substance of the group of tetracyclines. In Germany tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline are authorized for veterinary use. Therefore health risks for the consumer can occur.

In all animal species used for food production, tetracycline residues (sum of parent substance and 4-epimer) are limited in the EU law, commission regulation (EU) No 37/2010 with the following limits: 100 µg/kg in muscle and in milk.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with tetracycline-protein-conjugate. Tetracycline standards or sample solutions and anti-tetracycline antibodies are added. Free tetracycline and immobilized tetracycline compete for the tetracycline antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound antibody is then removed in a washing step and enzyme labeled secondary antibody (conjugate), which is directed against the anti-tetracycline antibody, is added. After removing unbound enzyme labeled antibodies by a washing step, substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound 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 tetracycline concentration in the sample.

## 4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Sample buffer 1	White	Ready to use		60 mL
Sample buffer 2	Brown	Ready to use		60 mL
Standard 1	White	Concentrate 10x	0 µg/L	1.3 mL
Standard 2	White	Concentrate 10x	0.5 µg/L	1.3 mL
Standard 3	White	Concentrate 10x	1.5 µg/L	1.3 mL
Standard 4	White	Concentrate 10x	3 µg/L	1.3 mL
Standard 5	White	Concentrate 10x	6 µg/L	1.3 mL
Standard 6	White	Concentrate 10x	18 µg/L	1.3 mL
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	Red	Ready to use		13 mL
Antibody	Black	Ready to use		6 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mixer (Stomacher, ultra turrax; for meat, fish, and shrimp samples)
- Centrifuge (at least 3,000 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer) (for yoghurt samples)
- ultrasonic bath (optional for milk powder and honey samples)
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

## 5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water

For honey, meat, fish and shrimp samples:

- 20 mM PBS buffer: 0.55 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  + 2.85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  + 9 g NaCl, adjust pH to 7.4 with 1 M NaOH, fill up to 1000 mL with distilled water

For cheese samples:

- methanol 10 % (v/v)

For meat samples:

- n-hexane

For whole egg samples:

- 50 mM succinic acid buffer: dissolve 5.9 g of succinic acid in 500 mL of distilled water, adjust pH to 4.0 with 1 N NaOH, fill up to 1000 mL with distilled water

## 6. Warnings and precautions for the users

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

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

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

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2.). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

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

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

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

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for standard 1

## 9. Sample preparation

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

### 9.1 Milk

#### Milk with fat content > 1.5 %:

- Centrifuge fatty milk samples: 10 min / 3,000 g / 10 °C (50 °F)  
(if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to 10 °C (50 °F) prior to centrifugation)
- Remove the upper cream layer completely (e.g. with a pasteur pipette) and dilute the resulting skimmed milk 1:10 (1+9) with sample buffer 2 in a new vial (e. g. 50 µL milk + 450 µL sample buffer 2)
- Use 50 µL per well in the assay

#### Milk with fat content ≤ 1.5 %:

- Dilute skimmed milk samples 1:10 (1+9) with sample buffer 2  
(e. g. 50 µL milk + 450 µL sample buffer 2)
- Use 50 µL per well in the assay

## 9.2 Milk powder

- Weigh 10 g of milk powder and add pre-warmed distilled water (60 °C / 140 °F) to a final volume of 100 mL
- Shake / rotate for 10 min or longer until milk powder is dissolved completely optional for milk powders which do not dissolve easily: incubate for 3 min in an ultrasonic bath
- Centrifuge: 10 min / 3,500 g / 10 °C (50 °F)
- Remove the upper cream layer completely (e.g. with a pasteur pipette) and dilute the resulting skimmed milk 1:10 (1+9) with sample buffer 2 in a new vial (e. g. 50 µL milk + 450 µL sample buffer 2)
- Use 50 µL per well in the assay

## 9.3 Cheese

- Add 20 mL of methanol 10 % (v/v) to 5 g of cheese
- Homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- Transfer the homogenized sample into a 50 mL centrifugal vial
- Shake 10 min upside-down
- Centrifuge: 15 min / 3,000 g / 4 °C (39.2 °F)
- Transfer 1 mL of the aqueous (middle) phase into a 1.5 mL vial
- Centrifuge 5 min / 20,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Dilute supernatant 1:5 (1+4) in sample buffer 2 (e.g. 100 µL supernatant + 400 µL sample buffer 2)
- Use 50 µL per well in the assay

## 9.4 Yoghurt

- Transfer 5 g of the sample into a centrifugal vial
- Incubate the sample for 15 min at 50 °C (122 °F), e.g. in a waterbath
- Vortex until the sample is homogenized completely
- Centrifuge: 10 min / 4000 g / 10 °C (50 °F)
- Dilute the supernatant 1:10 (1+9) with sample buffer 2 (e. g. 50 µL supernatant + 450 µL sample buffer 2)
- Use 50 µL per well in the assay

## 9.5 Honey

- Weigh 1 g of honey in a centrifugal vial
- Dilute 1:50 (1+49) with 20 mM PBS buffer, pH 7.4 (see chapter 5.2.) (e.g. 1 g honey + 50 ml 20 mM PBS buffer, pH 7.4)
- Optional for honey samples which do not dissolve easily: incubate 5 min in an ultrasonic bath
- Mix intensively for 2 min on a vortex

- Before use in the test shake the vials upside down briefly
- Use 50 µL per well in the assay

### 9.6 Meat (beef, pork, poultry)

- Homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- Transfer 1 g of the homogenized sample into a centrifugal vial and add 9 ml 20 mM PBS buffer pH 7.4 (see chapter 5.2.)
- Vortex sample and buffer
- Shake 10 min for extraction
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Transfer 1 mL of supernatant into a new vial
- Add 2 mL of hexane
- Vortex for 10 s
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 µL of the lower aqueous phase per well in the assay

### 9.7 Fish and shrimp

- Homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- Transfer 1 g of the homogenized sample into a centrifugal screw cap vial and add 9 mL 20 mM PBS buffer pH 7.4 (see 5.2.)
- Vortex sample and buffer
- Shake/rotate the sample for 10 min for extraction
- Centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Use 50 µL of the upper aqueous phase per well in the assay

### 9.8 Whole egg

- Homogenize egg yolk and egg white of one egg thoroughly
- Transfer 4 g of the mixed egg into a 50 mL polypropylene vial and add 20 ml of 50 mM succinic acid buffer
- Mix 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) by shaking / rotating
- Centrifuge: 15 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Dilute supernatant 1:10 (1+9) with 20 mM PBS buffer, pH 7.4 (e.g. 100 µL of supernatant + 900 µL 20 mM PBS buffer, H 7.4)
- Use 50 µL per well in the assay



## 10. Test procedure

### 10.1 Test preparation

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

The **standards** are provided as concentrates. In order to produce tetracycline standards ready to use, dilute 50 µL standard concentrate with 450 µL **sample buffer** in each case (1:10 dilution) and mix thoroughly. Use glass vials.

For honey, meat, fish, shrimp and whole egg samples use **sample buffer 1** for dilution of concentrates.

For milk, milk powder, cheese and yoghurt, use **sample buffer 2** for dilution of concentrates.

Standard 1:	50 µL standard concentrate (0 µg/L) + 450 µL buffer	0 µg/L
Standard 2:	50 µL standard concentrate (0.5 µg/L) + 450 µL buffer	0.05 µg/L
Standard 3:	50 µL standard concentrate (1.5 µg/L) + 450 µL buffer	0.15 µg/L
Standard 4:	50 µL standard concentrate (3 µg/L) + 450 µL buffer	0.3 µg/L
Standard 5:	50 µL standard concentrate (6 µg/L) + 450 µL buffer	0.6 µg/L
Standard 6:	50 µL standard concentrate (18 µg/L) + 450 µL buffer	1.8 µg/L

**The standards must be prepared freshly for each test series.**

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**, please use the washing buffer salt (pouch) contained in the kit (see chapter 4.). Dissolve the total content of the pouch in one liter of distilled water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 100 mL of distilled water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

## 10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps.

It is recommended to pipette the antibody, the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore covering the microtiter plates is recommended.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 50  $\mu\text{L}$  of each diluted standard or sample (prepared according to chapter 9.) in duplicate to the wells,
3. Add 50  $\mu\text{L}$  of anti-tetracycline antibody to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25  $^{\circ}\text{C}$  / 68 - 77  $^{\circ}\text{F}$ ).
4. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250  $\mu\text{L}$  diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
5. Add 100  $\mu\text{L}$  of the conjugate to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25  $^{\circ}\text{C}$  / 68 - 77  $^{\circ}\text{F}$ ).
6. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250  $\mu\text{L}$  diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
7. Add 100  $\mu\text{L}$  of substrate/chromogen to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25  $^{\circ}\text{C}$  / 68 - 77  $^{\circ}\text{F}$ ) in the dark.
8. Pipette 100  $\mu\text{L}$  of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

## 11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

For the evaluation it should be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

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

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates semilogarithmic against the tetracycline concentration [ $\mu\text{g/L}$ ].

## 12. Result interpretation

In order to obtain the tetracycline concentration in  $\mu\text{g/L}$  ( $\mu\text{g/kg}$ ) 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, yoghurt, meat, shrimp, fish.....	10
milk powder .....	10
cheese .....	25
honey .....	50
whole egg.....	60

## 13. Limits of the method

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

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

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product categories could be validated due to the large number of foods. When analyzing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results obtained by means of spike experiments. If necessary, a validation of the sample matrix of interest will need to be performed.

## 14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Antibiotic-free and antibiotic containing (spiked) samples should be used.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjust the sample's pH value (pH 6.5 - 7.5) to neutral prior to extraction.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.
- To contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

**For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).**

## Version overview

Version number	Chapter and title
2011-05-23	Release version
2015-10-30	General revision
2021-12-16	General revision Changes made: <ul style="list-style-type: none"><li>– Revalidation of the test: the matrices sausage, butter, curd, yoghurt with fruits, kefir, cream and sour cream were not considered</li><li>– 4. Reagents provided: amount of conjugate and substrate/chromogen was increased from 10 mL to 13 mL</li><li>– Additions in chapters 6 and 7</li><li>– New: Chapters 13. Limitations of the method and 14. Recommendation</li></ul>
2023-01-09	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none"><li>– Mistake correction in chapter 10.2: conjugate is ready to use</li></ul>

## Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

## Disclaimer

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

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

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

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

### **R-Biopharm AG**

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch,

Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321