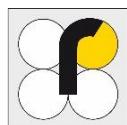


r-biopharm®



RIDASCREEN® Tetracycline Plus

REF R3506

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 - 46 °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

Marketing & Vertrieb

E-Mail: 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

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Tetracycline Plus (Art. Nr. R3506) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Fleisch, Fisch, Shrimps, Honig und Ei (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Abgesehen von destilliertem oder deionisiertem Wasser und Methanol, sind alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren und extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 30 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

Nachweisgrenze:
(Matrix-abhängig)

Milch	ca. 1,4 µg/l (ppb)
Fleisch	ca. 1,7 µg/kg (ppb)
Shrimps, Fisch	ca. 1,7 µg/kg (ppb)
Honig	ca. 0,8 µg/kg (ppb)
Ei	ca. 0,9 µg/kg (ppb)

Nachweisvermögen (CC β): Milch ca. 5 µg/kg (ppb)
Fleisch ca. 5 µg/kg (ppb)
Shrimps, Fisch ca. 5 µg/kg (ppb)
Honig ca. 5 µg/kg (ppb)
Ei ca. 5 µg/kg (ppb)

Wiederfindungsrate:
(bezogen auf die
Standardsubstanz)

Milch	ca. 110%
Fleisch	ca. 95 %
Shrimps, Fisch	ca. 95 %
Honig	ca. 95 %
Ei	ca. 90 %

Spezifität:

Tetracyclin (Standardsubstanz)	100 %
4-epi-Tetracyclin	ca. 70 %
Oxytetracyclin	ca. 59 %
4-epi-Oxytetracyclin	ca. 42 %
Chlortetracyclin	ca. 57 %
4-epi-Chlortetracyclin	ca. 33 %

Doxycyclin	ca. 24 %
Demeclocyclin.....	ca. 50 %
Minocyclin	<1 %

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Tetracycline Plus 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 Tetracycline

R3598 RIDA® Tetracycline Spiking solution

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Tetracycline Plus (Art. Nr. R3506) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Fleisch, Fisch, Shrimps, Honig und Ei.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrices entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

2. Allgemeines

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

Muskel	100 µg/kg
Milch	100 µg/kg
Ei	200 µg/kg

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen Tetracyclin beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probenlösungen sowie enzymmarkiertes Tetracyclin (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes Tetracyclin konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Tetracyclin wird anschließend in einem Waschschritt wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes 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	
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig	1 Platte	96 Kavitäten
Sample dilution buffer Puffer	Transparent	Konzentrat	4x	22 ml
Standard Standard	Schwarz	Lyophilisiert	2 Fläschchen, 3 µg/l	2 ml (nach Rekonstitution)
Wash buffer salt Tween Washpuffer	-	Salz zum Auflösen	1 Briefchen	1 l (nach Auflösen)

Conjugate Konjugat	Blau	Lyophilisiert	1 Fläschchen	6 ml (nach Rekonstitution)
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig	1 Fläschchen	14 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig	1 Fläschchen	13 ml
Extraction buffer Extraktionspuffer	Transparent	Gebrauchsfertig	1 Fläschchen	90 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Abzug
- Vortex Mixer
- Zentrifuge (mind. 4000 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 15 ml Reagenzröhrchen von Greiner)
- Schüttler
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 μ l und 200 - 1000 μ l Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 - 300 μ l
- Gegebenenfalls: Multipipette mit 2,5 mL Kombitips
- Aluminiumfolie oder Parafilm
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser oder deionisiertes Wasser
- Methanol

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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

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

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, sowie gegebenenfalls zusätzliche Mikrotiterplatte zum Vorpipettieren, 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 Substrates/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Absorption kleiner 0,8 ($A_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

9.1 Fleisch, Fisch, Shrimps und Ei

- 1 Gramm der homogenisierten Fleisch-, Fisch-, Shrimps- oder Eierprobe abwiegen.
- 2 ml Methanol zugeben und 1 Minute lang vortexen.
- 1 ml Extraktionspuffer zugeben, kurz vortexen und 5 Minuten lang über Kopf mischen.
- 5 Minuten lang bei 4000 g zentrifugieren (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Verdünnen Sie die obere Methanolschicht 1:10 (1 + 9) mit dem Probenverdünnungspuffer (z. B. 30 µl obere Schicht + 270 µl Probenverdünnungspuffer)
- Gut mischen und 50 µl pro Kavität direkt im Test verwenden.

9.2 Honig

- 1 Gramm Honig abwiegen, 1 ml Wasser hinzufügen und gut mischen, bis der Honig gelöst ist.
- 2 ml Methanol zugeben und 1 Minute lang vortexen.
- 1 ml Extraktionspuffer zugeben, kurz vortexen und 5 Minuten lang über Kopf mischen.
- 5 Minuten lang bei 4000 g zentrifugieren (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Verdünnen Sie die obere Methanolschicht 1:10 (1 + 9) mit dem Probenverdünnungspuffer (z. B. 30 µl obere Schicht + 270 µl Probenverdünnungspuffer)
- Gut mischen und 50 µl pro Kavität direkt im Test verwenden.

9.3 Milch*

- 1 ml Milch pipettieren.
- 2 ml Methanol zugeben und 1 Minute lang vortexen.
- 1 ml Extraktionspuffer zugeben, kurz vortexen und 5 Minuten lang über Kopf mischen.

- 5 Minuten lang bei 4000 g zentrifugieren (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Verdünnen Sie die obere Methanolschicht 1:10 (1 + 9) mit dem Probenverdünnungspuffer (z. B. 30 µl obere Schicht + 270 µl Probenverdünnungspuffer)
- Gut mischen und 50 µl pro Kavität direkt im Test verwenden.

* Im Falle von Milchpulver bereiten Sie flüssige Milch nach den Anweisungen des Herstellers zu. Wenn die Anweisungen nicht bekannt sind, verdünnen Sie das Milchpulver 10-fach in Wasser (z.B. 10 g bis zu einem Volumen von 100 ml). Berücksichtigen Sie bei der Berechnung der Konzentration pro Gramm der Probe den zusätzlichen Verdünnungsfaktor, der bei der Herstellung der Milch aus Pulver verwendet wird.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der Probenverdünnungspuffer wird als 4-faches Konzentrat geliefert. Das Konzentrat wird 4-fach mit destilliertem Wasser verdünnt (z.B. 5 ml Probenverdünnungspufferkonzentrat + 15 ml destilliertes Wasser). Der verdünnte Probenverdünnungspuffer sollte vor der Analyse frisch zubereitet werden.

Der Standardverdünnungspuffer wird zur Verdünnung der Standards benötigt. Dieser Puffer enthält 10 % Methanol. Bereiten Sie den Standardverdünnungspuffer frisch vor der Verwendung zu (z. B. 1 ml Methanol + 9 ml Probenverdünnungspuffer). Gut mischen.

Das Konjugat wird lyophilisiert geliefert. 6 ml des Probenverdünnungspuffers in das Konjugatfläschchen geben und mischen. Das rekonstituierte Konjugat ist bei - 20 °C (- 4 °F) für mindestens 3 Monate stabil.

Die Standards werden lyophilisiert geliefert. Bereiten Sie eine Verdünnungsreihe von Tetracyclin-Standards vor. Die rekonstituierten Standards sind bei - 20 °C (- 4 °F) für mindestens 3 Monate stabil. 2 ml des Standardverdünnungspuffers in das Tetracyclin-Standardfläschchen geben und mischen. Diese Lösung enthält eine Tetracyclin-Konzentration von 3 µg/l. Pipettieren Sie 0,5 ml dieser Lösung in ein sauberes Röhrchen und fügen Sie 0,5 ml des Standardverdünnungspuffers hinzu. Fahren Sie fort, um einen Verdünnungsbereich von 1,5, 0,75, 0,38 und 0,19 µg/l herzustellen. Verwenden Sie den Standardverdünnungspuffer direkt als Nullstandard.

Als Waschpuffer wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, bitte verwenden Sie das im Kit enthaltene Waschpuffersalz (Beutel) (siehe Kapitel 4. Mitgelieferte Reagenzien). Lösen Sie den gesamten Inhalt des Beutels in einem Liter destilliertem Wasser auf. Der gebrauchsfertige Waschpuffer ist bei 2 - 8 °C (36 - 46 °F) ca. 4 - 6 Wochen haltbar.

Alternativ dazu: Lösen Sie den Inhalt des Beutels in 100 ml destilliertem Wasser auf, um einen 10-fach konzentrierten Waschpuffer zu erhalten. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert nach ca. 8 - 12 Wochen haltbar. Verwenden Sie einen Teil dieses Konzentrats und lösen Sie es mit 9 Teilen destilliertem Wasser auf, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer zu erhalten.

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.

Standardlösungen und Proben müssen gleichzeitig auf einer Mikrotiterplatte getestet werden. Befolgen Sie sorgfältig das empfohlene Waschverfahren. Mikrotiterplatten zwischen den Arbeitsschritten nicht trocknen lassen.

Es wird empfohlen 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 benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards (0 - 0,19 - 0,38 - 0,75 - 1,5 - 3 µg/l) bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jede Probe/ jeden Standard muss eine neue Pipettenspitze verwendet werden.
3. Je 50 µl verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1 Testvorbereitungen) befüllen

- und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
5. 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.
 6. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 5 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 Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Fit erfolgen.

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:

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

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Absorptionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem halblogarithmisch 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	20
Fleisch	20
Fisch	20
Shrimps	20
Honig	20

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.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven / erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

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 außerdem empfohlen:

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.

- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2024-12-10	Freigabeversion

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

 [i]	Gebrauchsanweisung beachten
 [LOT]	Chargennummer
 [Σ]	Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)
 [T]	Lagertemperatur
 [REF]	Artikelnummer
 [Σ]	Anzahl Testbestimmungen
 [M]	Herstell datum (YYYY-MM-DD)
 [M]	Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellerseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDASCREEN® Tetracycline Plus

Brief information

RIDASCREEN® Tetracycline Plus (Art. No. R3506) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracycline and its analogues in milk, meat, fish, shrimps, honey and eggs (see chapter 1. Intended use).

Apart from distilled water or deionized water and methanol, 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: homogenization and extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples) ... approx. 30 min
test implementation (incubation time) 45 min

Limit of detection:
(depending on matrix)

Milk	approx. 1.4 µg/L (ppb)
Meat	approx. 1.7 µg/kg (ppb)
Shrimps, Fish	approx. 1.7 µg/kg (ppb)
Honey	approx. 0.8 µg/kg (ppb)
Egg	approx. 0.9 µg/kg (ppb)

Detection capability (CC β): Milk approx. 5 µg/kg (ppb)
Meat approx. 5 µg/kg (ppb)
Shrimps, Fish approx. 5 µg/kg (ppb)
Honey approx. 5 µg/kg (ppb)
Egg approx. 5 µg/kg (ppb)

Recovery rate:
(corresponding to the
Standard substance)

Milk	approx. 110 %
Meat	approx. 95 %
Shrimps, Fish	approx. 95 %
Honey	approx. 95 %
Egg	approx. 90 %

Specificity: Tetracycline (Standard substance) 100 %

4-epi-Tetracyclin.....	approx. 70 %
Oxytetracyclin	approx. 59 %
4-epi-Oxytetracyclin.....	approx. 42 %
Chlortetracyclin.....	approx. 57 %
4-epi-Chlortetracyclin.....	approx. 33 %
Doxycyclin	approx. 24 %
Demeclocyclin.....	approx. 50 %
Minocyclin	<1 %

Further information is contained in the validation report.

The specificity of the RIDASCREEN® Tetracycline Plus 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 (LoD) 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 tetracycline determination

R3598 RIDA® Tetracycline Spiking solution

1. Intended use

RIDASCREEN® Tetracycline Plus (Art. No. R3506) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracyclines in milk, meat, fish, shrimps, honey and egg.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report.

2. General information

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:

Muscle	100 µg/kg
Milk	100 µg/kg
Egg	200 µg/kg

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against tetracycline.

Tetracycline standards or sample solutions and tetracycline enzyme conjugate are added. Free tetracycline and tetracycline enzyme conjugate compete for the tetracycline antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound enzyme 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 absorbance 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	1 plate	96 wells
Sample dilution buffer	transparent	4-fold concentrate	1 bottle	22 mL
Standard	black	lyophilized	2 vials, 3 µg/L	2 mL (after reconstitution)
Wash buffer salt Tween	-	salt for dissolving	1 pouch	1 L (after dissolving)
Conjugate	blue	lyophilized	1 vial	6 mL (after reconstitution)
Stop solution	yellow	ready to use	1 bottle	14 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready to use	1 bottle	13 mL
Extraction buffer	transparent	ready to use	1 bottle	90 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 mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Fume hood
- Vortex mixer
- Centrifuge (at least 4,000 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 15 mL centrifuge tubes from Greiner)
- Shaker
- Graduated pipettes
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- If available: 8-channel micropipette 100 - 300 µL
- If available: microtiter plate shaker
- Multipipette with 2.5 ml combi tips
- Aluminum foil or parafilm
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Methanol

6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

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

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

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate, see chapter 10.2 Test procedure). 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 (36 - 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 (36 - 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 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 1

9. Sample preparation

9.1 Meat, fish, shrimps and egg

- Weigh 1 gram of homogenized meat, fish, shrimps or egg sample.
- Add 2 mL of methanol and vortex for 1 minute.
- Add 1 mL of extraction buffer, shortly vortex and mix head over head for 5 minutes.
- Centrifuge for 5 minutes at 4000 g (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Dilute the upper methanol layer 1:10 (1 + 9) in the sample dilution buffer (e. g. 30 µL upper layer + 270 µL sample dilution buffer)
- Mix and use 50 µL per well in the assay.

9.2 Honey

- Weigh 1 gram of the sample and add 1 mL of water, mix well until dissolved.
- Add 2 mL of methanol and vortex for 1 minute.
- Add 1 mL of extraction buffer, shortly vortex and mix head over head for 5 minutes.
- Centrifuge for 5 minutes at 4000 g (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Dilute the upper methanol layer 1:10 (1 + 9) in the sample dilution buffer (e. g. 30 µL upper layer + 270 µL sample dilution buffer)
- Mix and use 50 µL per well in the assay.

9.3 Milk*

- Pipette 1 mL of milk.
- Add 2 mL of methanol and vortex for 1 minute.
- Add 1 mL of extraction buffer, shortly vortex and mix head over head for 5 minutes.
- Centrifuge for 5 minutes at 4000 g (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Dilute the upper methanol layer 1:10 (1 + 9) in the sample dilution buffer (e. g. 30 µL upper layer + 270 µL sample dilution buffer)

- Mix and use 50 µL per well in the assay.

* In the case of milk powder, prepare liquid milk according to the manufacturer's instructions. If the instructions are not known, dilute the milk powder 10-fold in water (e.g. 10 g up to a volume of 100 ml). When calculating the concentration per gram of the sample, account for the additional dilution factor used in preparing the milk from powder.

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The sample dilution buffer is provided as a 4-fold concentrate. The concentrate is diluted 4 times with distilled water (e.g. 5 mL sample dilution buffer concentrate + 15 mL distilled water). The diluted sample dilution buffer should be prepared fresh before the analysis.

The standard dilution buffer is needed to dilute the standards. This buffer contains 10 % of methanol. Prepare standard dilution buffer fresh before use (e.g. 1 mL methanol + 9 mL sample dilution buffer). Mix well.

The conjugate is provided lyophilized. Add 6 mL of the sample dilution buffer to the conjugate vial and mix. The reconstituted conjugate is stable at - 20 °C (- 4 °F) for at least 3 months.

The standards are provided lyophilized. Prepare a dilution range of tetracycline standards. The reconstituted standards are stable at - 20 °C (- 4 °F) for at least 3 months. Add 2 mL of the standard dilution buffer to the tetracycline standard vial and mix. This solution contains tetracycline concentration at 3 µg/L. Pipette 0.5 mL of this solution into a clean tube and add 0.5 mL of the standard dilution buffer. Continue to make a dilution range of 1.5, 0.75, 0.38 and 0.19 µg/L. Use standard dilution buffer directly as 0 µg/L standard.

A PBS-Tween buffer is required as wash buffer, please use the wash buffer salt (pouch) contained in the kit (see chapter 4. Reagents provided). Dissolve the content of the pouch in one liter of distilled water. The ready-to-use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the content of the pouch in 100 mL of distilled water to obtain a 10-fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 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 washing buffer.

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

Standards and samples must be tested on one microtiter plate at one time. 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 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, cover the microtiter plates.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µL of each standard (0 – 0.19 – 0.38 – 0.75 – 1.5 – 3 µg/L) or prepared sample in duplicate to the wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µL of conjugate to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Using an 8-channel pipette, fill the wells with ready to use wash buffer (250 µL per well) (see chapter 10.1 Test preparation). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
5. Add 100 µL of the substrate/chromogen to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 100 µL of stop solution to each well (multi-dispenser or 8-channel pipette) and measure the absorbance at 450 nm within 5 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A special software, RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF), is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter function.

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 certificate of analysis (CoA) 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 [µg/kg].

12. Result interpretation

In order to obtain the tetracycline concentration in µg/L (µg/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	20
Meat	20
Fish	20
Shrimps	20
Honey	20
Egg	20

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. If necessary, a validation of the sample matrix of interest will need to be performed.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive / increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance, we recommend analyzing 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.

To ensure a high analytical performance, we recommend:

- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

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

Version overview

Version number	Chapter and title
2024-12-10	Release version

Explanation of symbols

General symbols:

-  Follow the instructions for use
-  Batch number
-  Expiry date (YYYY-MM-DD)
-  Storage temperature
-  Article number
-  Number of test determinations
-  Manufacturing date (YYYY-MM-DD)
-  Manufacturer + address

Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code ("BGB") R-Biopharm AG provides a limited warranty ("Gewährleistung") against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.
ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm's own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
 - a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
 - b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
 - c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
 - d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG's liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG's sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser's expenses, losses, or damages from loss of good will, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements ("Gewährleistung") implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpretation is not intended.

R-Biopharm AG
Postanschrift / Postal Address:
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany
Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /
Chairman of Supervisory Board:
Dr. Ralf M. Dreher
Vorstand / Board of Management:
Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),
Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,
Dr. Frank Vitzthum
Handelsregister / Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt HRB 8321