

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	6
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	8
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	10

CONTENT

1. INTENDED USE	13
2. SUMMARY AND EXPLANATION	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	14
5. KIT COMPONENTS	15
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	16
7. TEST PROCEDURE	17
8. QUALITY CONTROL	19
9. CALCULATION OF RESULTS	19
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20

Инструкция составлена Руководителем отдела контроля качества
ООО «ХЕМА», Тыщенко С. П.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕТРАЦИКЛИНА «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА» предназначен для количественного определения тетрациклинов в пищевых продуктах методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. В директиве ЕС №675/92 (от 18 марта 1992 г.) указано, что общее содержание тетрациклинов в мясе и молоке не должно превышать 100 ppb, в почках, печени и яйцах – не более 600 ppb, 300 ppb и 200 ppb соответственно (единица измерения ppb соответствует мкг/кг для твердых проб и мкг/л для жидких проб).

1.3. Тетрациклин также определяют с помощью ВЭЖХ. Подготовка проб занимает много времени и требует дорогостоящего оборудования. Данный набор достаточно точен и чувствителен, более простой в использовании, занимает меньше времени на исследование, что позволяет проверить большее количество проб.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В данной тест-системе используется принцип непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. В лунки микропланшета, на поверхности которых адсорбирован конъюгат Тетрациклин-белок, вносят исследуемый образец и антитела к тетрациклину. Тетрациклин из образца конкурирует с адсорбированным антигеном за связывание с антителами. После отмывки в реакционный объём добавляется конъюгат противовидовых антител с пероксидазой, который связывается с антителами. После отмывки активность фермента, связанного с поверхностью лунки микропланшета, проявляется и измеряется добавлением хромоген-субстратной смеси, стоп-раствора и фотометрией при 450 нм. Интенсивность цветной реакции обратно пропорциональна количеству антигена в образце. Количество тетрациклинов в пробе определяется по калибровочной кривой, учитывая фактор разведения пробы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения содержания тетрациклина в одном и том же образце с использованием Набора «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА» не превышает 8 %.

3.2. Чувствительность

Минимальная достоверно определяемая Набором «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА» концентрация тетрациклина не превышает 0.3 ppb.

Перекрестная чувствительность:

Тетрациклин	100 %
Ауреомицин	ок. 100 %
Тетрациклин	ок. 58 %
Доксициклин	ок. 76 %
Миноциклин	ок. 76 %
Демеклоциклин	ок. 86 %
Бристацин	ок. 78 %
Другие	менее 1 %

3.3. Предел обнаружения следовых количеств тетрациклинов в образцах молока составляет от 1.5 ppb, в образцах сливок, сметаны, мороженого, меда – 3 ppb.

Примечание: единица измерения ppb соответствует мкг/кг для твердых проб и мкг/л для жидких проб, например, 0.1 ppb = 0.1 мкг/л для проб молока = 0.1 мкг/кг для проб меда.

3.4. Извлекаемость

Мед	95 ±15 %
Молоко, сливки, сметана, мороженое	80 ±20 %

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Количество	Ед.	Описание
1	P904Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	C904XZ	Концентраты калибровочных проб на основе PBS-буфера, содержащие известные количества тетрациклина - 0, 3, 6, 12, 24, 60 ppb, 10-кратные (по 1 мл каждая)	6	шт	прозрачная бесцветная жидкость
3	T904XZ	Концентрат конъюгата, 10-кратный (1,5 мл)	1	шт	прозрачная жидкость розового цвета
4	A904Z	Раствор антител, готов к использованию (7 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
5	SP904Z	Буфер для разведения образцов, готов к использованию (50 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	R055AZ	Субстрат А, готов к использованию (12 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R055BZ	Субстрат В, готов к использованию (0,4 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	S008XZ	Концентрат отмывочного раствора, 21-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
9	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
10	N003	Бумага для клейвления планшета	2	шт	-
11	K904I	Инструкция по применению Набора реагентов «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА»	1	шт	-
12	K904Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Для подготовки образцов используются растворы кислот и щелочей, обладающие раздражающим действием, и метанол, который является ядовитым. При работе с указанными веществами необходимо соблюдать соответствующие правила техники безопасности.

Растворы используемых кислот обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

При приготовлении растворов щелочи всегда всыпайте кристаллы щелочи в воду, а не наоборот. В случае попадания щелочи на кожу пораженный участок стоит промыть сначала водой, а затем разбавленным раствором уксусной кислоты.

5.2. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- ультразвуковая баня;
- шейкер для пробирок;
- вихревой смеситель;
- центрифуга (3000 g);
- аналитические весы (цена деления: 0.01 г);
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 250 мкл;
- градуированная пипетка на 10 мл;
- резиновая груша для пипеток;
- стеклянные пробирки объемом 10 мл;
- полистироловые центрифужные пробирки объемом 2 и 50 мл;
- мерные колбы объемом 100 мл, 1 л.

Реактивы необходимые, но не включенные в Набор:

- натрий фосфорнокислый двухзамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.);
- калий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.);
- хлорид натрия (NaCl , ч.д.а.);

- хлорид калия (KCl, ч.д.а.);
- метанол (CH₃OH, ч.д.а.);
- трихлоруксусная кислота (CHCl₃COOH, ч.д.а.);
- гидроксид натрия (NaOH, ч.д.а.);
- деионизированная вода.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Развести концентрат отмывочного раствора деионизированной водой в 21 раз. Полученный раствор используют для промывания лунок и разведения концентрата конъюгата. Разведенный раствор может храниться 1 месяц при +4 °С. Пример: на 1 стрип потребуется 1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды.

7.4. 0.02 М фосфатный буфер (для проб меда).

Взвесить 5.36 г Na₂HPO₄·12 H₂O, 0.2 г KH₂PO₄·2 H₂O, 8.0 г NaCl и 0.2 г KCl, растворить и развести деионизированной водой до 1 л. Раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более недели.

7.5. 3% раствор трихлоруксусной кислоты (для проб сливок/ сметаны/ мороженого).

Взвесить 3.0 г трихлоруксусной кислоты, растворить и развести деионизированной водой до 100 мл. Раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более недели.

7.6. 1 М раствор гидроксида натрия (для проб сливок/ сметаны/ мороженого).

Взвесить 4.0 г NaOH, растворить и развести деионизированной водой до 100 мл. Раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более недели.

7.7. 4% раствор хлорида натрия (для проб молока).

Взвесить 4.0 г NaCl, растворить и развести деионизированной водой до 100 мл. Раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более недели.

7.8. Буфер для разведения проб молока.

Смешать 80 мл 4% раствора хлорида натрия (см. п. 7.7) с 20 мл метанола. Раствор следует готовить непосредственно перед использованием.

7.9. Приготовление калибровочных проб.

Развести концентраты калибровочных проб (см. состав набора п. 2) в 10 раз Буфером для разведения образцов (см. состав набора п. 5) непосредственно перед использованием. Разбавленные калибровочные пробы не хранятся.

Пример: 450 мкл Буфера для разведения образцов + 50 мкл Концентрата калибровочной пробы.

7.10. Приготовление конъюгата.

Развести концентрат конъюгата (см. состав набора п. 3) отмывочным раствором (см. п. 7.3) в 10 раз. Приготовленный раствор конъюгата не хранится. Следует разводить только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для проведения анализа непосредственно перед внесением конъюгата в лунки планшета.

Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 1000 мкл раствора конъюгата: 100 мкл Концентрата конъюгата + 900 мкл Отмывочного раствора.

7.11. Приготовление смеси субстратов.

Смешать субстрат А и субстрат В в определенной пропорции. Пример: на 1 стрип потребуется 1 мл субстрата А + 30 мкл субстрата В. Приготовленный раствор субстратов не хранится. Следует разводить только ту часть субстратов, которая необходима для проведения анализа. Внимание: смешивайте субстраты не более чем за 5 минут до внесения в лунки планшета.

7.12. Подготовка образцов.**Пробы меда:**

1. Гомогенизировать образец. Взвесить 1.0 г ± 0.05 г меда в 50 мл полистироловой центрифужной пробирке.
2. Добавить 10 мл 0.02 М фосфатного буфера (см. п. 7.4), перемешивать до полного растворения пробы.
3. Поместить на ультразвуковую баню на 5 минут.
4. Тщательно перемешать, поместив пробирку на шейкер на 5 минут.
5. Полученный образец использовать в анализе.
Полученный результат умножить на Фактор разведения 10.

Пробы молока (предел обнаружения 1.5 ppb):

1. Тщательно перемешать пробу молока.
2. Отобрать 1 мл пробы молока в 50 мл полистироловую центрифужную пробирку, добавить 4 мл буфера для разведения молока (см. п. 7.8), тщательно перемешивать в течение 5 минут.
3. Полученный образец использовать в анализе.
Полученный результат умножить на Фактор разведения 5.

Пробы сливок/сметаны/мороженого (предел обнаружения 3 ppb):

1. Взвесить $1.0 \text{ г} \pm 0.05 \text{ г}$ пробы в 50 мл полистироловую центрифужную пробирку. Если в качестве пробы используются сливки, необходимо добавить 1 мл метанола, тщательно перемешать до полного растворения и продолжать экстракцию согласно инструкции.
2. Добавить 3.5 мл 3% раствора трихлоруксусной кислоты (см. п. 7.5), интенсивно перемешивать на шейкере в течение 5 минут.
3. Добавить 500 мкл 1M раствора гидроксида натрия (см. п. 7.6), тщательно перемешивать в течение 1 минуты.
4. Центрифугировать 5 минут \ 3000 g \ +25 °C.
5. Отобрать 400 мкл жидкости под осадком в чистую 2 мл полистироловую центрифужную пробирку, добавить 400 мкл Буфера для разведения образцов (см. Состав набора п. 5), тщательно перемешать.
6. Добавить 15 мкл 1M раствора гидроксида натрия (см. п. 7.6) (pH раствора 6,5–7,5).
7. Полученный образец использовать в анализе.
Полученный результат умножить на Фактор разведения 10.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °C в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °C не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы, концентрат конъюгата, раствор антител, субстраты, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Правильная промывка лунок между стадиями – важный этап анализа, так как может влиять на воспроизводимость результатов.

8.5. Во время анализа старайтесь избегать попадания солнечных лучей на лунки планшета.

8.6. Не позволяйте лункам высыхать между этапами анализа во избежание ложных результатов, сразу же приступайте к следующему этапу после промывания лунок.

8.7. Результаты считать недействительными, если:

- Цвет субстратов изменился
- ОП первой точки калибровки (CAL1) (при 450 нм) меньше 0.5 оптических единиц.

8.8. Оптимальная температура проведения анализа +25 °С. Значения выше или ниже вызовут изменение в чувствительности и значениях ОП.

8.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб.
2	Разведите концентраты калибровочных проб буфером для разведения образцов в 10 раз (см. п. 7.9). Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл раствора каждой калибровочной пробы. В лунки, предназначенные для исследуемых образцов, внесите по 50 мкл приготовленных образцов (см п. 7.12). Внесение калибровочных проб и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
3	Внесите во все лунки по 50 мкл раствора антител , осторожными круговыми движениями перемешайте содержимое лунок.
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С .
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	Разведите концентрат конъюгата отмывочным раствором в 10 раз (см. п. 7.10). Внесите во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата , осторожными круговыми движениями перемешайте содержимое лунок.
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте в течение 30 минут при температуре +37 °С.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .

9	Добавьте по 100 мкл смеси субстратов А и В в каждую лунку (см. п. 7.11). Пример разведения: на 1 стрип потребуется 1 мл субстрата А + 30 мкл субстрата В. Внимание: смешивайте субстраты не более чем за 5 минут до использования. Осторожными круговыми движениями перемешайте содержимое лунок. Внесение смеси субстратов в лунки необходимо произвести в течение 1–2 мин. Инкубируйте планшет в темноте при температуре +37 °С в течение 30 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и смесь субстратов, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 5 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
12	Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации тетрациклина в калибровочных пробах (ppb*), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Учитывая разведение концентратов, концентрации калибровочных проб составляют 0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 и 6 ppb. Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 ppb к несущественно малой величине, например, 0.001 ppb
13	Определите по калибровочному графику содержание тетрациклина в исследуемых образцах. При анализе различных видов материала необходимо умножить полученные значения на Фактор разведения**.

* единица измерения ppb соответствует мкг/кг для твердых проб и мкг/л для жидких проб, например, 0.1 ppb = 0.1 мкг/л для проб молока = 0.1 мкг/кг для проб меда

**значение фактора разведения для разных типов проб:

Мед	10
Молоко	5
Сливки, сметана, мороженое	10

По вопросам, касающимся качества Набора «**ТЕТРАЦИКЛИН-ИФА**»,
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

03022, Киев, а/я 101,

тел./факс: +38 (044) 521-3-521

Электронная почта: lab@xema.com.ua

Интернет: www.xema.com.ua

Руководитель отдела контроля качества ООО «ХЕМА»,
Тыщенко С. П.

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TETRACYCLINE IN FOOD "TETRACYCLINE EIA"

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for quantitative determination of tetracycline in honey, milk, cream and ice-cream.

This kit is designed for measurement of tetracycline in food. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

According to EU regulations (# 675/92, March 18, 1992) maximum residue limit of tetracycline in meat and milk is 100 ppb, in kidneys – 600 ppb, in liver – 300 ppb, and in eggs 200 ppb.

HPLC is common method for determination of tetracycline. Time consuming sample preparation and expensive equipment are the main inconveniences of this method. The kit "TETRACYCLINE EIA" is easy to use, has good sensitivity, provides sufficiently accurate results and permits to analyse more samples at the same time comparing to HPLC method.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on indirect competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen and antibodies to tetracycline are placed into microwells coated by conjugate Tetracycline-Protein. Tetracycline from the specimen competes with adsorbed antigen for coating antibodies. After washing procedure conjugate of species specific antibodies with peroxidase is added to reaction volume and conjugate binds to antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in microwell is inversely related to quantity of measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- 4.1.** For professional use only.
- 4.2.** Avoid contact with stop solution containing 5.0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- 4.3.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents.
- 4.4.** Do not use the kit beyond the expiration date.
- 4.5.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.
- 4.6.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- 4.7.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.
- 4.8.** Do not mix reagents from different lots.
- 4.9.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.
- 4.10.** Do not pipette reagents by mouth.
- 4.11.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.
- 4.12.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.
- 4.13.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

	Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP 8x12 wells	Tetracycline EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	CAL 1-6	Calibrator concentrates 10x set, 1 ml each. The set contains 6 calibrators: 0, 3, 6, 12, 24, 60 ppb	6	pcs	colourless	until exp.date
3	CONJ 10X	Conjugate concentrate 10x, 1.5 ml	1	pcs	pink	until exp.date
4	ANTIB	Antibodies, 7 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
5	DIL SPE	Buffer for dilution of samples, 50 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
6	SOLN H ₂ O ₂	Substrate A, 12 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7	SOLN TMB	Substrate B, 0.4 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
8	BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT
9	STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
10	N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
11	K904I	Instruction TETRACYCLINE EIA	1	pcs		N/A
12	K904Q	QC data sheet TETRACYCLINE EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, 20–250 µl;
- Ultrasonic bath;
- Shaker;
- Vortex;
- Centrifuge;
- Analytical balance;
- Dry thermostat for +37.0 °C ± 0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Reagents required but not provided

- Sodium hydrophosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (analytical grade);
- Potassium dihydrophosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (analytical grade);
- Sodium chloride (analytical grade);
- Potassium chloride (analytical grade);
- Methanol (analytical grade);
- Trichloroacetic acid (analytical grade);
- Sodium hydroxide (analytical grade).

5.4. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microstrips TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Before preparation of specimen you should prepare the following solutions.

1. 0.02 M phosphate buffer (for preparation of specimen of honey). Weigh 5.36 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g of $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.0 g of NaCl and 0.2 g of KCl, dissolve and dilute with deionized water to total volume 1 l. The solution may be stored at room temperature for 1 week.
2. 3% solution of trichloroacetic acid (for preparation of specimen of milk). Weigh 3.0 g of trichloroacetic acid, dissolve and dilute with deionized water to total volume 100 ml. The solution may be stored at room temperature for 1 week.
3. 1 M sodium hydroxide solution (for preparation of specimen of milk). Weigh 4.0 g of NaOH, dissolved and dilute deionized water to total volume 100 ml. The solution may be stored at room temperature for 1 week.
4. 4% solution of sodium chloride (for preparation of specimen of milk). Weigh 4.0 g of NaCl, dissolve and dilute with deionized water to total volume 100 ml. The solution may be stored at room temperature for 1 week.

5. Buffer for dilution for milk specimen. Mix 80 ml of 4% sodium chloride solution and 20 ml of methanol. The solution should be prepared directly before use.

Preparation of specimen of honey:

1. Homogenize specimen of honey. Weigh 1.0 g \pm 0.05 g of honey in 50 ml polystyrene centrifuge tube with lid.
 2. Add 10 ml of 0.02 M phosphate buffer and mix intensively.
 3. Put the sample onto ultrasonic bath for 5 minutes.
 4. Mix thoroughly on shaker for 5 min.
 5. Use prepared specimen for analysis.
- Use to calculate concentration dilution factor 10.

Preparation of specimen of milk:

1. Mix thoroughly specimen of milk.
2. Transfer 1.0 ml of milk sample into 50ml polystyrene tube with a lid, add 4 ml of buffer for dilution for milk specimen and mix intensively for 5 min.
3. Use prepared specimen for analysis.
4. Use to calculate concentration dilution factor 5.

Preparation of specimen of cream and ice-cream:

1. Weigh 1.0 g \pm 0.05 g of the specimen into 50ml polystyrene tube with a lid. For specimen of cream add 1 ml of methanol and mix intensively.
 2. Add 3.5 ml of 3% solution of trichloroacetic acid and mix intensively for 5 min.
 3. Add 500 μ l of 1M sodium hydroxide solution and mix intensively for 1 min.
 4. Centrifuge 10 min / 3000 g / +25 °C.
 5. Transfer 400 μ l of supernatant layer into a new 2 ml polystyrene tube, add 400 μ l of DIL SPE and mix intensively.
 6. Add 15 μ l of 1 M sodium hydroxide (pH of the specimen solution should be 6.5–7.5).
 7. Use prepared specimen for analysis.
- Use to calculate concentration dilution factor 10.

7. TEST PROCEDURE

7.1. Reagent Preparation

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare calibrators from concentrates CAL 1–6 by 10x dilution in buffer solution for dilution of samples DIL SPE.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21x

dilution in distilled water.

- Prepare Conjugate solution from Conjugate concentrate CONJ10x by 10x dilution in washing solution. Note: prepare Conjugate solution directly before dispensing into the wells.
- Prepare substrate mixture – for 1 microstrip mix 1 ml of substrate A SOLN H₂O₂ with 30 µl of substrate B SOLN TMB. Note: prepare substrate mixture directly before dispensing into the wells.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–6 and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Prepare calibrators by 10x dilution of Calibrator concentrates (CAL 1–6) in buffer solution for dilution of samples (DIL SPE). Pipet 50 µl of each solution of calibrators and unknown samples into the wells.
3	Dispense 50 µl of ANTIB into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 60 minutes at +37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) in distilled water. Wash the strips 5 times.
6	Prepare Conjugate solution by 10 dilution of conjugate concentrate (CONJ 10X) in washing solution. <i>Note: prepare Conjugate solution directly before dispensing into the wells.</i> Dispense 100 µl of Conjugate solution into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
7	Incubate 30 minutes at +37 °C.
8	Wash the strips 5 times.
9	Prepare substrate mixture – for 1 microstrip mix 1 ml of SOLN H ₂ O ₂ with 30 µl of SOLN TMB. <i>Note: prepare substrate mixture directly before dispensing into the wells.</i> Dispense 100 µl of substrate mixture into the wells.
10	Incubate 30 minutes at +37 °C
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on air.
14	Apply point-by-point method for data reduction. Use dilution factor to calculate concentration.

7.5. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of *GLP* (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications

9. CALCULATION OF RESULTS

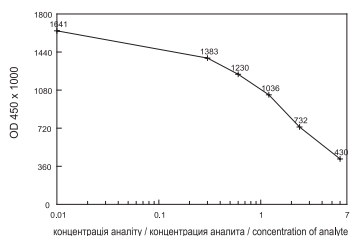
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus logarithm of tetracycline concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of tetracycline in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units x 1000 (450 nm)
CAL 1	0	1641
CAL 2	0,3	1383
CAL 3	0,6	1230
CAL 4	1,2	1036
CAL 5	2,4	732
CAL 6	6	430



10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Reproducibility

Variation coefficient of results of determination of tetracycline content in one single specimen using kit «TETRACYCLINE EIA» does not exceed 8.0%.

10.2. Analytical sensitivity

Limit of quantification of tetracycline using kit «TETRACYCLINE EIA» does not exceed 0.3 ppb.

10.3. Cross-reactivity:

Tetracycline	approx. 100 %
Aureomycin	approx. 100 %
Terramycin	approx. 58 %
Doxycycline	approx. 76 %
Minocycline	approx. 76 %
Demeclocycline	approx. 86 %
Bristacin	approx. 78 %
Others	less than 1 %

10.4. Detection limit:

Honey	3 ppb
Milk	1.5 ppb
Cream, ice-cream	3 ppb

10.5. Recovery rate:

Honey	95 ±15 %
Milk, cream, ice-cream	80 ±20 %

Questions concerning the quality of reagent kit **“TETRACYCLINE EIA”** please address to the company «XEMA»:

03022, Kiev, mail-box 101,
tel./fax: +38 (044) 521-3-521

E-mail: lab@xema.com.ua

Internet: www.xema.com.ua

QC manager

S.P. Tyschenko