



## Arbeitsanleitung

Penicillin

96 Tests

Enzymimmunoassay  
zur quantitativen  
Bestimmung von  
Penicillin in Milch und Shrimps

Best.-Nr.: PEN-E01

Version: 1. Dezember 2022

**Gold Standard Diagnostics  
Kassel GmbH**

Otto-Hahn-Str. 16  
D-34123 Kassel

Tel.: +49 (0) 561 491742-0  
Fax: +49 (0) 561 491742-20

[info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com)

[www.kassel.goldstandarddiagnostics.com](http://www.kassel.goldstandarddiagnostics.com)

Empfindlichkeit	3 ng/mL
Wiederfindung (Milch)	90%
Wiederfindung (Shrimps)	70%
Inkubationszeit	140 min

### Allgemeines

Penicillin wurde 1929 zufällig von Alexander Fleming entdeckt. Die Verbindung gehört zu den Mycotoxinen und wird von dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* gebildet. Penicillin als Antibiotikum wird vorzugsweise für die Behandlung von gram-positiven Bakterien sowohl in Menschen als auch in Tieren eingesetzt. Von allen illegal in der Tierhaltung verabreichten Medikamenten finden Antibiotika die häufigste Verbreitung. Rückstände in Lebensmitteln werden vom Menschen aufgenommen und können zu schweren Infektionen pathogener Keime, die eine Penicillin-Resistenz entwickelt haben oder zu Allergien führen. Allergische Reaktionen treten in unterschiedlichen Schweregraden auf und hängen von der aufgenommenen Menge und der persönlichen Disposition ab. Es kommen Symptome von Urtikaria bis zum anaphylaktischen Schock vor.

In der Routinetestung von Milchproben auf Antibiotika wurden in 90% aller positiven Fälle Penicilline oder andere beta-Lactame nachgewiesen.

Die am häufigsten eingesetzte Methode zum Nachweis von Penicillin-Verunreinigungen in Nahrungsmitteln waren bisher mikrobiologische Tests. Diese Methoden erlauben allerdings keine Quantifizierung und keine Identifizierung des speziellen Antibiotikums wie dies mittels eines ELISA-Tests oder einer Immunaффinitätssäule in Verbindung mit HPLC erreicht werden kann.

### Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Penicillin Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Penicillin-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Penicillin enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Penicillin-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz zwischen festphasengebundenem Penicillin und Penicillin der Probe um die freien Bindungsstellen des Antikörpers statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein gegen den Penicillin-Antikörper gerichtetes Konjugat wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die

Penicillin-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

### Vorsichtsmaßnahmen

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

### Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mög-

liche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.

4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

### Reagenzien

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Penicillin-Konjugat.
2. Penicillin Standards: 6 Fläschchen mit je 1,0 mL (0; 4; 10; 40; 100; 400 ng/mL), gebrauchsfertig.
3. Anti-Penicillin Antikörper (Maus): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (anti-Maus-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Probenverdünner (PBS), 2 x 50 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
10. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
11. Arbeitsanleitung.

### Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

#### Geräte

- 50, 100 und 1000 µL-Mikropipetten

- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Ultra-turrax, Mixer
- Zentrifuge

## Probenvorbereitung

### *Shrimps*

- Die Probe im Ultra-turrax oder Mixer homogenisieren.
- Zu **1 g** homogenisierter Probe in einem Glasröhrchen **4 mL endverdünnten** Probenverdünner geben und **20 Minuten** kräftig schütteln.
- Probe **10 Minuten** bei 3000 g zentrifugieren.
- Überstand 1:5 mit endverdünntem Probenverdünner verdünnen. Diese Lösung direkt im Test einsetzen.

### *Milch*

- 5 mL einer frischen Milchprobe (Vollmilch oder fettarme Milch) in ein Reagenzglas pipettieren und **30 Minuten bei 2-8°C** inkubieren.
- Probe **10 Minuten** bei 3000 g zentrifugieren.
- Die obere Fettschicht abtrennen und die Milch 1:4 in endverdünntem Probenverdünner verdünnen. Diese Lösung direkt im Test einsetzen.

## Testdurchführung

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Penicillin-Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Maus-IgG-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 90 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.

8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

## Berechnung der Ergebnisse

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Penicillin abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Der Verdünnungsfaktor ist **20 für Shrimps** und **4 für Milch** unter Verwendung der oben beschriebenen Probenvorbereitungsmethode.

## Typische Standardkurve

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ng/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Penicillin (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
4	85
10	70
40	35
100	15
400	5

## Technische Daten

### *Empfindlichkeit*

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Gold Standard Diagnostics Penicillin Tests** beträgt 3 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

### *Wiederfindung*

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 90% für Milch- und 70% für Shrimps-Proben bestimmt.

### *Intraassay-Präzision*

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Penicillin-Tests wurde mit 3% bestimmt.

## Literatur

1. De Leuw P, Kapa G, Petz M, Schreurs FJ, Kan CA; *JAOAC Int.* 80(6): 1220 (1997). Induction and characterization of multianalyte antibodies against penicillins in egg yolk.
2. Knecht BG, Strasser A, Dietrich R, Martlbauer E, Niessner R, Weller MG; *Anal Chem.* 76(3): 646 (2004). Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk.
3. Althaus RL, Molina MP, Rodriguez M, Fernandez N; *J Food Prot.* 64(11): 1844 (2001). Detection limits of beta-lactam antibiotics in ewe milk by penzym enzymatic test.
4. Huth SP, Warholic PS, Devou JM, Chaney LK, Clark GH; *JAOAC Int.* 85(2): 355 (2002). Parallax beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephalosporin, and ceftiofur in bovine milk.
5. Martlbauer E, Usleber E, Schneider E, Dietrich R; *Analyst.* 119(12): 2543 (1994). Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides.
6. Usleber E, Lorber M, Straka M, Terplan G, Martlbauer E; *Analyst.* 119(12): 2765 (1994). Enzyme immunoassay for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk.
7. Gustavsson E, Sternesjo A; *JAOAC Int.* 87(3): 614 (2004). Biosensor analysis of beta-lactams in milk: comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods.