



Arbeitsanleitung

Chloramphenicol

96 Tests

Enzymimmunoassay
zur quantitativen
Bestimmung von
Chloramphenicol in
Nahrungsmitteln und Urin

Best.-Nr.: CAP-E02

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

www.kassel.goldstandarddiagnostics.com

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

Allgemeines

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

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

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

Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Chloramphenicol Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Antikörperbindendes Protein ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Chloramphenicol enthaltende Probe bzw. Standards sowie ein Chloramphenicol-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Das Chloramphenicol der Probe/Standards bindet an den Antikörper, während dieser Komplex seinerseits mit dem bindenden Protein auf der Platte reagiert. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird ohne vorheriges Waschen ein Chloramphenicol-Peroxidase Konjugat zur Absättigung unbesetzter Antikörperbindungsstellen hinzupipettiert. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 15 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Chloramphenicol-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

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

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

Reagenzien

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

1. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Antikörper-bindendem Protein.
2. Chloramphenicol Standards: 6 Fläschchen mit je 1 mL (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 ng/mL), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. Anti-Chloramphenicol Antikörper (Schaf): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Konjugat (Chloramphenicol-Peroxidase), 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
5. Substratlösung (TMB), 15 mL, rot gefärbt, gebrauchsfertig.
6. Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
7. Probenverdünner (PBS), 2 x 60 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
8. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
9. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
10. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
11. Arbeitsanleitung.

Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

Geräte

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

Reagenzien

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

Probenvorbereitung

Milch (direkter Einsatz)

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

Milch (Essigsäureethylester-Extraktion)

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

Honig

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

Shrimps, Fleisch, Fischmehl

- Probe in einem geeigneten Gerät (z.B. Ultra-Turrax, Mixer) zerkleinern und homogenisieren.

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

Vollei, roh

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

Urin

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

Testdurchführung

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des anti-Chloramphenicol Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Ohne vorheriges Waschen 50 µL Chloramphenicol-Peroxidase Konjugat in jede Vertiefung zugeben.

5. Platte abdecken und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
7. 100 µL Substratlösung zugeben.
8. Platte abdecken und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.
10. 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 Chloramphenicol abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren sind unter dem Punkt *Probenvorbereitung* aufgeführt.

Anmerkung: Bedingt durch die Extraktion mit Essigsäureethylester können negative Proben Hintergrundwerte aufweisen. Bei wiederholt durchgeführten Experimenten mit negativen Proben wurden matrixabhängig die folgenden Leerwerte festgestellt:

Milch (direkt)	< 0,1 ng/g
----------------	------------

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

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

Typische Standardkurve

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

Chloramphenicol (ng/mL) OD-% von 0 ng/mL

0	100
0,05	84
0,1	70
0,5	28
1	17
5	8

Technische Daten

Empfindlichkeit

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

Wiederfindung

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

Intraassay-Präzision

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

Kreuzreaktionen relativ zu Chloramphenicol (=100%)

Chloramphenicol-Glucuronid	88%
Chloramphenicol-Base	< 0,1%
Ampicillin	< 0,1%
Penicillin	< 0,1%
Tetracyclin	< 0,1%

Literatur

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