

Programma Ontwikkeling van screeningsmethoden voor kritische parameters ten behoeve van IKB-systemen.
Programmaleider Dr. Y.A. Holthuijzen

Project Ontwikkeling van biochemische screeningsmethoden voor het aantonen van dierbehandelingsmiddelen in de dierlijke produktieketen.

Projectnummer 4110002
Projectleider W. Haasnoot

Rapport 92.43

oktober 1992

Evaluatie van commercieel verkrijgbare screeningsmethoden voor de bepaling van sulfamethazine en sulfadiazine in vlees en veevoeder.

G.D.van Bruchem en W. Haasnoot

Afdeling: Levensmiddelen- en milieuchemie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1992, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

afdelingshoofden/programmaleiders (5x)

afdeling Microbiologie en Biotechniek (J.F.M. Nouws)

afdeling Levensmiddelen en Milieuchemie (R. Schilt)

afdeling Risico-analyse en Toxicologie (M.J.B. Mengelers)

afdeling Instrumentele Analyse (H. Keukens)

afdeling Kwaliteitsbewaking en Kwaliteitssystemen (J. de Jong)

public relations en secretariaat (2x)

bibliotheek (3x)

circulatie

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Milieu Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Directie Veterinaire Dienst

Directie Veehouderij en Zuivel

Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Centraal Laboratorium

Directie Algemene Inspectie Dienst

Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire Hoofdinspectie

Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (dr. R.W. Stephany/dr. L.A. v. Ginke)

Produktschap Vee en Vlees

Secretaris Overleggroep residuanalyse (drs. M. Vertommen)

Agralin

Bipharma (Th. Blom)

Sopar - biochem b.v. (L.A. Tenten)

ABSTRACT

Evaluatie van commercieel verkrijgbare screeningsmethoden voor de bepaling van sulfamethazine en sulfadiazine in vlees en veevoeder.

Evaluation of commercially available screening methods for the analysis of sulfamethazine and sulfadiazine in meat and feed.

Report 92.43

October, 1992

G.D. van Bruchem and W. Haasnoot

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

Commercially available test-kits for sulphonamides (three microtitre plate enzyme immunoassays (EIA) from Cortecs (sulphamethazine and sulphadiazine) and Randox (sulphamethazine) and a Quick-Card based test-kit for sulphamethazine from Rhone-Poulenc) were tested. The sensitivity of the test-kits were comparable (10 ng/ml for standard solutions). All the tests were highly specific and showed low cross-reactivities for other sulphonamides (<25%). In case of multi-component screening for sulphonamides this specificity is a disadvantage.

The Quick-Card based test-kit has been found suitable for the screening of urine samples on the presence of sulphamethazine at a level of 300 ng/ml. According to the supplier this level in urine enables the control of tissue on the presence of this sulphonamide at the maximal residue level (100 ng/ml). With urine, the test is easy to perform, very simple and comparable to a test already used for chloramphenicol.

For the application of the microtitre plate assays additional research is necessary with respect to background of several tissue samples from different species (chicken, pork or beef), sample pre-treatment and incubation conditions to raise the maximal signal.

In general, the enzyme immunoassay type screening methods are suitable for the screening of many samples in a short time. However for a multi-sulphonamide screening the commercially available tests are too specific. Further research should be focused on the preparation of antibodies raised against the aromatic amino group which is common to all sulphonamides.

Key words: sulphonamides, EIA, meat, cattle feed, urine

INHOUD

ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	8
2.1 Geteste EIA kits	
2.1.1 Cortecs sulfamethazine en sulfadiazine EIA kits	8
2.1.2 Randox sulfamethazine EIA kit	9
2.1.3 Rhone-Poulenc EZ-SREENtest voor sulfamethazine	9
2.2 Monstermateriaal	10
2.3 Toegepaste monstervoorbewerkingen	11
2.3.1 Opwerkingsprocedures voor vlees	11
2.3.1.1 Cortecs-procedure	11
2.3.1.2 Randox-procedure	11
2.3.1.3 Rikilt-procedure	11
2.3.2 Opwerkingsprocedures voor veevoeder	12
2.3.2.1 Cortecs-procedure	12
2.3.2.2 Randox-procedure	12
2.3.2.3 Rikilt-procedure	12
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	
3.1 Het maximale signaal	13
3.2 De ijkcurven	13
3.3 Kruisreactiviteit	14
3.4 Monstervoorbewerking	14
3.5 De EZ-screentest voor sulfamethazine	16
3.6 Aanvullend onderzoek	19
4 CONCLUSIE	20
LITERATUUR	21
Bijlagen:	
I- Procedure voor de Cortecs kit voor sulfamethazine	
II- Procedure voor de Cortecs kit voor sulfadiazine	
III- Procedure voor de Randox kit voor sulfamethazine	
IV- Procedure voor de EZ-SCREENtest voor sulfamethazine	

SAMENVATTING

Gezien de recente bevindingen voor sulfonamiden vanuit het Nationaal Plan Overige Stoffen (4% positieve monsters bij varkensvlees) is het reëel om voorbereid te zijn op een meer uitgebreid controleprogramma voor sulfonamiden. In varkensvlees wordt hoofdzakelijk melding gemaakt van te hoge gehalten aan sulfamethazine (= sulfadimidine).

In dit rapport worden screeningsmethoden op basis van de Enzyme Immuno Assay (EIA) beoordeeld. Van de firma Cortecs werden de microtiterplaattesten voor sulfamethazine en sulfadiazine verkregen. Eenzelfde test voor sulfamethazine werd aangekocht van de firma Randox. Van Rhone Poulenc werd de EZ-SCREENtest (op basis van de Quick-Card) voor sulfamethazine verkregen.

Voor standaardoplossingen van de te bepalen componenten werd bij de verschillende testen een vergelijkbare gevoeligheid van ca. 10 ng/ml gevonden. De kruisreactiviteit van andere sulfonamiden in deze testen is over het algemeen laag (<25%). De testen zijn dus specifiek en niet te gebruiken voor een screeningsprogramma gericht op meerdere sulfonamiden.

De test op basis van de Quick-Card is geschikt bevonden voor de screening van pré-urine op aanwezigheid van sulfamethazine vanaf het 300 ng/ml niveau. Een dergelijk niveau in pré-urine zou volgens de fabrikant overeenkomen met een niveau lager dan 100 ng/g lever (maximaal residuniveau). De test is voor urine zeer eenvoudig uit te voeren, snel (binnen 10 minuten resultaat) en geschikt voor toepassing binnen kringlaboratoria waarbij geen extra investeringen noodzakelijk zijn. Deze laboratoria hebben al ervaring met een vergelijkbare test voor chlooramfenicol.

Voor de testen op basis van de microtiterplaat dient voor toepassing op vlees aanvullend onderzoek te worden uitgevoerd. Met de Cortecstesten werd een te laag maximaal signaal verkregen en onderzoek naar de incubatieomstandigheden kan hierin mogelijk verbetering brengen. Bij deze Cortecstesten wordt een eenvoudige monstervoorbereiding voorgeschreven. Met de sulfadiazinekit van Cortecs werd een lage achtergrond voor blanco vlees (kip) gemeten en een duidelijke afname van het signaal bij vlees met toevoeging van 50 ng sulfadiazine per gram. Met het blanco vleesmonster (kip) werd echter met de sulfamethazine kit van Cortecs een te hoge achtergrond gemeten. Hetzelfde resultaat is eveneens waargenomen bij de Randoxtest waarbij een meer uitgebreide monstervoorbereiding wordt voorgeschreven. Het aanvullende onderzoek zal gericht moeten zijn op het meten van de spreiding van de achtergrond van diverse blanco vleesmonsters (kip, varken, rund) en het eventueel verlagen van deze achtergrond door uitbreiding van de monstervoorbereiding.

Beide sulfamethazine microtiterplaattesten lijken toepasbaar voor de controle van veevoeders vanaf het 1 mg/kg niveau.

Voor het opzetten van een multi-immunochemische screeningsmethode voor sulfonamiden zijn andere antilichamen, gericht tegen het aromatische amine dat bij alle sulfonamiden voorkomt, gewenst. Dergelijke antilichamen zijn niet commercieel verkrijgbaar maar in de literatuur wordt wel een procedure beschreven om deze te maken.

1 INLEIDING

Sulfonamiden zijn anti-microbiële middelen die in de veeteelt op grote schaal worden toegepast. Van de uitgebreide groep van stoffen behorende tot de sulfonamiden worden er slechts enkele gebruikt. Zoals blijkt uit de rapportage van het onderzoek over 1991 in het kader van het Nationaal Plan Overige Stoffen (NPOS) wordt in vlees hoofdzakelijk sulfamethazine (= sulfadimidine) en in mindere mate sulfadiazine aangetroffen [1]. Bij dit op het Centraal Laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (CL-RVV) uitgevoerde onderzoek wordt gebruik gemaakt van een dunnelaagchromatografische (HPTLC) methode voor de screening [2] en een vloeistofchromatografische (HPLC) methode met Diode-array UV-VIS detectie voor de bevestiging [3]. Met de kwalitatieve screeningsmethode is het mogelijk om een negental sulfonamiden in vlees aan te tonen met een onderste grens van 2 µg/kg. Met de meer kwantitatieve bevestigingsmethode is het mogelijk om in ieder geval een zestal sulfonamiden vanaf het 40 µg/kg niveau te bepalen. Beide methoden zijn dus geschikt om vleesmonsters te controleren op eventuele overschrijdingen van het maximale residuniveau van 0,1 mg/kg (som van sulfonamiden). Voor het huidige onderzoek in het kader van het NPOS (300 vleesmonsters op jaarbasis) zijn deze methoden uitermate geschikt. Echter, indien regelmatig overschrijdingen van het maximaal toelaatbare residugehalte worden aangetoond is het mogelijk dat het monsteraantal fors omhoog gaat.

Gezien de recente bevindingen in het NPOS (8 van de 200 onderzochte monsters varkensvlees waren boven de actiegrens (4% positieven)) is het reëel om alvast voorbereid te zijn op een meer uitgebreid controleprogramma voor sulfonamiden. Wanneer aangenomen wordt dat de monsters genomen in het kader van het NPOS representatief zijn voor het totale aantal geslachte varkens (18.900.000 in 1991) zal in veel varkensvlees het gehalte aan sulfonamiden boven het maximaal toelaatbare gehalte van 0,1 mg/kg liggen zonder dat deze monsters als verdacht worden aangemerkt of het vlees wordt afgekeurd. Van alle geslachte dieren wordt jaarlijks 0,5% (ca. 110.000 monsters) onderzocht met behulp van de Nieuwe Nederlandse Nier Test (NNNT;[4]). Hierbij zijn in 1991 geen monsters gevonden waarin sulfonamiden aanwezig waren [5]. Er kan geconcludeerd worden dat de NNNT zoals die nu wordt uitgevoerd niet gevoelig genoeg is voor de controle op sulfonamiden of dat de monsters genomen in het kader van het NPOS niet representatief zijn voor het totaal. Een meer uitgebreid onderzoek met een andere, gevoeliger screeningsmethode dan de NNNT en uitvoerbaar op kringlabniveau lijkt zinvol.

In dit rapport worden screeningsmethoden op basis van de Enzyme Immuno Assay (EIA), een techniek welke in het CL-RVV ook wordt toegepast voor de screening van lever- en urinemonsters op aanwezigheid van β-agonisten, beoordeeld.

Er zijn vier commercieel verkrijgbare kits uitgetest: de sulfamethazine- en sulfadiazine-kits van de firma Cortecs welke in Nederland wordt vertegenwoordigd door de firma Bipharma uit Weesp, de sulfamethazine-kit van Randox (cat no. SM 1400) welke in Nederland wordt vertegenwoordigd door de firma ITK Diagnostics BV in Uithoorn en de EZ-SCREENtest voor sulfamethazine van de firma Rhone Poulenc in Nederland vertegenwoordigd door Sopar Biochem in Nieuwegein.

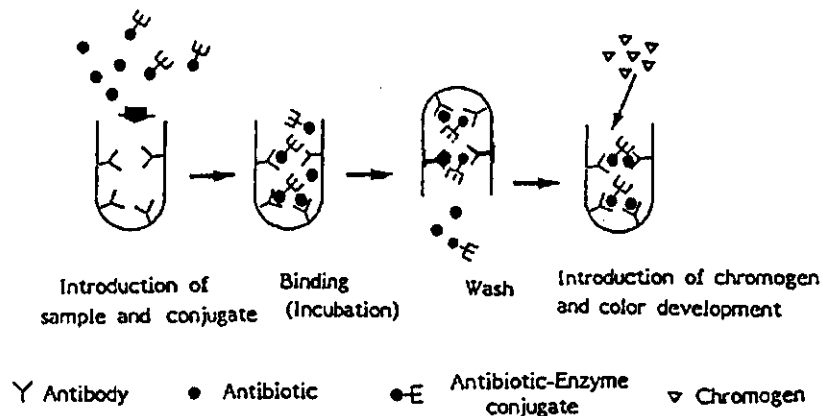
2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Geteste EIA kits

2.1.1 Cortecs sulfamethazine en sulfadiazine EIA kits

Volgens de fabrikant (zie Bijlagen I en II) zijn de testen ontwikkeld voor de bepaling van residuen van sulfamethazine respectievelijk sulfadiazine in vlees, melk, bloed, vis of veevoeders.

Beide testkits zijn gebaseerd op het principe van een competitieve enzym immuno-assay met specifieke antilichamen gecoat aan de wells van de microtiterplaat. Het principe van de testen is weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: Principe van de competitieve EIA

Voor sulfamethazine en sulfadiazine worden detectiegrenzen van 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vlees opgegeven. De sulfamethazine kit kruisreageert met sulfamerazine (28%) en met sulfadiazine (0,5%). De sulfadiazine kit kruisreageert met sulfamerazine (5,1%), sulfamethazine (2,4%) en sulfamonomethoxine (1,4%).

De kits bevatten een plastic frame met 12 microtiterstrips van 8 wells en verder alle benodigde chemicaliën inclusief een extractiebuffer, een standaardreeks (1,25; 6,25; 50 en 250 ng/ml) en een duidelijke handleiding. De voorgeschreven monstervoorbewerking is beperkt tot een mengen met de bijgeleverde magnesiumsulfaat bevattende extractiebuffer in een verhouding van 1:7 (monster:buffer [g:v]) voor vlees, serum, melk en urine of een mengverhouding van 1:8 voor veevoeder. Na mengen wordt gecentrifugeerd en het heldere supernatant wordt gebruikt voor de EIA. De prijs is ca. fl 1200,= per kit. Bij een duplo analyse komt de prijs per monster op ca. fl 30,=.

2.1.2 Randox sulfamethazine EIA kit (Cat. No. SM 1400)

Volgens de fabrikant (zie Bijlage III) is de kit ontwikkeld voor de kwantitatieve bepaling van sulfamethazine in urine, weefsel en veevoerders. Het niveau waarboven een monster positief wordt bevonden zou volgens de fabrikant liggen bij: 500 ng/ml voor urine, 100 ng/g voor weefsel en 1000 ng/g voor veevoerders. Volgens opgave zou de kit kruisreageren met sulfamerazine (10%), sulfadiazine (0,9%), sulfapyridine (0,5%), sulfaguanidine (0,3%) en sulfadimethoxine (0,1%).

De kit is gebaseerd op hetzelfde principe als beschreven bij 2.1.1. De kit bevat een plastic frame met 6 microtiterstrips van 2 x 8 wells. De strips zijn gecoat met specifieke antilichamen tegen sulfamethazine. De bijgeleverde standaard heeft na reconstitutie in 5 ml water een concentratie van 1000 ng/ml. Er wordt geadviseerd om met bijgeleverde acetaatbuffer de standaard te verdunnen tot de volgende concentraties: 0; 25; 100; 250; 500 en 1000 ng/ml. Tevens wordt geadviseerd om de test in triplo toe te passen. Dit betekent dat per kit maximaal 24 monsters kunnen worden geanalyseerd.

Voor urine is de monstervoorbewerking beperkt tot alleen een centrifugestap (3000 rpm gedurende 12 min.). Veevoerders moeten geextraheerd worden met 80% methanol (bij 70°C gedurende 30 minuten). De methanolfase moet na centrifugeren worden ingedampt en het residu worden opgenomen in een acetaatbuffer. Voor weefselmonsters wordt een zeer uitgebreide monstervoorbewerking voorgeschreven (zie Bijlage III). De prijs is fl 465,= per kit. De prijs per monster komt op ca. fl 20,=.

2.1.3 Rhone-Poulenc EZ-SCREENtest voor sulfamethazine

Volgens de fabrikant (zie Bijlage IV) is dit een kwalitatieve test voor het verkrijgen van een indicatie omtrent de aanwezigheid van sulfamethazine in urine, serum en veevoerders. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het QUICK-CARD testsysteem. Ook dit systeem berust op het principe van de competitieve enzym immuno-assay (EIA). Volgens opgave heeft de kit geen kruisreactiviteit met sulfaquinoxiline, sulfadimethoxine en sulfathiazole. Andere

sulfonamiden worden niet genoemd.

Het is een eenvoudige test die buiten het laboratorium toepasbaar is. Na het aan de test toevoegen van een monster(oplossing) en drie reagentia is het resultaat in 10 minuten af te lezen.

De fabrikant gaat er van uit dat een concentratie van 500 ng sulfamethazine per ml urine overeenkomt met het maximaal toelaatbare gehalte in lever van 100 ng/g. Om op dat niveau te kunnen controleren moeten urinemonsters 1 : 50 met de bijgesloten buffer worden verdund.

Bij een controle aan de hand van bloedmonsters gaat de fabrikant ervan uit dat een gehalte van 160 ng sulfamethazine per ml bloed overeenkomt met 100 ng per g lever. Er dient voldoende bloed (5 ml) verzameld te worden om 1 ml serum te verkrijgen. In Bijlage IV wordt in het door de fabrikant voorgeschreven protocol een monstervoorbewerking van bloedmonsters beschreven. Serum dient 16 maal met de bijgesloten buffer te worden verdund.

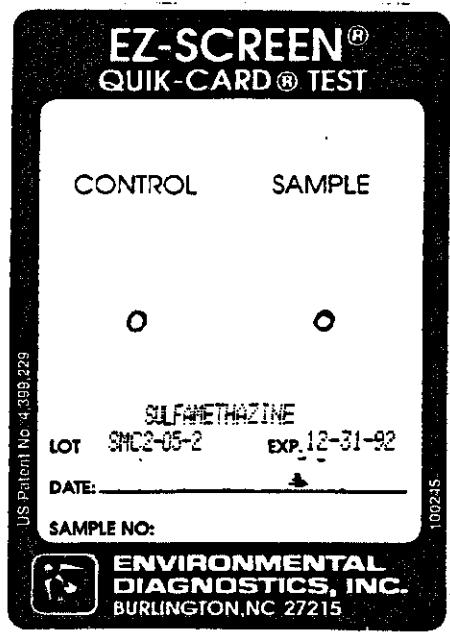
Voor toepassing op veevoeder wordt een extractie met 80% methanol voorgeschreven. De prijs voor 10 testen (á 2 spots) bedraagt fl 340,=.

Per testkaart wordt geadviseerd om een blanco controlemonster mee te nemen. De analyseprijs per monster komt dan op fl 34,=.

2.2 Monstermateriaal

Voor het uittesten van de kits werd gebruik gemaakt van de volgende monsters.

- blanco kippevlees,
- blanco kippevlees met toevoeging van sulfamethazine op een niveau van 8 ng/g),
- blanco varkensvlees met toevoeging van sulfamethazine op een niveau van 8 ng/g (voor de toevoeging werd gebruik gemaakt van kippevlees met toevoeging van sulfamethazine op een niveau van 133 ng/g),
- blanco kippevlees gespiked op een niveau van 50 ng/g,



Figuur 2: Voorbeeld van de EZ-SCREEN test voor sulfamethazine.

- blanco veevoeder (Rikilt nr. 14040),
- veevoeder (Rikilt nr. 14051) sulfamethazinegehalte ca. 1 μ g/g (bepaald met HPTLC),
- blanco runderurine (RIKILT-DLO nr. 18147).

2.3 Toegepaste monstervoorbewerkingen

De monstervoorbewerkingen voor vlees en veevoeder werden volgens verschillende procedures in combinatie met de verschillende testkits uitgevoerd. De bij de kits behorende voorgeschreven opwerkingsprocedures werden eveneens bij de andere kits toegepast. Een vrij uitgebreide opwerkingsprocedure die in RIKILT-DLO gebruikt wordt voor de HPLC analyse van sulfonamiden is eveneens in combinatie met de kits uitgetest. In het hiernavolgende worden deze opwerkingsprocedures kort uiteengezet.

2.3.1 Opwerkingsprocedures voor vlees

2.3.1.1 Cortecs-procedure voor vlees:

Gemalen vlees (1 g) werd gemengd met 7 ml extractievloeistof en gehomogeniseerd (1 min. met de Vortex) waarna gedurende 10 minuten werd gecentrifugeerd bij 3000 rpm. Het heldere supernatant werd in de EIA gebracht. Deze werkwijze is identiek voor sulfamethazine en sulfadiazine.

2.3.1.2 Randox-procedure voor vlees:

Gemalen vlees (2,5 g) werd gemengd met 10 ml ethylacetaat en gedurende 3 minuten gehomogeniseerd. Na toevoegen van nogmaals 5 ml ethylacetaat werd gedurende 15 minuten gemengd (head over head) en vervolgens werd gedurende 5 minuten bij 2000 rpm gecentrifugeerd. Aan 12 ml van het supernatant werd 1 ml 50% methanol in 1% azijnzuur toegevoegd en gedurende 2 minuten werd gehomogeniseerd (Vortex). Diethylether (5 ml) werd toegevoegd en vervolgens werd gedurende 2 minuten gemengd en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 2000 rpm. De etherlaag werd verwijderd en de methanollaag werd ingedampt tot droog. Aan het residu werd 2 ml 1mM acetaatbuffer (pH 7,0) toegevoegd en het geheel werd verwarmd tot 37 °C. Na mengen (vortexen gedurende 2 minuten) werd de oplossing afgekoeld tot kamertemperatuur en gebruikt voor de EIA.

2.3.1.3 RIKILT-DLO-procedure voor vlees:

Gemalen vlees (2 g) werd gemengd met 25 ml dichloormethaan in een stomacherzak. Na 2 minuten extraheren m.b.v. de stomacher werd de dichloormethaan

afgeschonken over glaswol. Deze extractie werd tweemaal herhaald. Aan de verzamelde extracten werd 25 ml petroleumether toegevoegd en gemengd. Een Sep-Pak silica cartridge (Waters no. 51900) werd met 50 ml dichloormethaan voorgespoeld. De monsteroplossing werd met behulp van een wegwerpspuit op de Sep-Pak cartridge gebracht en de cartridge werd gespoeld met 5 ml dichloormethaan. Na 15 minuten drogen van de cartridge met stikstof werden de sulfonamiden geëluëerd met 5 ml fosfaatbuffer (pH 10,0). De eerste 3 ml van het eluaat werd in een gecalibreerde buis opgevangen. De pH van het eluaat werd gecontroleerd en zonodig bijgesteld tot pH 6,5. Aan het extract werd 2 ml ethylacetaat toegevoegd en vervolgens werd gedurende 20 seconden gemengd en gedurende 1 minuut bij 2000 rpm gecentrifugeerd. De ethylacetaatfase werd afgenomen en overgebracht in een buis. De extractie werd tweemaal herhaald en de verzamelde ethylacetaatfracties werden ingedampt tot droog. Het residu werd opgelost in 2 ml PBS en deze oplossing werd in de EIA gebracht.

2.3.2 Opwerkingsprocedures voor veevoeder

2.3.2.1 Cortecs-procedure voor veevoeder

Veevoeder (1 g) werd gehomogeniseerd met 8 ml extractievloeistof en vervolgens werd gedurende 10 minuten bij 3000 rpm gecentrifugeerd. Het heldere supernatant werd in de EIA gebracht. Deze werkwijze was voor sulfamethazine en sulfadiazine gelijk.

2.3.2.2 Randox-procedure voor veevoeder

Veevoeder (10 g) werd gemengd met 100 ml 80 % methanol. Het mengsel werd gedurende 30 minuten verwarmd bij 70 °C en vervolgens gedurende 30 minuten geschud. Van de vloeistof werd 10 ml afgenomen en gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 2000 rpm. Het supernatant werd onder stikstof drooggedampt en het residu in 10 ml 1mM acetaatbuffer (pH 7,0) opgelost onder verwarmen tot 37°C. Na afkoelen tot kamertemperatuur werd deze oplossing in de EIA gebracht.

2.3.2.3 RIKILT-DLO-procedure voor veevoeder

Veevoeder (10 g) werd gemengd met 50 ml methanol en de oplossing werd gedurende 1 uur geschud en vervolgens over een vouwfilter gefiltreerd. Breng 12,5 g aluminiumoxide (Merck 1097) in een glazen kolom. Breng het filtraat op de kolom. Was de kolom met 30 ml ethanol. Elueer de sulfonamiden met 50 ml zure methanol. Voeg aan het eluaat enkele druppels ammonia toe tot zich een neerslag vormt. De pH moet 6 zijn. Centrifugeer 10 minuten bij 2500 rpm. Verdamp het supernatant bij 50°C. Voeg aan het residu 5 ml PBS toe. Schud de oplossing 5 minuten. Gebruik deze oplossing in de EIA.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

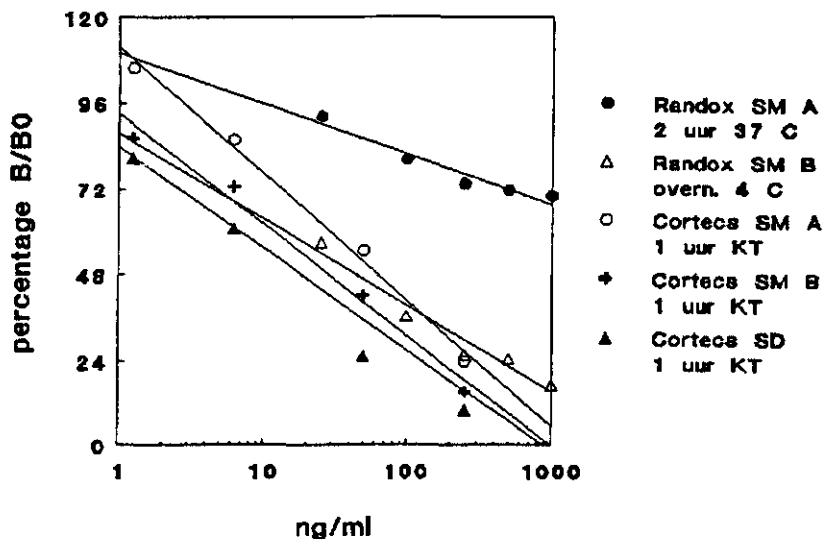
3.1 Het maximale signaal

Eén van de belangrijke parameters bij een competitieve EIA is het maximale signaal verkregen met een nulstandaard (ook wel de B₀ genaamd). In het algemeen dient een dergelijk signaal tussen de 1,0 en 2,0 extinctie-eenheden te liggen. Een dergelijk maximaal signaal is ondermeer afhankelijk van de incubatiecondities.

Bij de Radox-kit worden twee incubatiecondities omschreven: 2 uur bij 37°C of overnacht bij 4°C. Er is een duidelijk verschil tussen beide incubatiecondities waargenomen. Een incubatie van 2 uur bij 37°C leverde een B₀ (gemeten bij 490 nM) van 0,6 extinctie-eenheden op terwijl een overnacht incubatie bij 4°C een B₀ van 2,4 gaf. Ook de ijkcurven gaven onder deze twee condities duidelijke verschillen (zie 3.2).

Bij de twee testen van Cortecs werd een incubatie van 1 uur bij kamertemperatuur voorgeschreven. De sulfamethazinekit gaf op de eerste dag, waarbij de helft van een microtiterplaat werd gebruikt, een maximale extinctie (gemeten bij 405 nM) van 0,65. Tijdens het tweede experiment, een paar dagen later uitgevoerd met de tweede helft van de kit, werd een maximaal signaal van slechts 0,37 waargenomen. De sulfadiazinekit werd in zijn geheel op één dag verbruikt en daarbij werd een maximaal signaal van slechts 0,35 gemeten. Het maximale signaal van de beide Cortecs-kits is dus te laag. Mogelijk kunnen andere incubatiecondities hierin verbetering brengen. Volgens het protocol van de Cortecs-kits zou het peroxidase conjugaat in gevriesdroogde vorm worden geleverd. In de ontvangen kits werden de conjugaten in opgeloste vorm aangetroffen. Mogelijk is dit de oorzaak van het lage signaal (instabiel conjugaat).

3.2 De ijkcurven



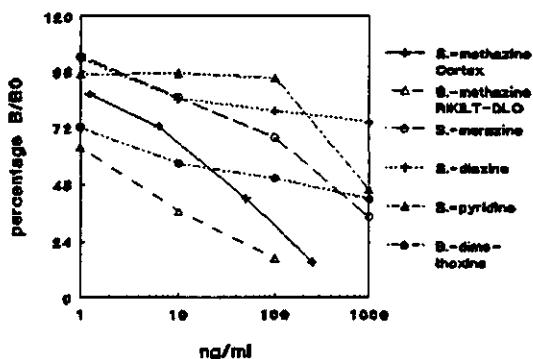
Figuur 3: Ijkcurven van sulfamethazine (SM) en sulfadiazine (SD) verkregen met EIA-kits van Radox en Cortecs.

Aan de hand van de ijkcurven (standaardoplossingen) werd een indicatie van de gevoeligheid van een kit verkregen (zie Figuur 3).

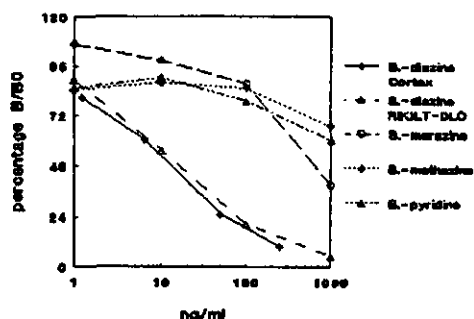
De Randox-kit gaf na een incubatie van 2 uur bij 37°C een te vlakke ijkcurve. Na overnacht incubatie bij 4°C werd de Randox-ijkcurve beter en vergelijkbaar met de Cortecs-ijkcurven. Een standaardoplossing van 10 ng/ml gaf bij de Cortecs-ijkcurven een duidelijk verschil met de nulstandaard. De laagste voorgeschreven standaard bij de Randox kit was 25 ng/ml.

3.3 Kruisreactiviteit

Van de twee test-kits van Cortecs werd de kruisreactiviteit voor andere sulfonamiden bepaald (zie Figuren 4 en 5). Voorts werden de bij de kits geleverde standaardoplossingen vergeleken met een RIKILT-DLO standaardoplossing.



Figuur 4: Kruisreactiviteit van de Cortecs sulfamethazine kit.



Figuur 5: Kruisreactiviteit van de Cortecs sulfadiazine kit.

De door Cortecs geleverde sulfadiazine standaard kwam goed overeen met die van het RIKILT-DLO. Bij de sulfamethazinestandaarden werd een meetbaar verschil tussen Cortecs en RIKILT-DLO gevonden.

De Cortecs sulfamethazine kit vertoonde, zoals door de fabrikant opgegeven, de meeste kruisreactiviteit met sulfamerazine. Voor de overige sulfonamiden was de kruisreactiviteit laag.

3.4 Monstervoorbewerking

Bij iedere kit zijn voor zowel vlees als veevoeder drie procedures voor de monstervoorbewerking toegepast. De Cortecs-kit beschrijft de meest eenvoudige procedure (homogeniseren met een bijgeleverde extractievloeistof en centrifugeren). De concentratie vlees en veevoeder in het uiteindelijke extract is 0,143 g vlees/ml en 0,125 g veevoeder/ml.

De door Randox beschreven monstervoorbewerking is meer uitgebreid en de concentratie vlees en veevoeder in de eindextracten is 1 g vlees/ml en 0,1 g veevoeder/ml. De gebruikte RIKILT-DLO monstervoorbewerkingsprocedure wordt eigenlijk toegepast bij een HPLC bepaling van sulfonamiden en is zeer uitgebreid. Deze procedure geeft concentraties van 1 g vlees/ml en 2 g veevoeder/ml.

De drie beschreven procedures voor vlees resulteerden in heldere extracten. Bij veevoerders werden in de eindextracten nog onoplosbare deeltjes waargenomen.

Tabel 1: De verkregen percentages B/B0 van vlees en veevoeder met en zonder toevoeging van sulfamethazine in de Cortecs- en Randox-kit en met verschillende monstervoorbewerkingsprocedures.

MONSTER	CORTECS-KIT monstervoorbewerking			RANDOX-KIT monstervoorbewerking		
	Cortecs	Randox	RIKILT-DLO	Cortecs	Randox	RIKILT-DLO
Vlees (blanco)	56	115	133	96	46	118
Vlees + 8 ppb	56	83	96	89	77	102
Vlees + 8 ppb	44	92	83	99	98	86
Vlees + 50 ppb	40	80	67	96	87	77
Veevoeder (blanco)	120	57	165	108	71	142
Veevoeder + ca.1 ppm	31	8	54	43	8	105

De Cortecs-kit gaf met de voorgeschreven monstervoorbewerking voor het blanco vleesmonster een B/B0 van 56% hetgeen volgens de ijkcurve (zie Figuur 3) overeenkwam met een gehalte van ca. 40 ng/ml. Omgerekend naar vlees was dit een achtergrond die overeenkwam met 280 ng/g. Hierdoor is een controle op het 100 ng/g niveau onmogelijk. Dit blijkt eveneens uit het geringe verschil in B/B0 (16%) tussen blanco vlees en hetzelfde monster met toevoeging van 50 ng/g sulfamethazine.

Een meer uitgebreide voorbewerking zoals voorgeschreven door Randox of RIKILT-DLO had een gunstig resultaat op het achtergrondsignaal van blanco vlees verkregen met de Cortecs-kit. Ook het verschil tussen de blanco en het monster met 50 ng/g toevoeging werd groter (35 en 66%). Door aanpassing van de beschreven monstervoorbewerking lijkt het dus

mogelijk om met de Cortecs-kit vleesmonsters te kunnen controleren op de aanwezigheid van sulfamethazine op het niveau van 100 ng/g.

Voor veevoeder lijkt de Cortecs-monstervorbewerking voldoende. Het achtergrondsignaal van de blanco was laag en de afname met veevoeder dat ca. 1 ppm sulfamethazine bevat was groot. De meer uitgebreide monstervorbewerking lijkt hier niet noodzakelijk.

De Randox-kit was, in combinatie met de voorgeschreven monstervorbewerking eveneens ongeschikt voor de controle van vlees op het 100 ng/g niveau. De in blanco vlees gemeten achtergrond was zeer hoog.

Ook de uitgebreide RIKILT-DLO vorbewerkingsprocedure gaf in combinatie met de Randox-kit een minder resultaat vergeleken met de Cortecs- kit.

Voor veevoeder leek deze kit in combinatie met de beschreven vorbewerkingsprocedure wel geschikt.

De sulfadiazine-kit van Cortecs werd voornamelijk beoordeeld omtrent de kruisreactiviteit van de kit voor andere sulfonamiden (zie 3.3). Een blanco vleesmonster en vlees met toevoeging van 10 en 50 ng/g werd eveneens meegenomen. Hierbij werd alleen de Cortecs-monstervorbewerking toegepast en dit resulteerde in een lage achtergrond van 89,3% B/B0 voor de blanco hetgeen overeenkwam met <1 ng/ml en < 7 ng/g in vlees. Het monster met toevoeging van 50 ng sulfadiazine/g vlees gaf een duidelijke signaalverlaging (62,8% B/B0). Dit geeft een goede indicatie voor de bruikbaarheid van de kit voor de controle van vleesmonsters op het 100 ng/g niveau.

3.5 De EZ-screentest voor sulfamethazine

Deze test werd voornamelijk getoetst op de bruikbaarheid in de slachtfase waarbij urine uit het nierbekken (pré-urine) wordt gebruikt als controlemateriaal. Bij de nu toegepaste NNNT wordt eveneens uitgegaan van pré-urine. Hierbij worden schijfjes in het nierbekken gebracht waarmee het monstermateriaal wordt opgezogen. Deze urine bevattende schijfjes worden eveneens gebruikt bij de controle op chlooramfenicol met de La-Carte test. Deze test berust op hetzelfde principe als de EZ-Screen test. Doel van de testprocedure was om te beoordelen of een dergelijke procedure eveneens toepasbaar is voor sulfamethazine.

In eerste instantie werd een blanco urinemonster (RIKILT-DLO nr. 18147) verdund in de bijgeleverde verdunningsbuffer (50, 20 en 10 keer) en vergeleken met de bijgeleverde blanco controle. Tussen de blanco controle en de verschillende verdunningen van het urinemonster werd geen verschillende kleur van de spots waargenomen. Met de verdunning van 50 keer is het mogelijk om urinemonsters op het 500 ng/ml niveau te kunnen controleren op de aanwezigheid van sulfamethazine (zou overeen komen met 100 ng/g weefsel). Het lijkt dus mogelijk om het urinemonster minder verdund in de test te gebruiken waardoor de

gevoeligheid van de test beter wordt.

Aan dezelfde urine werd 100 en 200 ng sulfamethazine per ml toegevoegd en na 20 keer verdunnen waren de hiermede verkregen spots lichter dan de controlespot. Een controle op 200 ng/ml niveau lijkt mogelijk. Een meer uitgebreid onderzoek naar de mogelijke invloed van verschillende urinemonster moet nog plaatsvinden.

Vervolgens werd aan het urinemonster sulfamethazine op het 0, 100, 200, 300, 400 en 500 ng/ml niveau toegevoegd. Aan deze monsters werd een schijfje zoals gebruikt bij de NNNT toegevoegd. Uit weegexperimenten is gebleken dat een dergelijk schijfje ca. 150 μ l urine opzuigt. De schijfjes werden in de bij de test geleverde verdunningsbuffer (4,5 ml) gebracht en het geheel werd geschud. Deze verdunning van het monster komt neer op ca. 30 keer. Vanaf 300 ng/ml was er een duidelijke afname van de kleurintensiteit van de spots waarneembaar.

Per verpakking worden 2 testkaarten met ieder 2 spots (1 voor de blanco controle en 1 voor het monster) en 2 buisjes met verdunningsbuffer (4,5 ml per buisje) geleverd. Per verpakking kunnen dus 2 monsters geanalyseerd worden. De test is eenvoudig omdat de juiste hoeveelheid verdunningsbuffer in het buisje aanwezig is en de schijfjes in het buisje passen.

De kruisreactiviteit van een aantal sulfonamiden werd uitgetest door standaardoplossingen van 10; 100; 1000; en 10000 ng/ml te gebruiken. Hiervan werd een druppel (ca. 50 μ l) per spot toegevoegd.

De absolute gevoeligheid van de test voor sulfamethazine bedraagt ca. 0,5 ng. Dit komt overeen met een standaardoplossing van 10 ng/ml. Indien er bij 10; 100; 1000 en 10000 ng/ml geen kleur ontstaat wordt de kruisreactiviteit op respectievelijk <100; <10; <1; en <0,1 % gesteld. In Tabel 2 wordt het resultaat voor zes sulfonamiden weergegeven.

Tabel 2: De kruisreactiviteit van zes sulfonamiden met de EZ-screen test.

Sulfonamide Kruisreactiviteit	Kleurintensiteit bij concentratie (ng/ml)				(%)
	10	100	1000	10000	
Sulfamerazine	blauw	licht blauw	blank	blank	10
Sulfadiazine	blauw	blauw	blauw	licht blauw	<1
Sulfadoxine	blauw	blauw	blauw	blauw	<0,1
Sulfadimethoxine	blauw	blauw	licht blauw	licht blauw	1
Sulfaquinoxaline	blauw	blauw	blauw	licht blauw	0,1
Sulfathiazol	blauw	blauw	blauw	licht blauw	0,1

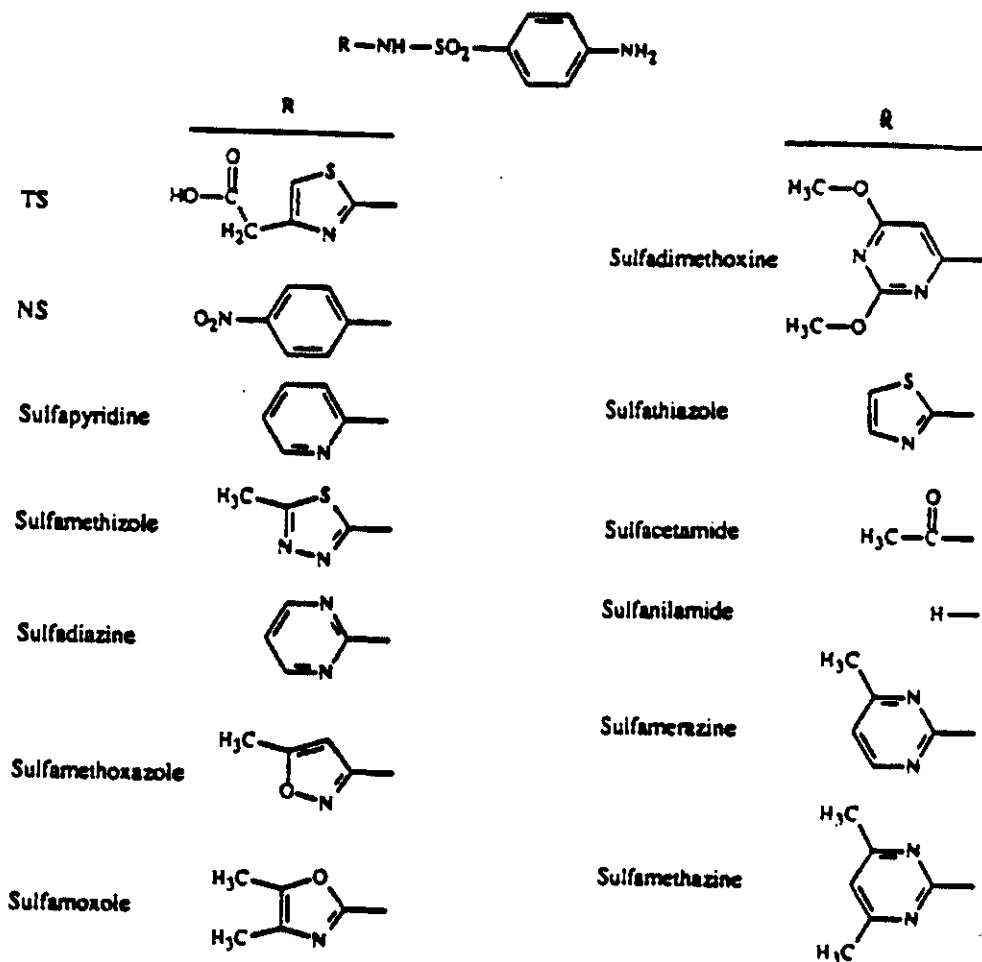
Volgens de beschrijving bij de test vertonen de sulfonamiden Sulfaquinoxiline, sulfadimethoxine en sulfathiazole een kruisreactiviteit van <0,01%. Uit bovenstaande tabel blijkt dat een redelijk hoge kruisreactiviteit met sulfamerazine (ca. 10%) wordt gevonden. Voor sulfadimethoxine bedraagt de geschatte kruisreactiviteit ca. 1% en voor de overige sulfonamiden is de kruisreactiviteit lager.

3.6 Aanvullend onderzoek

Het hiervoor beschreven onderzoek is slechts bedoeld om een indicatie te verkrijgen omtrent de mogelijke bruikbaarheid van commercieel verkrijgbare testen. Aanvullend onderzoek is noodzakelijk om de testen verder op hun juiste waarde te kunnen inschatten. In ieder geval is gebleken dat de testen redelijk specifiek zijn voor de stof waarvoor zij zijn ontwikkeld. Voor de keuring op meerdere sulfonamiden tegelijk is dit nadelig. Hierbij zou een minder specifieke test meer van toepassing zijn.

Een dergelijke minder specifieke test zou ontwikkeld kunnen worden door antilichamen op te wekken tegen het aromatische amine dat bij alle sulfonamiden voorkomt (zie Figuur 6). Sheth en Sporns [6] beschrijven de ontwikkeling van een immunoassay gebaseerd op dergelijke antilichamen en geven aan dat negen in structuur verschillende sulfonamiden hiermee reageren.

Een test gebaseerd op dergelijke minder specifieke antilichamen is voor zover bekend nog niet commercieel beschikbaar en zou binnen RIKILT-DLO kunnen worden ontwikkeld.



Figuur 6: Structuren van verschillende sulfonamiden.

4 CONCLUSIE

De gevoeligheid van de testen ligt in dezelfde ordegrootte. Volgens de ijkcurven kan de beslisgrens liggen tussen de 10 en 100 ng/ml. Met de Cortecs-testen wordt een te laag maximaal signaal (B0) verkregen (0,3-0,6 extinctie-eenheden). Verandering van incubatieomstandigheden zou hierin verbetering kunnen brengen. Inmiddels heeft Cortecs een ander meer stabiel enzymconjugaat in de test gebracht waarmee een hoger maximaal signaal verkregen zou kunnen worden.

De microtiterplaattesten van Cortecs en Randox lijken te voldoen voor de controle van veevoeders op aanwezigheid van sulfamethazine vanaf in ieder geval het 1 mg/kg niveau. De door Cortecs beschreven monstervoorbewerking heeft vanwege de eenvoud (een simpele extractiestap) hierbij de voorkeur. Uiteraard dienen bij toekomstig gebruik eerst meerdere veevoedermonsters bekeken te worden omtrent achtergrondsignaal (blanco veevoeders). De voornaamste toepassing zal echter de controle van vlees en organen zijn en hierbij vertonen beide testsystemen problemen. Volgens de bij de testen geleverde monstervoorbewerkingsprocedures wordt voor blanco kippevlees een te hoge achtergrond gemeten. Mede hierdoor is de controle op het gewenste 100 ng/g niveau niet mogelijk. Door een meer uitgebreide voorbewerking te gebruiken lijkt de Cortecs-kit wel toepasbaar op het gewenste niveau. Nader onderzoek naar de achtergrond bij varkens- en rundvlees en organen dient te worden uitgevoerd.

De EZ-screentest lijkt toepasbaar voor pré-urine met een beslisgrens rond het 300 ng/ml niveau wat volgens de fabrikant overeenkomt met in ieder geval een niveau lager dan 100 ng/g in lever. De test is snel (binnen 10 minuten resultaat) en gemakkelijk uitvoerbaar en geschikt voor toepassing op kringlaboratoria met een relatief laag monsteraanbod (enkele monsters per dag).

De kruisreactiviteit van andere sulfonamiden in de testen is laag (<25%). Volgens de literatuur moet het mogelijk zijn om een immunoassay te ontwikkelen die geschikt is voor meerdere sulfonamiden. Hierbij zouden de te ontwikkelen antilichamen gericht moeten zijn op het in alle sulfonamiden voorkomende aromatische amine.

LITERATUUR

1. L.M.H. Frijns, Rapportage monsters Nationaal Plan Overige Stoffen: Jaaroverzicht 1991, CL-RVV (1992-03-30).
2. RIKILT-DLO RSV in concept, Vlees (varken, kip en kalf) - Screening van sulfonamiden en Dapson met HPTLC (1990-04-04).
3. RIKILT-DLO RSV in concept, Kippevlees - Bepaling en bevestiging van sulfonamiden - HPLC-UV-Vis Diode Array (1990-08-17).
4. J.F.M. Nouws, N.J.G. Broex, J.M.P. den Hartog en F. Driessens, The New Dutch Kidney Test, Archiv Lebensmittelhyg., 39 (1988) 135-138.
5. L.M.H. Frijns, M. Schreurs en B.P.M. Rutjes, CL-RVV Rapport r92160, Verdachte dieren slachtfase, Jaaroverzicht 1991 (1992-05-12).
6. H.B. Sheth en P. Sporns, Development of a single ELISA for detection of sulfonamides, J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1696-1700.

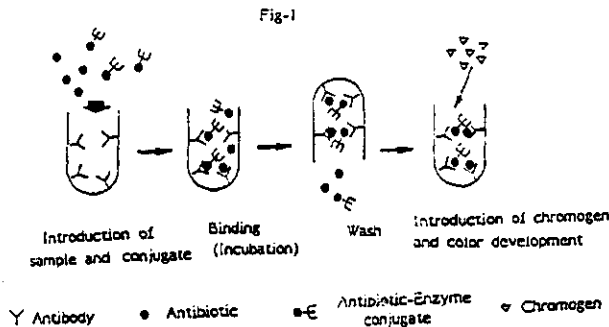
Bijlage I:

Protocol van de Cortecs Sulfamethazine-kit

Sulfamethazine EIA Test Kit

PRINCIPLES OF THE TEST

This test is developed to detect residues of Sulfamethazine in animal meat, milk, urine, blood; fish or feed. It is based on Competitive Immunoassay with antibodies which bind to both Sulfamethazine and Sulfamethazine-enzyme conjugate. In this Competitive assay, color is inversely proportional to the sample concentration of Sulfamethazine.



CONTENTS OF THE KIT

1. Anti Sulfamethazine antibody coated microtitre plate (96 wells) 1
2. Peroxidase conjugated Sulfamethazine (freeze dry) 1
3. Sulfamethazine standard 1 ml x 4
4. Wash solution concentrate 10-fold 50 ml x 2
5. Magnesium sulfate extraction concentrate 10-fold 25 ml x 1
6. Chromogen solution 10-fold 2 ml x 1
(2,2-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline Sulfonic acid))
7. Citrate buffer solution (containing Hydrogen Peroxide) 12 ml x 1
8. Stop solution (containing Sodium Fluoride) 12 ml x 1

PREPARATION OF KIT COMPONENTS

1. WASH SOLUTION

Wash solution is supplied as a 10-fold concentrate and it requires 1/10 dilution in de-ionized water to prepare the working wash solution. It is stable for a month at room temperature.

2. PEROXIDASE CONJUGATE

Reconstitute the Peroxidase conjugate with working wash solution according to the instructions on the vial. Mix well. Store the adjusted Peroxidase conjugate solution in refrigerator, and use within one week. Keep in freezer (-20°C) for several months storage.

3. EXTRACTION SOLUTION

Dilute 1/10 (1:9) Extraction concentrate in working wash solution. Store in refrigerator and use within 3 days.

4. CHROMOGEN

Dilute 1/10 (1:9) Chromogen in Citrate buffer solution. Use within 24 hours as the chromogen loses reactivity in solution. If a defective chromogen is used for the assay, the blank well will show too high an O/D value.

PREPARATION OF TEST SAMPLE

1. Animal meat and organ tissue

- a) Prepare 1g of sample and 7 ml of Extraction solution. (or any volume at a ratio of 1:7)
 - b) Homogenize well.
 - c) Centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes. Use the clear supernatant as test sample.
- If necessary, take out fat from liquid.
 - The test samples can be stored in refrigerator for a few days. For longer storage, keep in freezer (-20°C).

2. Serum, milk and urine

- a) Mix sample and Extraction solution at a ratio of 1:7, and use it as test sample.
- b) If necessary, centrifuge for avoiding slurry.

3. Animal feed

- a) Mix well the sample and Extraction solution at a ratio of 1:8.
- b) Centrifuge and use the clear supernatant as test sample.

Note

- All samples must be kept at pH between 6 and 8. Otherwise adjust the pH of samples with solution of Hydrochloric acid or Sodium hydroxide.
- For test of high viscosity or high protein concentrate samples, it is possible to observe interferences in results.
- Rabbit Antibodies are used for this kit. The test results will be interfered with by molecules which might react to these antibodies.
Ex ; Anti-Rabbit IgG Antibody.
- Since Peroxidase is used for this kit, the results will be interfered with by existence of chemicals in sample which are obstructive to the reaction of Peroxidase.
Ex ; Cyanogen, Azide, Fluorine.

IMMUNOASSAY PROCEDURE

1. Allow all reagents, microwell modules and samples to reach Room Temperature.
2. Using new pipette tip, place 50 µl of a control standard or sample into the well.
3. Immediately, add 50 µl of Peroxidase conjugate solution to the well.
4. For other standards and samples, follow procedures 2 and 3.
In case of a large number of samples, mix in advance each sample or standard with Peroxidase conjugate solution. Then place pre-mixed samples and standards into each well.
5. Incubate all wells at Room Temperature for 1 hour. The wells should be covered to prevent evaporation during the incubation.
6. Empty all wells, and add Working Wash Solution into the wells. Repeat these procedures twice more and empty them. (total 3 times at least)
7. Using new pipette tip, Place 100 µl of Chromogen into each wells.
8. Incubate wells at Room Temperature for 15 - 30 min, until the highest O.D. value in the control standards (the well of 1.25 ng/ml/10 ppb or blank), reaches to the range of 1.0 to 1.4
- Usual color development time is around 30 min. When the kit is very new, it takes only about 15 min., but when the kit is nearly expired (after long storage or under bad storage), it takes nearly 50 min.
- If the color development range between 1.0 - 1.4, it requires less than 15 min, so additionally diluted chromogen becomes necessary (20 - 30% dilution). In such case, color development should take more than 15 min.
- If the color development range between 1.0 - 1.4, it requires more than 50 min, then the kit is already defective or the assay is invalid.
9. Pipette 100 µl Stop Solution into each well to stop the reaction.
10. Read optical absorption values of each wells at 400 - 420 nm.
11. Plot O/D values of the standards on semi-Log graph. With such standard curve, read the values of each samples in ppb.

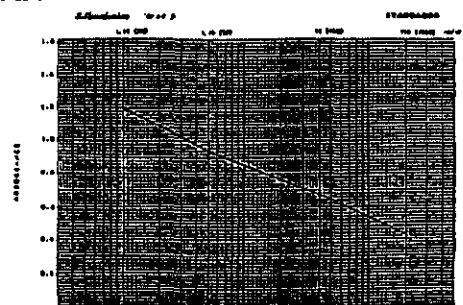
Note

-PEROXIDASE CONJUGATE MUST NOT BE CONTAMINATED WITH STOP SOLUTION.

CROSS-REACTIVITY

Sulfamethazine 100 %, Sulfamerazine 28 %, Sulfadiazine 0.5 %
 With other Sulfonamide antibiotics the crossreactivity is less than 0.1 %

Example of standard curve



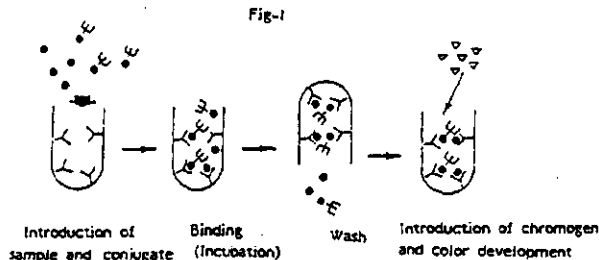
Bijlage II:

Protocol van de Cortecs Sulfadiazine-kit

Sulfadiazine EIA Test Kit

PRINCIPLES OF THE TEST

This test is developed to detect residues of Sulfadiazine in animal meat, milk, urine, blood; fish or feed. It is based on Competitive Immunoassay with antibodies which bind to both Sulfadiazine and Sulfadiazine-enzyme conjugate. In this Competitive assay, color is inversely proportional to concentration of Sulfadiazine.



Y Antibody • Antibiotic e-E Antibiotic-Enzyme conjugate o Chromogen

CONTENTS OF THE KIT

1. Anti Sulfadiazine antibody coated microtitre plate (96 wells) 1
2. Peroxidase conjugated Sulfadiazine (freeze dry) 1
3. Sulfadiazine standards 1 ml x 6
4. Wash solution concentrate 10-fold 30 ml x 2
5. Magnesium sulfate extraction concentrate 10-fold 25 ml x 1
6. Chromogen solution 10-fold 2 ml x 1
(2,2-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline Sulfonic acid))
7. Citrate buffer solution (containing Hydrogen Peroxide) 12 ml x 1
8. Stop solution 12 ml x 1

PREPARATION OF KIT COMPONENTS

1. WASH SOLUTION

Wash solution is supplied as a 10-fold concentrate and it requires 1/10 dilution in de-ionised water to prepare the working wash solution. It is stable for a month at room temperature.

2. PEROXIDASE CONJUGATE

Reconstitute the Peroxidase conjugate with working wash solution according to the instructions on the vial. Mix well. Store the adjusted Peroxidase conjugate solution in refrigerator, and use within one week. Keep in freezer (-20°C) for several months storage.

3. EXTRACTION SOLUTION

Dilute 1/10 (1:9) Extraction concentrate in working wash solution. Store in refrigerator and use within 3 days.

4. CHROMOGEN

Dilute 1/10 (1:9) Chromogen in Citrate buffer solution. Use within 24 hours as the chromogen loses reactivity in solution. If a defective chromogen is used for the assay, the blank well will show too high an O/D value.

PREPARATION OF TEST SAMPLE

1. Animal meat and organ tissue

- Prepare 1g of sample and 7 ml of Extraction solution. (or any volume at a ratio of 1:7)
- Homogenize well.
- Centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes. Use the clear supernatant as test sample.

- If necessary, take out fat (from liquid).
- The test samples can be stored in refrigerator for a few days. For longer storage, keep in freezer (-20°C).

2. Serum, milk and urine

- Mix sample and Extraction solution at a ratio of 1:7, and use it as test sample.
- If necessary, centrifuge for avoiding slurry.

3. Animal feed

- Mix well the sample and Extraction solution at a ratio of 1:8.
- Centrifuge and use the clear supernatant as test sample.

Note

- All samples must be kept at pH between 6 and 8. Otherwise adjust the pH of samples with solution of Hydrochloric acid or Sodium hydroxide.
- For test of high viscosity or high protein concentrate samples, it is possible to observe interferences in results.
- Rabbit Antibodies are used for this kit. The test results will be interfered with by molecules which might react to these antibodies.
Ex ; Anti-Rabbit IgG Antibody.
- Since Peroxidase is used for this kit, the results will be interfered with by existence of chemicals in sample which are obstructive to the reaction of Peroxidase.
Ex ; Cyanogen, Azide, Fluorine.

IMMUNOASSAY PROCEDURE

1. Allow all reagents, microwell modules and samples to reach Room Temperature.
2. Using new pipette tip, place 30 µg of a control standard or sample into the well.
3. Immediately, add 50 µg of Peroxidase conjugate solution to the well.
4. For other standards and samples, follow procedures 2 and 3.
In case of a large number of samples, mix in advance each sample or standard with Peroxidase conjugate solution. Then place pre-mixed samples and standards into each well.
5. Incubate all wells at Room Temperature for 1 hour. The wells should be covered to prevent evaporation during the incubation.
6. Empty all wells, and add Working Wash Solution into the wells. Repeat these procedures twice more and empty them. (total 3 times at least)
7. Using new pipette tip, Place 100 µg of Chromogen into each well.
8. Incubate wells at Room Temperature for 15 - 30 min, until the highest O.D. value in the control standards (the well of 1.25 ng/ml/10 ppb or blank), reaches to the range of 1.0 to 1.4
- Usual color development time is around 30 min. When the kit is very new, it takes only about 15 min., but when the kit is nearly expired (after long storage or under bad storage), it takes nearly 50 min.
- If the color development range between 1.0 - 1.4, it requires less than 15 min, so additionally diluted chromogen becomes necessary (20 - 30% dilution). In such case, color development should take more than 15 min.
- If the color development range between 1.0 - 1.4, it requires more than 50 min, then the kit is already defective or the assay is invalid.
9. Pipette 100 µg Stop Solution into each well to stop the reaction.
10. Read optical absorption values of each wells at 400 - 420 nm.
11. Plot O/D values of the standards on semi-Log graph. With such standard curve, read the values of each samples in ppb.

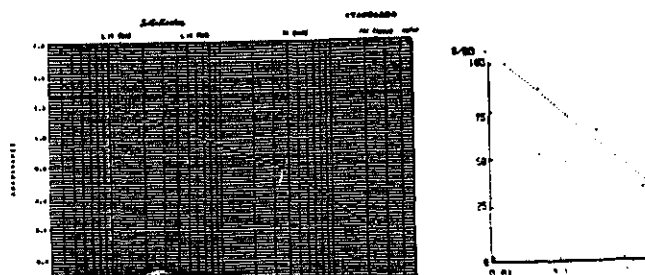
Note

-PEROXIDASE CONJUGATE MUST NOT BE CONTAMINATED WITH STOP SOLUTION.

Specificity

Compound	% Cross-reactivity	Compound	% Cross-reactivity
Sulfaquinoxaline	< 0.05	Sulfadiazine	100
Sulfamonomethoxime	1.4	Sulfamethoxazole	< 0.05
Sulfadimethoxime	< 0.05	Sulfamethoxypridazine	< 0.05
Sulfamethazine	2.4	Sulfanilamide	< 0.05
Sulfamerazine	5.1	Sulfanilic acid	< 0.05

Standard curve



Bijlage III:

Protocol van de Randox Sulfamethazine-kit

RANDOX

SULPHAMETHAZINE SULPHADIMIDINE

Cat. No.

SM 1400	1 x 96 tests	Microtitre plate	1 plate
		2. Working buffer	2 vials
		3. Conjugate	2 vials
		4. Chromogen	2 vials
		5. Standard	2 vials

ACCESSORY KITS

SM 1401	10 x 1 ml	1. Negative Urine	6 vials
		2. Urine-elevated	2 vials
		3. Urine-low	2 vials
SM 1402	10 x 1 ml	1. Negative feed	6 vials
		2. Feed-elevated	2 vials
		3. Feed-low	2 vials
SM 1403	10 x 1 ml	1. Negative tissue	6 vials
		2. Tissue-elevated	2 vials
		3. Tissue-low	2 vials

This kit measures quantitatively the level of Sulphamethazine (SMT) in urine, tissue and feed samples.

PRINCIPLE

Antibody to SMT is bound to a microtitre plate. SMT (antigen) in the sample competes with the horseradish peroxidase labelled SMT (enzyme-labelled antigen) for binding to the limited number of antibody sites on the microtitre plate. The enzyme substrate (H_2O_2) and the chromogen o-phenylenediamine (o-PD) are added. After an appropriate time has elapsed for maximum color development, the enzyme reaction is stopped and the absorbances are determined. SMT concentration in the sample is calculated from a standard curve. The colour intensity is inversely proportional to the concentration of SMT in the sample.

SAMPLE PREPARATION

URINE

From the pig to be tested, collect a small fresh sample of urine in a clean glass (not plastic) container with a lid. Urine samples and urine controls should be centrifuged at 3000 rpm for 12 min before analysis to remove any particulate material which may interfere with the test. Properly identify the sample and store at +4°C. Store at -20°C if not to be used immediately.

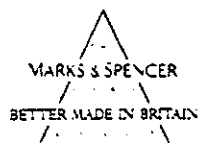
TISSUE

- Weigh out 2.5 g of kidney, diaphragm or gluteal muscle tissue using small pieces cut from a partially frozen sample.
- Add 10 ml of ethyl acetate and homogenize for 3 minutes.
- Add 5 ml of ethyl acetate.
- Mix (end over end) for 15 minutes.
- Centrifuge at 2000 rpm for 5 minutes.
- Remove 12 ml of the supernatant and evaporate to dryness.
- When cool add 1 ml of 50% methanol in 1% acetic acid and vortex for 2 minutes.
- Add 5 ml of diethyl ether and mix gently for 2 minutes.
- Centrifuge at 2000 rpm for 5 minutes.
- Remove the ether layer and discard.
- Evaporate the methanol layer to dryness.
- Add 2 ml of 1 mmol/l acetate buffer, pH 7.0, pre-warmed to 37°C and vortex for 2 minutes. Store in a clean glass container at +2 to +8°C. Store at -20°C if not to be used immediately.

FEED

- Weigh out 10 g of feed
- Add 100 ml of 80% methanol.
- Heat at 70°C for 30 minutes in incubator.
- Shake for 30 minutes.
- Take off 10 ml and spin at 2000 rpm for 10 minutes.
- Evaporate the supernatant to dryness under N_2
- Resuspend in 10 ml of 1 mM sodium acetate buffer pH 7.0, pre-warmed to 37°C.

Store in a clean glass container at +2 to +8°C. Store at -20°C if not to be used immediately.



REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

REAGENTS

Contents	Initial Concentration of solutions

Antibody coated Microtitre plate	
2. Working buffer	
Acetate Buffer	1 mmol/l, pH 7.4
BSA	
3. Conjugate	
Horseradish peroxidase - Sulphamethazine	
4. Chromogen	
o-phenylenediamine	2 mmol/l
Citrate/Phosphate buffer	20 mmol/l, pH 5.6
5. Standard	
Sulphamethazine	1000 ng/ml

Store all reagents in the dark at +4 to +8°C.

ADDITIONAL REAGENTS NOT SUPPLIED WITH THE KIT

All tests:-

- Hydrogen peroxide (30% w/v)
- Sulphuric acid (2.5 M)
- Wash buffer (0.9% NaCl; 1% TWEEN 20)
- 1 mM sodium acetate buffer (pH 7.0)

Tissue test only:-

- Ethyl acetate
- 50% Methanol in 1% Acetic acid soln.
- Diethyl ether

Feed test only:-

- 80% Methanol

MATERIALS AND INSTRUMENTATION

- Colorimeter/Microtitre Plate reader
- Waterbath/Incubator at 37°C
- Pipettes : 10 µl to 100 µl
- Method of washing plate.
- Plate sealers

PREPARATION OF REAGENTS AND STABILITY

Negative sample and controls

Reconstitute the appropriate negative sample and control with 1 ml of distilled water. Stable for 1 week at +2 to +8°C.

2. Working buffer

Reconstitute the contents of one vial of working buffer 2 with 50 ml of distilled water. Stable for 3 weeks at +2 to +8°C.

3. Conjugate

Prepare immediately before use.

Reconstitute the contents of one vial of conjugate 3 with the volume of working buffer detailed with each kit.

Use immediately.

4. Chromogen

Prepare immediately before use .

Reconstitute the contents of one vial of chromogen 4 with 6 ml of distilled water. Add 10 µl of hydrogen peroxide and mix well.

Use immediately.

5. Standard

Reconstitute the contents of one vial of standard 5 with 5 ml of distilled water. Stable for 1 week at +2 to +8°C.

Before use dilute with working buffer to give a range of concentrations depending on the test to be performed. Suggested dilutions are as follows:-

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
ng/ml	0	25	100	250	500	1000

	Volume of Standard sol ⁿ	Volume of Working Buffer
S ₅	2 ml of S ₆	2 ml
S ₄	2 ml of S ₅	2 ml
S ₃	2 ml of S ₄	3 ml
S ₂	1 ml of S ₃	3 ml

PROCEDURE

As it is necessary to perform the test in triplicate the following layout is recommended for a test plate where boxes represent 3 wells.

S1	T1	T9	T17
S2	T2	T10	T18
S3	T3	T11	T19
S4	T4	T12	T20
S5	T5	T13	T21
S6	T6	T14	T22
QC _L	T7	T15	T23
QC _E	T8	T16	T24

S = STANDARD, QC = QUALITY CONTROL LOW / ELEVATED
T = TEST SAMPLE.

a) Pipette into the appropriate well of the microtitre plate for the URINE test:-

	Blank(S1)	Standard	Sample	QC
Working buffer	40 µl	20 µl	40 µl	40 µl
Standards	-	20 µl	-	-
Negative urine	10 µl	10 µl	-	-
Quality control	-	-	-	10 µl
Sample	-	-	10 µl	-
Conjugate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Pipette into the appropriate well of the microtitre plate for the TISSUE or FEED test:-

	Blank(S1)	Standard	Sample	QC
Working buffer	25 µl	-	25 µl	25 µl
Standards	-	25 µl	-	-
Negative extract	25 µl	25 µl	-	-
Quality control	-	-	-	25 µl
Sample	-	-	25 µl	-
Conjugate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

- b) Incubate plate at 37°C for at least 2.0 hours or overnight at +2 to +8°C.
- c) Invert plate and shake out liquid.
- d) Wash 12 times in wash buffer (ensuring that every well is filled). Tap out gently onto tissue paper.
- e) Pipette 100 µl of freshly prepared chromogen into each well and incubate at 37°C for 10 - 15 minutes.
- f) Stop color reaction by addition of 50 µl of 2.5 M sulphuric acid .
- g) Measure optical density at 492 nm.

STANDARD CURVE AND CALCULATION OF RESULTS

- a) Calculate the mean of the absorbances of the single points of the standard curve, control and samples.
- b) Plot absorbance of standard against log₁₀ (standard concentration).
- c) Read control and sample concentrations from the standard curve.
- d) To obtain values for urine in ng/ml multiply result by 2.
- e) To obtain values for feed in ng/g multiply result by 12.5
- f) To obtain values for tissue in ng/g multiply result by 2.

SULPHAMETHAZINE LIMITS

Limit above which the sample is said to be positive:

Urine = 500 ng/ml
 Tissue = 100 ng/g
 Meal = 1000 ng/g

SPECIFICITY

The cross reactivities of SMT. antiserum are shown in the table:

ANTIBIOTIC	% CROSS REACTIVITY
SULPHAMETHAZINE	100
SULPHAMERAZINE	10
SULPHADIAZINE	0.9
SULPHAPYRIDINE	0.5
SULPHAGUANIDINE	0.3
SULPHADIMETHOXINE	0.1
SULPHATHIAZOLE	0.01
SULPHANILAMIDE	0.01
SULPHAQUINOXALINE	0.01
SULPHAMETHOXAZOLE	0.01
TYLOSIN	0.01
STREPTOMYCIN	0.01
PENICILLIN	0.01
VIRGINIAMYCIN	0.01
FLAVOMYCIN	0.01
CHLORTETRACYCLINE	0.01

REFERENCE

1. Fleeker, J. R. and Lovett, L. J. (1985). J. Assoc. Of. Anal Chem, 88, 172 - 174.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Veterinary Research Laboratories Stormont, Belfast, Northern Ireland for the assistance received in the development of this kit.

RANDOX

IMPORTANT NOTE

RECONSTITUTION VALUES FOR CONJUGATE

Lot No. 147RU

Reconstitute the contents on one vial of conjugate 3 with the appropriate volume of working buffer:-

6 ml for the Urine Test

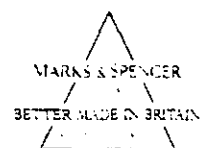
24 ml for the Feed Test

10 ml for the Tissue Test

15/10/91



RANDOX Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY
Tel: CRUMLIN (084 94) 22413 Telex: 748135 RANDOX G Fax. No. INT. 44 84 94 52912 U.K. 084 94 52912



Bijlage IV:

**Protocol van de EZ-Screentest van Rhone
Poulenc voor Sulfamethazine**

BIBLIOGRAPHY

1. NCTR Technical Report for Experiment Number 418. Chronic Toxicity and Carcinogenesis Study on Sulfamethazine in B6C3F Mice. National Center for Toxicological Research, Jefferson, Arkansas, 1988.
2. Randecker, V.W., Reagan, T.A., Engel, R.E., *et al.* Serum and Urine as Predictors of Sulfamethazine Levels in Swine Muscle, Liver and Kidney. *J. Food. Protect.* 50:115-122, 1987.
3. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration. Code of Federal Register, Volume 21 Paragraph 555.670 and 558. Washington, D.C. 1986.
4. USDA-FSIS Threshold Analysis and Determination of Applicability of Executive Order 12291, Executive Order 12498 and The Regulatory Flexibility Act for Sulfonamide Residues in Swine. Doc# FV 064-14P Draft, Washington, DC, 1987.
5. Vansickle, Joe. Sulfamethazine: A Spoonful of Trouble. *Natl. Hog Farm* 33:8-12, 1988.
6. McKean, J.D. A Veterinary Approach to Residue Testing. *Large Animal Veterinarian*, September/October, 38-42, 1987.
7. Performing the Sulfamethazine On-Site Test (SOST). Environmental Diagnostics, Burlington, N.C. 1987.

Covered by one or more of U.S. Patents No. 4,399,229 - 4,900,663 - 4,696,797 - 4,338,927 and one or more foreign patents as listed.

Australia	594,942 and 586,849
Belgium	904,484 and 904,395
Canada	1,258,626 and 1,271,709
Great Britain	2,180,645 and 2,181,662
Italy	1,190,191 and 1,190,204
Switzerland	671,467 and 671,343

Reg. 1290
Printed in USA

EZ-SCREEN[®] SULFAMETHAZINE

10 ppb on 2-Site Card

Qualitative Screening Assay
for the Detection of Sulfamethazine
in Urine, Serum and Feed



ENVIRONMENTAL
DIAGNOSTICS, INC.

1238 Anthony Road
Burlington, NC 27215

1

INTENDED USE

The EZ-SCREEN[®] SULFAMETHAZINE test is a qualitative enzyme immunoassay procedure for the detection of sulfamethazine in urine, serum, and feed samples. This screening procedure is intended to serve as an indicator of the presence of sulfamethazine residue levels that may be violative as defined by the USDA-FSIS National Residue Program.

2

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Sulfonamides are a class of antimicrobial drugs widely used in animals and in humans. Sulfamethazine, a member of this class of drugs, is used as a prophylactic and therapeutic in swine, cattle, horses, sheep, chickens, turkeys, dogs and cats. The drug is usually administered as a feed additive or in the drinking water and is known to be very effective in the treatment and prevention of atrophic rhinitis in swine.

It has been shown that sulfamethazine-treated animals sequester significant levels of sulfamethazine in their tissues during treatment. Since ingestion of sulfamethazine at certain levels may pose a health hazard to humans, edible meat must not contain significant levels of sulfamethazine residue at the time the animal comes to slaughter. To assure the absence of potentially hazardous levels of sulfamethazine in edible meat, the Food and Drug Administration requires that all animals be withdrawn from sulfamethazine for at least 15 days prior to slaughter. During this withdrawal period, sulfamethazine residues are gradually cleared from the tissues and eliminated in the urine.

Tolerance levels for uncooked edible tissue have been set at 0.1 parts per million (ppm) for cattle, swine and poultry. To insure that meat contains levels below this amount, the US Department of Agriculture conducts random surveys to detect and destroy violative carcasses. Historically, the rate of violation in hogs has ranged between 10% and 2% with 1987's rate at 4.6% for the 1800 carcasses tested.^{1,2} Studies have indicated that the majority of violations were the result of inadvertent contamination of food and/or water sources during the withdrawal period.

To avoid bringing violative animals to slaughter, on-site testing may be performed by the producer.

Only with the development of easy screening tests have procedures been able to monitor pre-slaughter levels of sulfamethazine. The first tests developed for monitoring antibiotic residues in animals were the Live Animal Swab Test (LAST), the Swab Test on Premises (STOP) and the Calf Antibiotic Swab Test (CAST). These tests use animal urine as the test sample and detect a range of antimicrobial agents through the inhibition of microbial growth. These tests have very limited application to the detection of sulfonamide residues.⁴

A sulfamethazine screening test called Sulfa-On-Site (SOS) has been developed by the USDA-FSIS. This is a semi-quantitative, thin layer chromatography test system that utilizes urine, serum, water or methanol extracts of feed as the test sample.⁷ The SOS test is specific for sulfonamides and can detect and identify sulfamethazine residues in urine, serum and feed. The SOS test requires laboratory skills, toxic and volatile organic solvents and gives test results in about 30-40 minutes.

The EZ-SCREEN test system is a competitive enzyme immunoassay using the QUIK-CARD² delivery system. It is a simple to use, self-contained kit capable of detecting sulfamethazine at significant levels in urine, serum or feed. A sample is added to the QUIK-CARD and sequential addition of three reagents yields test results in less than 10 minutes.

3

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The EZ-SCREEN:SULFAMETHAZINE test is a sequential, competitive enzyme immunoassay. Sulfamethazine is extracted from a ground feed sample with methanol/water, clarified by filtration and diluted in buffer provided with the kit or presented as a urine or serum sample and diluted in buffer provided with the kit. The diluted sample and negative control are added to the indicated QUIK-CARD test ports. Following absorption, enzyme conjugate is added to the test ports followed by a wash reagent and the substrate reagent. Test results are interpreted at the end of five minutes. In this competitive immunoassay, analyte present in the sample competes with analyte coupled to an enzyme for antibody attached to the QUIK-CARD. The presence of a significant level of sulfamethazine is indicated by the absence of color at the test port.

4

REAGENTS PROVIDED

The kit in its original packaging can be used until the end of the month indicated on the label when stored under refrigeration at 2-8°C (36-46°F).

1. **QUIK-CARD:** Two 2-site cards that serve as the solid support for the assay. The reaction sites are coated with rabbit antibody to sulfamethazine. These antibodies are mechanically trapped within a filter matrix which allows for wicking of the sample and all reagents.
2. **Enzyme:** The enzyme conjugate dropper tube contains a sealed glass ampule and reconstitution diluent. The glass ampule contains lyophilized horseradish peroxidase conjugated to sulfamethazine. Phosphate buffered saline solution, pH 7.2 ± 0.2 containing 0.01% thimerosal (merthiolate) preservative surrounds the glass ampule. The lyophilized conjugate is reconstituted by crushing the glass ampule and gently shaking to mix. The reconstituted reagent is stable for 8 hours at room temperature.
3. **Negative Control:** The negative control dropper tube contains phosphate buffered saline solution, pH 7.2 ± 0.2 with 0.01% thimerosal (merthiolate) preservative and 0.125% Tween 20.
4. **Substrate:** The substrate dropper tube contains a sealed glass ampule and reconstitution diluent. The glass ampule contains 4-chloro-1-naphthol and urea peroxide substrate that has been tableted with inert fillers. Phosphate buffered saline solution, pH 7.2 ± 0.2 containing 0.01% thimerosal (merthiolate) preservative surrounds the glass ampule. Reconstitute the tableted

reagent by crushing the glass ampule and shaking to mix. The reconstituted reagent is stable for 8 hours at room temperature.

5. **Dilution Buffer:** Two plastic screw-capped tubes containing 4.5 ml of phosphate buffered saline solution, pH 7.2 ± 0.2 with 0.01% thimerosal (merthiolate) preservative and 0.125% Tween 20 are provided for sample dilution.
6. **Pipettes:** Four disposable plastic pipettes are provided. Two of the pipettes are for use in sample dilution and two are for applying sample to the QUIK-CARD. The pipettes will deliver a drop having a volume of approximately 50 microliters (0.05 ml) when filled to a level of 1/2 inch.
7. **Cotton Swabs:** Two cotton swabs are provided for removing excess liquid from around test ports.

5

PRECAUTIONS

1. Each reagent has been optimized for use in the EZ-SCREEN SULFAMETHAZINE test system. Do not use these reagents in other test systems. Do not substitute reagents from other manufacturers in the test system.
2. Do not use reagents from one kit lot number with reagents from a different kit lot number.
3. Dilution or adulteration of test reagents or test sample not called for in the test procedure may give inaccurate test results.
4. Do not use reagents after the expiration date.
5. Use of incubation times other than those specified may give inaccurate test results.
6. Kits should be brought to ambient temperature (20-37°C or 68-98°F) prior to use. Avoid prolonged (greater than 8 hours) storage at ambient temperature.
7. The presence of particulate matter will interfere with the wicking of the sample into the card. Therefore, assure that the filtration step for feed extracts is performed adequately and that the diluted extract is clear. For urine or serum, use freshly collected samples free of obvious bacterial contamination. Samples that wick poorly or not at all may be filtered through a 0.45µm filter prior to dilution.
8. Failure of the sample to be completely absorbed into the card will give inaccurate test results.
9. Do not freeze test kits.
10. Do not expose test kits to temperatures above 37° C (98°F).
11. Do not squeeze the glass ampules inside the plastic dropper tube so hard as to force pieces of glass through the wall of the plastic tube when reconstituting the enzyme and substrate reagents.
12. Handle the cards carefully. Do not bend or twist the cards. Do not press or rub the surface of the test sites or the surface surrounding the sites.
13. The reagents contain thimerosal (merthiolate) as a preservative. Avoid contact with skin. If contact should occur, immediately flush with water.
14. Use clean pipettes and glassware for each sample to avoid cross-contamination of the samples. When working with feed extracts, thoroughly wash all glassware (blender jars, funnels, flasks) between samples to avoid cross-contamination.
15. Do not run more than two test cards at a time.

6

SAMPLE PREPARATION

A. URINE PREPARATION

1. Collect a small sample of urine from the animal to be tested. Use a clean container with a lid. Label the sample container for identification.
2. A residue level of $45 \mu\text{g/ml}$ in urine is considered to indicate a

possible violative level in liver. To detect a residue level of 0.5 ppm it is necessary to dilute the sample 1:50 prior to testing. Mix 1 part urine with 49 parts dilution buffer. The prefilled dilution buffer tube contains 4.5 ml so that a 1:50 dilution may be approximated by adding 0.1 ml of urine to the tube. Fill the small pipette with urine to a level of one inch and transfer to the dilution tube. Replace the cap on the tube and shake well to mix.

B. SERUM PREPARATION

1. Collect sufficient blood to yield 1.0 ml of serum (usually 5.0 ml is adequate) by venipuncture of the animal to be tested. Label the sample for identification.
2. Allow the blood to stand at room temperature for approximately one hour or until a firm clot is formed. Separate the clot from the walls of the collection tube by gently running a clean wooden applicator stick around the upper rim of the clot.
3. Collect clear serum and place in a clean tube after centrifuging at 2,000 rpm for 10 minutes. If the sample is to be held for more than eight hours before the test is performed, store the serum in a refrigerator. If the sample is not tested within 48 hours, freeze the serum for future testing.
4. A residual level of 0.16 ppm in serum is considered to indicate a possible violative level in liver. To detect a residue level of 0.16 ppm, it is necessary to dilute the sample 1:16 prior to testing. Mix 1 part serum with 15 parts dilution buffer. The prefilled dilution buffer tube contains 4.5 ml so that a 1:16 dilution may be approximated by adding 0.3 ml serum to the tube. Fill the small pipette with serum to a level of one inch and transfer to the dilution tube. Repeat this addition two additional times. Replace the cap on the tube and shake well to mix.

C. FEED PREPARATION

The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques. The sample should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure described below.

1. Using the measure provided in the EDI Feed Accessory Kit, add 2 level teaspoons of sample to the Whirl-Pak bag. Then add 2 tablespoons of 80% methanol. Seal the bag tightly. Shake vigorously for 30 seconds. Wait one minute and shake again for 30 seconds. Wait one minute and shake a final time for 30 seconds.
2. Allow the mixture to sit until the sample settles and a clear liquid layer appears on top or filter the extract using the filter vials in the Accessory Kit.
3. To detect a residue level of 1.2 ppm in feed, it is necessary to dilute the sample 1:120 prior to testing. The extraction step described above is considered to provide a 1:3 dilution making it necessary to perform an additional 1:40 dilution prior to testing. Mix 1 part extract with 39 parts dilution buffer. The prefilled dilution buffer tube contains 4.5 ml so that a 1:40 dilution may be approximated by adding 0.1 ml of extract to the tube. Fill the small pipette with extract to a level of one inch and transfer to the dilution tube. Replace the cap on the tube and shake well to mix.

7

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

A. URINE

1. Sample collection container.
2. Timer.

B. SERUM

1. Syringe and needle or vacutainer for venipuncture.
2. Tube for serum separation.
3. Wooden applicator.
4. Centrifuge.
5. Transfer pipette.
6. Timer.

C. FEED

1. EDI Feed Accessory Kit (Product #208-1).
2. Timer.

8

TEST PROCEDURE

1. Remove foil pouch from refrigerator and allow all reagents in the pouch to reach ambient temperature before opening.
2. Prepare the Negative Control by removing the plastic shrink seal from around the dropper cap.
3. Prepare the Enzyme by squeezing the plastic dropper tube to crush the inner glass ampule. Tilt the tube back and forth for approximately 20 seconds to rehydrate and mix the contents. Do not shake vigorously or the contents will foam. Remove the plastic shrink seal from around the dropper cap.
4. Prepare the Substrate by squeezing the plastic dropper tube to crush the inner glass ampule. Shake the tube vigorously for approximately 20 seconds to rehydrate and mix the contents. Remove the plastic shrink seal from around the dropper cap.
5. Place the test card on a clean, flat surface. Using a felt-tipped pen, label the card with the sample number and the date. Do not mark the card closer than 1/2 inch from the ports.
6. Shake the tube to mix the diluted extract thoroughly. Fill the small pipette to a height of 1/2 inch and apply the diluted extract to the "Sample" port of the card. When applying sample to the card, do not touch the sample pipette tip to the port. Hold the pipette so that the tip is approximately 1/2 inch above the port and allow the drop to fall freely.
7. Apply one drop of Negative Control to the "Control" port of the card. Do not touch the dropper tip to the port. Hold the tube so that the tip is approximately 1/2 inch above the port and allow drops to fall freely.
8. Allow the sample and control drops to absorb into the test ports before proceeding to the next step.
9. Hold the Enzyme tube with the tip downward. Dislodge trapped air bubbles by tapping the side of the tube or shaking the contents toward the tip. Discard the first drop of Enzyme and then apply one drop to both of the ports on the test card. Do not touch the dropper tip to the ports. Hold the tube so that the tip is approximately 1/2 inch above the ports and allow drops to fall freely.
10. Allow the Enzyme drops to absorb into the test ports before proceeding to the next step.
11. Apply one drop of Negative Control to both ports on the test card. Do not touch the dropper tip to the ports. Hold the tube so that the tip is approximately 1/2 inch above the ports and allow drops to fall freely.
12. Allow the drops to absorb into the test ports before proceeding to the next step.
13. Carefully remove the excess liquid from around the edge of both ports on the test card using a cotton swab or clean, absorbent tissue. DO NOT TOUCH THE PORTS DIRECTLY.
14. Hold the Substrate tube with the tip downward. Dislodge trapped air bubbles by tapping the side of the tube or shaking the contents toward the tip. Discard the first drop of Substrate and then apply two drops to both of the ports on the test card. Do not touch the dropper tip to the ports. Hold the tube so that the tip is approximately 1/2 inch above the ports and allow drops to fall freely. Immediately set a timer for five (5) minutes.
15. When the timer goes off, read the test results. If there is excess liquid at the edge of the ports, carefully remove it with a cotton swab or clean, absorbent tissue prior to reading. If color is visible in both the "Control" and "Sample" ports before the end of the 5 minutes, the test may be read before the timer goes off.

16 Examine the test card while leaving it flat on the work surface

9

READING THE TEST RESULTS

Quality Control

The control must function properly in order to have a valid test result.

The test result is **VALID** when the "Control" port develops readily detectable color (gray-blue or blue).

The test result is **NOT VALID** when the "Control" port fails to develop readily detectable color (remains colorless).

Interpretation of Test Sample

The following interpretation of the test sample should only be carried out when the "Control" port has indicated a **VALID** test.

The sample is considered to be **NEGATIVE** for sulfamethazine when the "Sample" port develops readily detectable color (light gray, gray-blue or blue) over the surface of the port. In many cases a negative sample will not yield a blue color equivalent to the color of the negative control.

The sample is considered to be **POSITIVE** for sulfamethazine when the "Sample" port fails to develop readily detectable color (remains colorless).

10

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

A URINE

A **NEGATIVE** test result suggests that the test urine contains sulfamethazine at a level less than 0.5 ppm.

A **POSITIVE** test result suggests that the test urine contains sulfamethazine at a level equal to or greater than 0.5 ppm. Samples containing sulfamethazine at levels less than 0.5 ppm but greater than 0.25 ppm may yield a positive result. The frequency of positive findings in this range will decrease as the sulfamethazine level falls from 0.5 ppm to 0.25 ppm.

B SERUM

A **NEGATIVE** test result suggests that the test serum contains sulfamethazine at a level less than 0.16 ppm.

A **POSITIVE** test result suggests that the test sample contains sulfamethazine at a level equal to or greater than 0.16 ppm.

Samples containing sulfamethazine at levels less than 0.16 ppm but greater than 0.08 ppm may yield a positive result. The frequency of positive findings in this range will decrease as the sulfamethazine level falls from 0.16 ppm to 0.08 ppm.

C FEED

A **NEGATIVE** test result suggests that the test sample contains sulfamethazine at a level less than 1.2 ppm.

A **POSITIVE** test result suggests that the test sample contains sulfamethazine at a level equal to or greater than 1.2 ppm.

Samples containing sulfamethazine at levels less than 1.2 ppm but greater than 0.6 ppm may yield a positive result. The frequency of positive findings in this range will decrease as the sulfamethazine level falls from 1.2 ppm to 0.6 ppm.

11

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 1 The EZ-SCREEN/SULFAMETHAZINE test provides only a qualitative test result. A more specific alternative chemical method must be used in order to obtain a confirmed analytical result.

- 2 For greatest accuracy in performing the EZ-SCREEN test, use accurate pipettes for all dilution and application steps. If such quantitative measuring devices are not available, the plastic pipettes provided may be used to approximate the volumes.

- 3 Some feed formulations contain additives and/or natural pigments that are extracted in 80% methanol. Such materials will give the extract's color that may vary from purple to deep yellow. These pigments may interfere with reading of the test results.

- 4 Organic solvents such as acetone, chloroform and acetonitrile may not be used to extract samples for analysis using the EZ-SCREEN/SULFAMETHAZINE test system.

- 5 Performance of the test at temperatures of less than 19°C (65°F) or greater than 37°C (98°F) may result in inaccurate findings on borderline samples.

12

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility

The ability of the EZ-SCREEN/SULFAMETHAZINE to correctly detect a positive or negative sample containing borderline amounts of sulfamethazine was evaluated using sulfamethazine standards. Standard solutions contained 10 ppb (parts per billion), 5 ppb, 1 ppb or 0 ppb sulfamethazine. These concentrations are equivalent to concentrations of 0.5 ppm, 0.25 ppm, .05 ppm and 0 ppm in urine; 0.16 ppm, 0.08 ppm, 0.016 ppm and 0 ppm in serum; and 1.2 ppm, 0.6 ppm, 0.12 ppm and 0 ppm in feed prior to extraction and/or dilution. Ten samples were evaluated at each level.

Day-To-Day — Test performance was evaluated on three consecutive days using a single product lot.

Sulfamethazine Level (ppb)	Reproducibility
10	100%
5	100%
1	100%
0	100%

Lot-To-Lot — Test performance was evaluated using three different product lot numbers.

Sulfamethazine Level (ppb)	Reproducibility
10	100%
5	97%
1	100%
0	100%

Cross-Reactivity — The cross-reactivity of the EZ-SCREEN/SULFAMETHAZINE test was evaluated using purified standards for sulfadiazine, sulfadimethoxine and sulfathiazole. Compared to sulfamethazine the cross-reactivity with each of these compounds was less than 0.01%.