



ECLIPSE 50

ZE/E50/96i
ZE/E50/288i

**Test for detection of inhibitory
substances in milk**

**Test para la detección de sustancias
antibacterianas en leche**

ZEULAB, S.L.
C/ Bari, 25 dpdo. • 50197 Zaragoza (SPAIN)
Tel.: +34 976 731 533
info@zeulab.com
www.zeulab.com

SCOPE AND TEST PRINCIPLE

ECLIPSE is a qualitative test based on the inhibition of microbial growth, supplied in a microtiter plate format where each well contains agar medium spread with *Geobacillus stearothermophilus* spores and a pH indicator. When the plate is incubated at 65°C, spores germinate and cells grow producing acid and changing the agar pH. Variations of pH will produce changes of the agar colour from blue (purple) to yellowish. When milk samples contain inhibitors at higher concentrations than the detection limit, microorganisms will not grow and neither colour changes will be observed.

KIT COMPONENTS

Components	ZE/E50/96i	ZE/E50/288i
INDIVIDUAL TESTS	96	288
MICROTITER PLATE	1	3
ADHESIVE FILM	1	3
PRODUCT CERTIFICATE	Yes	Yes

ADDITIONAL MATERIAL (NOT PROVIDED)

- ✓ Micropipettes.
- ✓ Heater (FX incubator, ref: ZE/FX) or oven at 65°C.
- ✓ Negative control (sample without antibiotics)
- ✓ Positive control - freeze dried Penicillin G (ZE/PG5), oxytetracycline (ZE/OXITETRA) and sulfathiazole (ZE/SULFA).

SAFETY

Good laboratory practices are recommended when using this kit. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available from your local distributor or ZEULAB upon request.

STABILITY AND STORAGE

The kit components should be stored at 4-12 °C and protected from light. This kit is provided with a shelf life of approximately 9 months. See the kit expiry date on package.

NOTES

- ✓ A negative sample must be used to determine the optimal incubation of the assay in each run. A positive control sample is also recommended.
- ✓ A new pipette tip should be used for each sample.
- ✓ Sometimes milk can migrate to the bottom of the well. This will be identified as a white layer at the bottom of the well prior to washing. If you observe this phenomenon, you should read the results by looking all around the well sidewise.
- ✓ This test is extremely sensitive to antibiotics and other antibacterial substances, such as detergents and disinfectants. Any contamination with these substances should be prevented.
- ✓ Although natural inhibitors contained in milk do not interfere with the test results, samples from colostrum, milk from the end of the breeding period, and mastitis milk have high concentration of these inhibitors and can alter the results.
- ✓ Please, contact ZEULAB for the analysis of samples containing preservatives (i.e. Azidol).

TEST PROCEDURE

1. Cut the adhesive foil covering the wells and split the strips to be used by pressing up from the bottom. The foil covering the remaining wells should not be removed and the wells stored immediately at 4-12°C.
2. Remove the adhesive foil covering the wells/plate, and add 50 µl of sample into each well and seal carefully the wells with the adhesive film.
3. Incubate at 65°C until the negative control has turned to yellow (2h15'-2h45'). See the product certificate and use the incubation time shown as reference.
4. When the negative control has shifted to yellow as the color chart, incubation should be stopped. If it is not yet yellow, incubate the plate for longer (approx. 10-15min) until the negative control has changed. Test sensitivity may be affected increasing detection limits .
5. Remove the milk turning the plate and wash the wells with distilled water by filling them, empty them turning to the plate and tapping it against absorbent paper. Perform this washing step 2 or 3 times.
6. Results:
 - ✓ Visual reading: Turn the plate and read the results comparing with the negative control well.

- A blue-purple colour (positive) indicates the presence of antibiotics.
 - A green-blue colour (doubtful) indicates presence of antibiotics in a concentration close to the detection limit. Analysis should be repeated.
- ✓ **Photometric reading:** Read at 595nm (filter 1) and at 650nm (filter 2). The assay must be stopped when the difference of absorbance of negative control (AN 595nm - AN 650nm) is between 0.2 and 0.4 units. Mayor or equal values to those obtained for the samples used as negative control plus 0.2, will be positive.

$$\text{POSITIVE: AM 595nm - AM 650nm} \geq \text{AN 595nm - AN 650nm} + 0.2$$

AM: Sample absorbance

AN: Negative control absorbance

Note: The above procedure is only applicable when the difference of absorbance at 595nm - 650nm of the negative control sample is between 0.2 and 0.4.

ESPAÑOL

OBJETIVO Y PRINCIPIO DEL TEST

ECLIPSE es un test basado en la inhibición del crecimiento microbiano. El kit se presenta en formato de placa microtiter, cuyos pocillos contienen un medio de cultivo específico con esporos de *Geobacillus stearothermophilus* y un indicador ácido-base. Tras la incubación de la placa a 65°C, los esporos germinan y se multiplican acidificando el medio y provocando el viraje del indicador de un color azul a amarillo. Si la muestra de leche contiene una concentración de antimicrobianos superior al límite de detección del test, el crecimiento del microorganismo se inhibe y por lo tanto no se producirá el viraje del indicador del medio.

COMPONENTES DEL KIT

Componentes	ZE/E50/96i	ZE/E50/288i
TESTS INDIVIDUALES	96	288
PLACA MICROTITER	1	3
LÁMINA ADHESIVA	1	3
CERTIFICADO DE PRODUCTO	Sí	Sí

MATERIAL ADICIONAL (NO INCLUIDO)

- ✓ Micropipetas.
- ✓ Incubador (FX incubator ref: ZE/FX) o estufa a 65°C.
- ✓ Control negativo (muestra carente de antibióticos).
- ✓ Control Positivo Penicilina G liofilizada (ref. ZE/PG5).

PRECAUCIONES DE USO

Se recomienda el uso de unas correctas prácticas de laboratorio. Existe una HOJA DE SEGURIDAD disponible bajo solicitud a través de su distribuidor habitual o ZEULAB.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Conservar los componentes del kit a 4-12°C y en oscuridad. El kit se suministra con una caducidad aproximada de 9 meses. Consultar la fecha de caducidad indicada en el envase.

OBSERVACIONES

- ✓ Es necesario aplicar en cada ensayo un control negativo (leche carente de antibióticos) junto con el resto de muestras para determinar el tiempo óptimo de incubación de cada ensayo. Se recomienda aplicar un control positivo, muestra con una concentración de antibiótico por encima del límite de detección (LOD) del test.
- ✓ Utilizar una punta de pipeta para cada muestra.
- ✓ En ocasiones la leche puede migrar a la parte inferior del pocillo. Esto se identificará como una capa blanquecina en la parte inferior antes del lavado. Si se observa este fenómeno, debe leer los resultados observando todo el pocillo lateralmente.
- ✓ Este ensayo es muy sensible a los antibióticos y a otros antimicrobianos como detergentes y desinfectantes, por lo que debe evitarse la contaminación cruzada de muestras y material utilizado.
- ✓ La leche contiene sustancias inhibitoras naturales que no interfieren en el resultado debido a su baja concentración. Estos inhibidores aumentan especialmente en el calostro, al final del período de lactación y en el caso de mamitis, pudiendo alterar los resultados del ensayo.
- ✓ Para analizar muestras que contienen conservantes como por ejemplo azidiol, por favor contacte con ZEULAB.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Recortar la lámina que protege la placa y separar los pocillos presionando por la parte inferior. No despegar la lámina de los pocillos que no se vayan a usar, guardarlos en refrigeración.
2. Levantar la lámina adhesiva y añadir 50 µl de muestra en cada pocillo. Añadir un control negativo.
3. Sellar los pocillos con la lámina adhesiva o cinta adhesiva e incubar a 65°C hasta que el control negativo haya virado a amarillo (2h15'-2h45'). Consultar el certificado de producto y tomar como referencia el tiempo allí señalado. Si el control no es amarillo, incubar durante más tiempo (10-15min) hasta que haya cambiado. La sensibilidad del test podría verse afectada incrementándose los límites de detección.
4. Cuando el control negativo haya virado a amarillo (rango de 2h15 a 3h), destapar los pocillos y eliminar la leche volcando la placa.
5. Lavar los pocillos con agua destilada llenando los pocillos con un frasco lavador, vaciarlos dando la vuelta a la placa y golpeándola suavemente contra papel absorbente. Realizar este lavado 2 ó 3 veces.
6. Resultados. Se puede realizar una lectura visual o fotométrica.
 - ✓ **Lectura visual:** Invertir la placa y comparar las muestras con el control negativo.
 - El color amarillo indica la ausencia de antibióticos en la muestra: resultado negativo.
 - El color azul-morado indica la presencia de antibióticos: resultado positivo.
 - El color verdoso-azulado (dudoso) indica presencia de antibióticos en concentración cercana el límite de detección del test. En este caso, se recomienda repetir en un nuevo ensayo.
 - ✓ **Lectura fotométrica** a longitudes de onda de 595 nm (filtro 1) y 650 nm (filtro 2). El ensayo debe pararse cuando la diferencia de absorbancias del control negativo (AN 595nm - AN 650nm) tenga un valor comprendido entre 0,2 y 0,4. Las muestras que den lugar a resultados superiores o iguales a la suma del valor obtenido para el control negativo más 0,2 serán consideradas positivas.

$$\text{POSITIVO: } AM\ 595\ \text{nm} - AM\ 650\ \text{nm} \geq AN\ 595\ \text{nm} - AN\ 650\ \text{nm} + 0,2$$

AM: Absorbancia de la muestra

AN: Absorbancia del control negativo

Nota: El criterio sólo es válido cuando el control negativo tiene un valor de AN 595nm - AN 650nm comprendido entre 0,2 y 0,4.

Limits of detection (LOD) of ECLIPSE 50 in cow milk ($\mu\text{g/l}$)*Límites de detección (LDD) de ECLIPSE 50 en leche de vaca ($\mu\text{g/l}$)*

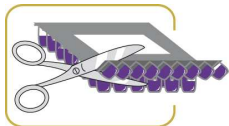
β -LACTAMS	Amoxicillin	4
	Ampicillin	4
	Cefalexin	60
	Cefapirin	8
	Cefalonium	20
	Ceftiofur	100
	Cefazolin	35
	Cloxacillin	30
	Oxacillin	25
	Penicillin G	3-4
TETRACYCLINES	Doxycycline	100
	Oxytetracycline	100
	Tetracycline	100
SULFONAMIDES	Sulfadiazine	100
	Sulfametazine	150
	Sulfamethoxypyridazine	100
	Sulfanilamide	600
	Sulfamethoxazole	100
MACROLIDES	Sulfathiazole	100
	Erythromycin	200
	Tylosin	50
	Spiramycin	>400
	AMINOGLYCOSIDES	Gentamycin
Neomycin		2000
Kanamycin		>2.000
Spectinomycin		2.500
LINCOSAMIDES	Lincomycin	150-300
OTHERS	Chloramphenicol	5.000
	Bacitracin	-

Please contact ZEULAB or your local distributor for information on limit of detection of other species.

Por favor, contacte con ZEULAB o su distribuidor local para obtener información sobre los límites de detección en otras especies.

SUMMARY PROCEDURE

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO



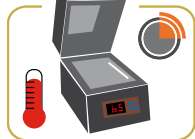
Select the required number of tests for the analysis.

Seleccionar el número de test necesarios para el análisis.



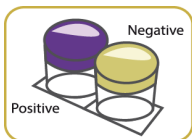
Add 50 µl of milk.

Añadir 50 µL de leche



Incubation at 65°C

Incubación a 65°C



Wash and read:

- Visual reading from the bottom of the wells
- Photometrical reading at 595nm and 650nm

Lavar y leer:

- Lectura visual desde el fondo del pocillo*
- *Lectura fotométrica a 595nm y 650nm*



+

+

+

-

-

ECLIPSE is an *in vitro* diagnostic kit for antibiotics screening in milk. In analysis implicating legal processes, the results should be revaluated with an official reference method. ZEULAB, S.L. does not assume any legal responsibility.

ECLIPSE es un test de diagnóstico *in vitro* para cribado. Los análisis que pudieran tener una implicación de tipo legal deberían realizarse por duplicado o triplicado y confirmarse mediante un procedimiento oficial. ZEULAB no asume ninguna responsabilidad legal.

ZEULAB

www.zeulab.com