

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Egg White ELISA

REF **DEEGGE01**

Σ **96**



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS/ INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. GENERAL INFORMATION | 3 |
| 2. PRINCIPLE OF THE TEST | 3 |
| 3. PRECAUTIONS | 3 |
| 4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS | 3 |
| 5. REAGENTS | 4 |
| 6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED) | 4 |
| 7. SAMPLE PREPARATION | 4 |
| 8. PROCEDURE | 5 |
| 9. CALCULATION OF RESULTS | 5 |
| 10. TYPICAL STANDARD VALUES | 5 |
| 11. PERFORMANCE | 6 |
| | |
| 1. ALLGEMEINES | 8 |
| 2. TESTPRINZIP | 8 |
| 3. VORSICHTSMAßNAHMEN | 8 |
| 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN | 9 |
| 5. REAGENZIEN | 9 |
| 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN | 9 |
| 7. PROBENVORBEREITUNG | 10 |
| 8. TESTDURCHFÜHRUNG | 10 |
| 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE | 11 |
| 10. TYPISCHE STANDARDKURVE | 11 |
| 11. TECHNISCHE DATEN | 11 |
| | |
| SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 16 |

| | |
|-------------------------|----------|
| Sensitivity (Egg White) | 0.05 ppm |
| Recovery | 82 - 98% |
| Incubation Time | 60 min |

1. GENERAL INFORMATION

Hen's egg (*Gallus gallus*) is very rich of proteins and represents an important food source for humans. While proteins of egg yolk only have minor allergenicity, many proteins of egg white are known to be allergenic. In addition to ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme and livetin, ovomucoid represents the most important allergen. Unlike the other allergens ovomucoid is heat stable and can resist common production processes like baking. For allergic persons the consumption of egg white represents a critical problem. Already very low amounts of the allergen can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, egg allergic persons must strictly avoid the consumption of eggs or egg containing food. Non-declared addition of egg in food is hazardous for allergic people. Crosscontamination, mostly in consequence of the production process is often noticed. The chocolate production process is a representative example. For the detection of egg white protein residues, sensitive detection systems are required. The **Demeditec Egg White ELISA** represents a highly sensitive detection system for egg white protein based on ovomucoid and is particularly capable of the quantification of egg white residues in pasta, bakery products, sausage and chocolate.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Egg White** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against ovomucoid is bound on the surface of a microtiter plate. Egg white (ovomucoid) containing samples or standards are given into the wells of the microtiter plate. After 20 minutes incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugated second antibody directed against ovomucoid is given into the wells and after 20 minutes of incubation the plate is washed again. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of ovomucoid and with this the concentration of egg white is directly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-ovomu-coid antibodies.
2. **CAL 1-5** Egg white protein standards (0; 0.4; 1; 4; 10 ppm of egg white protein): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-ovomu-coid-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (0.5 M H₂SO₄): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 10x** Extraction and sample dilution buffer (Tris): 2 x 120 mL as 10x concentrate, dyed red. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least one week. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
7. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least 4 weeks. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 100 - 1000 µL micropipets
- Volumetric flask
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Plastic bag to store unused microtiter strips

Reagents

- double distilled water

7. SAMPLE PREPARATION

Due to high risk of cross-contamination all applied instruments like applicator, mortar, glass vials etc. have to be **cleaned thoroughly** before and after each sample. To identify possible cross-contamination caused by previous extractions it is strongly recommended to note the sequence of the extractions.

The following sample preparation should be applied for solid samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample drawing, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 20 mL of **pre-diluted** extraction buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at 2000 g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. 100 µL of particle-free solution are applied per well. If the results of a sample are out of the measuring range, further dilution with the **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer is necessary. The additional dilution has to be considered when calculating the concentration.

The following sample preparation should be applied for liquid samples:

1 mL of liquid sample is diluted in 19 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

Attention:

- Do not shake the final extract to prevent from re-suspension.
- If after centrifugation a third layer at the top appears due to a high fatty matrix, only the middle aqueous phase should be applied to the wells.

8. PROCEDURE

The washing solution is supplied as 10x concentrate and has to be **diluted** 1+9 with double distilled water before use.

In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and once after the samples. For final interpretation the arithmetic mean is used for calculation.

In consideration of GLP and quality control requirements a duplicate measurement of samples is recommended.

The procedure is according to the following scheme:

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 μL **ready-to-use** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 μL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 μL of conjugate (anti-ovomucoid-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 μL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 μL of stop solution (0.5 M H_2SO_4) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

The ready-to-use standards are prepared for a direct determination of sample concentrations. The dilution of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered. Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ppm on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of egg white protein in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

The determined amount of egg white protein can be used to calculate the amount of the corresponding whole egg powder (NIST 8445) by multiplying with factor 4.35.

10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 10 ppm standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

| Egg white protein (ppm) | % binding of 10 ppm |
|-------------------------|---------------------|
| 10 | 100 |
| 4 | 74 |
| 1 | 34 |
| 0.4 | 17 |
| 0 | 3 |

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Egg White test** is 0.05 ppm.

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Egg White test** is 0.4 ppm.

As matrices can have variable influence on the LOD in specific cases, and the range of matrices that was tested is of course limited, the end user if needed may evaluate its own LOD values depending on the matrices to be analyzed.

Alternatively, any results below LOQ should be just reported quantitatively as "< LOQ".

Cross-reactivity

For the following foods no cross-reactivity could be detected:

| | | | | | |
|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Adzuki bean | Celery | Duck | Kidney bean | Pepper, black | Shrimps |
| Almond | Cherry | Ewe's milk | Kiwi | Pine seed | Soy flour |
| Apricot | Chestnut | Fennel | Lamb | Pistachio | Soy lecithin |
| Barley | Chia seeds | Fenugreek | Leek | Plum | Split pea |
| Bean, white | Chicken, cooked | Fish gelatin | Lentil | Poppy | Sunflower seed |
| Beef, cooked | Chicken, raw | Flaxseed | Lupin | Pork | Thyme |
| Beef, raw | Chickpea | Garden cress | Macadamia | Potato | Tofu |
| Bovine gelatin | Chili | Garlic, fresh | Mustard, yellow | Prawn cooked | Tomato |
| Brazil nut | Cinamon | Garlic, granulated | Nutmeg | Prawn, raw | Turkey |
| Buckwheat | Clove | Ginge, ground | Oats | Pumpkin seed | Turmeric |
| Cabbage, white | Cocoa | Ginger, fresh | Octopus | Radish | Walnut |
| Caraway seeds | Coconut | Gliadin | Onion | Rapeseed | Wheat |
| Cardamom | Cod | Goat's milk | Paprika | Rice, brown | |
| Carob gum | Corn | Guar gum | Pea | Rice, white | |
| Carrot | Cow' milk | Gum arabic | Peach | Rye | |
| Cashew | Cumin | Hazelnut | Peanut | Saccharose | |
| Cayenne | Dill | Horseradish | Pecan | Sesame | |

For the following commodities of the table above the results were between 0.5*LOQ and LOQ of the kit. So it cannot be completely excluded that these matrices may provide values above the LOQ in specific cases:

| | | |
|--------------|-----------------|------|
| Chicken, raw | Chicken, cooked | Duck |
| Thyme | Turkey | |

The following cross-reactions were determined:

| Reagent | Cross-reactivity |
|------------|------------------|
| Ovalbumin | 0.25% |
| Ovomucoid | 614% |
| Conalbumin | 2.6% |
| Lysozyme | <0.0003% |

Precision

| | |
|-----------------------|--------|
| Intra-assay Precision | 4 - 9% |
| Inter-assay Precision | 3 - 7% |

Linearity

The serial dilution of spiked samples (pasta, biscuit, cookies, sausage and chocolate) resulted in a dilution linearity of 93% - 112%.

Recovery

Mean recovery was determined by spiking samples with different amounts of egg white protein:

| | |
|----------------|-----|
| Pasta | 91% |
| Bicuit | 83% |
| Cookies | 85% |
| Sausage | 98% |
| Dark chocolate | 82% |

Note: The industrial process of food transformation has an impact on proteins which might affect testing performance. For this reason, recovery/cross reactivity may be altered for heat treated samples.

| | |
|--------------------------|----------|
| Empfindlichkeit (Eiklar) | 0,05 ppm |
| Wiederfindung | 82 - 98% |
| Inkubationszeit | 60 min |

1. ALLGEMEINES

Das Ei des Haushuhns (*Gallus gallus*) ist sehr proteinreich und stellt eine bedeutende Nahrungsquelle des Menschen dar. Während die Proteine des Eidotters nur begrenzte Allergenität aufweisen, sind viele Proteine des Eiklars als allergieauslösend bekannt. Neben Ovalbumin, Ovotransferrin, Lysozym und Livetin stellt das Glycoprotein Ovomucoïd das bedeutendste Allergen dar. Dieses ist im Gegensatz zu den anderen Allergenen hitzestabil und hält damit herkömmlichen Produktionsprozessen (z.B. Backen) stand. Der Konsum von Eiklar stellt für Allergiker ein kritisches Problem dar. Schon sehr geringe Mengen des Allergens lösen allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock aus. Aus diesem Grund müssen Ei-Allergiker auf den Konsum von Eiern oder Ei-haltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Nicht deklariertes Zusatz von Ei in Lebensmitteln stellt für Allergiker eine Gefahr dar. Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln wie z.B. bei Schokolade sind ebenfalls problematisch. Um Spuren von Ei(klar) detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Demeditec Eiklar ELISA** stellt ein hochsensibles Nachweissystem für Eiklar-Protein auf der Basis von hitzestabilem Ovomucoïd dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Eiklar-Rückständen in Pasta, Backwaren, Wurst und Schokolade geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Eiklar ELISA** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Ovomucoïd gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Eiklar (Ovomucoïd) enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Ovomucoïd statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Ovomucoïd gerichteter zweiter Antikörper wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Ovomucoïd-Konzentration und damit die Konzentration an Eiklar-Protein ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

4. 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.

5. 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. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Ovomucoïd-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1-5** Eiklar-Protein-Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 0.4, 1, 4, 10 ppm Eiklar-Protein), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Ovomucoïd-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL 10x** Extraktions- und Probenverdünnungspuffer (TRIS), 2 x 120 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. **WASH SOLN 10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens 4 Wochen haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 100 - 1000 µL Mikropipetten
- Messkolben
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

Reagenzien

- bidestilliertes Wasser

7. PROBENVORBEREITUNG

Aufgrund der hohen Gefahr von Kreuzkontaminationen müssen alle verwendeten Arbeitsgeräte wie Spatel, Mörser, Glasgefäße etc. vor und nach jeder Probe **gründlich gereinigt** werden. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vorextrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für feste Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchmischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 20 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wird die Suspension für 15 min in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.
3. Die Proben werden bei mindestens 2500 g für 10 min zentrifugiert. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Für den Test werden pro Kavität 100 µL partikelfreie Lösung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für flüssige Proben angewandt werden:

1 mL flüssige Probe wird in in 19 mL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. Anschließend wird die Suspension für 15 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wird mit Punkt 3 der Feststoff-Extraktion fortgefahren.

Achtung:

- Um Re-Suspension zu vermeiden, sollte der Extrakt nach dem Zentrifugieren nicht geschüttelt werden.
- Falls, bedingt durch einen hohen Fett-Anteil der Matrix, nach dem Zentrifugieren, eine dritte, obere Phase entsteht, sollte nur die mittlere wässrige Phase für den Test verwendet werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bidestilliertem Wasser **verdünnt** werden.

Die **gebrauchsfertigen** Standards sollten in jedem Fall im Doppelansatz bestimmt werden. Bei größeren Mengen von Proben sollten die Standards einmal vor und einmal nach den Proben pipettiert und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen werden.

Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen. Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Ovomucoid-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

9. 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 (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ppm (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppm für Eiklar-Protein abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Eiklar-Proteingehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Proteingehalts-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.
Um aus dem ermittelten Eiklar-Protein-Gehalt den Gehalt an Volleipulver (NIST 4665) zu berechnen, muss das Ergebnis mit dem Faktor 4,35 multipliziert werden.

10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

| Eiklar-Protein (ppm) | OD-% von 10 ppm |
|----------------------|-----------------|
| 10 | 100 |
| 4 | 75 |
| 1 | 33 |
| 0,4 | 17 |
| 0 | 5 |

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Eiklar Tests** beträgt 0,05 ppm Eiklar-Protein.

Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec Eiklar Tests** beträgt 0,4 ppm Eiklar-Protein.

Da jede Matrix einen unterschiedlichen Einfluss auf die LOD haben kann und die Bandbreite der getesteten Matrices begrenzt ist, sollte im Bedarfsfall für jede zu untersuchende Matrix eine spezifische LOD ermittelt werden.

Alternativ können alle Ergebnisse unterhalb der LOQ als quantitativ „< LOQ“ angegeben werden.

Spezifität

Für die folgenden Nahrungsmittel wurde ein negatives Ergebnis und damit keine Kreuzreaktivität festgestellt:

| | | | | | |
|---------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| Adzuki Bohnen | Garnele | Kartoffel | Mandel | Raps | Sojamehl |
| Aprikose | Garnele, gekocht | Kichererbse | Marone | Reis, braun | Sonnenblumenkern |
| Bockshornklee | Gartenkresse | Kidneybohne | Meerrettich | Reis, weiß | Thymian |
| Bohne, weiß | Gerste | Kirsche | Mohn | Rettich | Tofu |
| Buchweizen | Gliadin | Kiwi | Muskatnuss | Rindergelatine | Tomate |
| Cashew | Guakernmehl | Knoblauch, frisch | Nelke | Rindfleisch, gekocht | Vollmilch |
| Cayennepeffer | Gummi arabicum | Knoblauch, granuliert | Oktopus | Rindfleisch, roh | Walnuss |
| Chia-Samen | Hafer | Kokosnuss | Paprika | Roggen | Weißkohl |
| Chili | Haselnuss | Kümmel | Paranuss | Saccharose | Weizen |
| Cumin | Huhn, gekocht | Kürbiskern | Pecannuss | Schafsmilch | Ziegenmilch |
| Dill | Huhn, roh | Kurkuma | Pfeffer, schwarz | Schälereerbse | Zimt |
| Ente | Ingwer, frisch | Lamm | Pfirsich | Schweinefleisch | Zwiebel |
| Erbse | Ingwer, gemahlen | Leinsamen | Pflaume | Sellerie | |

| | | | | | |
|----------------|----------------------|-------------------------|------------|---------------|--|
| Erdnuss | Johannisbrotkernmehl | Linse | Pinienkern | Senf | |
| Fenchel (Tee) | Kakao | Lupine (Lupinus luteus) | Pistazie | Sesam | |
| Fisch / Dorsch | Kardamon | Macadamia | Porree | Shrimps | |
| Fischgelatine | Karotte | Maismehl | Pute | Soja-Lecithin | |

Für die folgenden Nahrungsmittel der obenstehenden Tabelle waren die Ergebnisse zwischen 0,5xLOQ und LOQ des Test Kits. Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass diese Matrices in Einzelfällen zu Ergebnissen oberhalb der LOQ führen:

| | | |
|------|---------------|-----------|
| Ente | Huhn, gekocht | Huhn, roh |
| Pute | Thymian | |

Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

| Reagenz | Kreuzreaktivität |
|------------|------------------|
| Ovalbumin | 0,25% |
| Ovomucoid | 614% |
| Conalbumin | 2,6% |
| Lysozym | <0,0003% |

Präzision

| | |
|-------------------------|---------|
| Intra-Assay Präzision | 4 - 9% |
| Inter-Assay Präzision | 3 - 7% |
| Inter-Chargen Präzision | 5 - 11% |

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über vier Stufen (Pasta, Brötchen, Kekse, Wurst und Schokolade) ergab mittlere Verdünnungslinearitäten von 93 – 112%.













Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

| | |
|----------------------|-----|
| Pasta | 91% |
| Brötchen | 83% |
| Butterkeks | 85% |
| Wurst | 98% |
| Zartbitterschokolade | 82% |

Es ist zu beachten, dass der industrielle Prozess der Lebensmittelverarbeitung sich auf die Proteine auswirkt, was die Testleistung beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund kann die Wiederfindung/Kreuzreaktivität bei hitzebehandelten Proben verändert sein.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Française | Espanol | Italiano |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las Instrucciones | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Référence | Número de catálogo | No. di catalogo |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | No. de lot | Número de lote | Lotto no |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| <i>Distributed by</i> | Distributed by | Vertrieb durch | Distribution par | Distribución por | Distribuzione da parte di |
|  | Version | Version | Version | Versión | Versione |
|  | Single-use | Einmalverwendung | À usage unique | Uso único | Uso una volta |