

Product information

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



User's Manual

Molluscs (Tropomyo- sin) ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Mollusc Tropomyosin in food

REF

DEMOLE01



96 wells

| | |
|-----------------|---------|
| Sensitivity | 1.7 ppb |
| Recovery | 74-110% |
| Incubation Time | 60 min |

1. GENERAL INFORMATION

Not only because of their cross-reactivity to house dust mites and crustaceans, molluscs represent an important group of food allergens. In this regard tropomyosin, which can be found in all common mollusc species, is the most important protein. In cooked and uncooked mollusc extracts this protein partly represents a high amount of total protein.

For mollusc allergic persons hidden mollusc proteins in food are 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, mollusc allergic persons must strictly avoid the consumption of mollusc containing food. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process, is often noticed. This explains why in many cases the existence of mollusc residues in food cannot be excluded. For this reason sensitive detection systems for mollusc residues in foodstuffs are required.

The **Molluscs (Tropomyosin) ELISA** represents a highly sensitive detection system for tropomyosin (from *helix aspersa*) and is particularly capable of the quantification of mollusc residues in fish products, soups, dressings, bakery products and meat products.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Molluscs (Tropomyosin)** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against mollusc tropomyosin is bound on the surface of a microtiter plate. Tropomyosin 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 tropomyosin 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 tropomyosin 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 printed 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-tropomyosin antibodies.
2. **CAL** **1 – 5** Tropomyosin Standards (0; 10; 40; 100; 400 ppb of tropomyosin): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ** **CONJ** Conjugate (anti-tropomyosin-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. Tropomyosin could adhere to different surfaces. 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 and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at **40°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 **40°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.

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-tropomyosin-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 H₂SO₄) 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 ppb 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 tropomyosin in ppb 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 tropomyosin [ppb] can be used to calculate the amount of the corresponding mollusc raw product (**wet weight**). Therefore the amount of tropomyosin has to be multiplied with a conversion factor (F).

The following conversion factors were determined by validation experiments:

| | |
|---|-------|
| Grapewine snail (<i>Helix aspersa</i>), blanched | 550 |
| Grapewine snail (<i>Helix pomatia</i>), blanched | 860 |
| Abalone (<i>Haliotis</i>), raw | 200 |
| Abalone (<i>Haliotis</i>), cooked | 580 |
| Scallop (<i>Pecten jacobaeus</i>), raw | 4850 |
| Scallop (<i>Pecten jacobaeus</i>), cooked | 6580 |
| Green lipped mussel (<i>Perna canalic.</i>), raw | 8620 |
| Green lipped mussel (<i>Perna canalic.</i>), cooked | 11230 |
| Blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>), raw | 14990 |
| Blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>), cooked | 16740 |
| Carpet mussel (<i>Venerupis pull.</i>), raw | 4965 |
| Carpet mussel (<i>Venerupis pull.</i>), cooked | 6190 |
| Oyster (<i>Ostreidae</i>), raw | 2940 |
| Oyster (<i>Ostreidae</i>), cooked | 4816 |
| Octopus (<i>Octopoda</i>), raw | 1360 |
| Octopus (<i>Octopoda</i>), cooked | 1360 |
| Squid (<i>Theutida</i>), raw | 700 |
| Squid (<i>Theutida</i>), cooked | 670 |

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 400 ppb 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.

| Tropomyosin (ppb) | % binding of 400 ppb |
|-------------------|----------------------|
| 400 | 100 |
| 100 | 36 |
| 40 | 18 |
| 10 | 7 |
| 0 | 3 |

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Molluscs** (Tropomyosin) **test** is 1.7 ppb (Tropo-myosin, helix aspersa).

Validation experiments with common matrices resulted in the following LODs [ppb]

| | |
|-----------------|-----|
| Soy sauce | 0.3 |
| Vegetable soup | 2.1 |
| Bakery products | 3.9 |
| Fish | 1.9 |
| Meat | 3.1 |

The limit of quantification (LOQ) of the Tropomyosin test is 10 ppb.

Due to the variety of sample matrices and their influence on the blank, results less than the LOQ should be treated as negative.

Precision

| | |
|-----------------------|------|
| Intra-assay Precision | 5-6% |
| Inter-assay Precision | 3% |

Recovery

Mean recovery was determined by spiking samples with different amounts of tropomyosin:

| | |
|-----------------|------|
| Soy sauce | 74% |
| Vegetable soup | 88% |
| Bakery products | 100% |
| Fish | 103% |
| Meat | 110% |

Linearity

The serial dilution of spiked samples (soy sauce, vegetable soup, bakery products, fish, meat) resulted in dilution linearity of 89-107%.

Cross reactivity

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

| | | |
|------------------|--------------|----------------|
| Apricot | Potato | Plum |
| Bean, white | Chervil | Pine seed |
| Buckwheat | Chickpea | Pistachio |
| Cashew | Cherry | Rice |
| Cayenne | Kiwi | Beef |
| Chili | Coconut | Bovine gelatin |
| Cumin | Cress | Rye |
| Cod | Pumpkin seed | Saccharose |
| Egg | Caraway | Ewe's milk |
| Pea | Lamb | Pork |
| Egg white powder | Lentil | Celery |
| Peanut | Lupin | Mustard |
| Fish gelatin | Corn | Sesame |
| Barley | Macadamia | Soy |
| Gliadin | Almond | Soy lecithin |
| Guar gum | Chestnut | Sunflower seed |
| Oats | Poppy seed | Tofu |
| Hazelnut | Nutmeg | Tomato |
| Isinglass | Bell pepper | Cow's milk |
| Chicken | Brazil nut | Walnut |
| Carob gum | Pecan nut | Wheat |
| Cocoa | Pepper | Goat's milk |
| Carrot | Peach | Onion |

12. REFERENCES

1. Wiszniewska M, et al. (2013) – Occupational allergy to squid (*Loligo vulgaris*). *Occup Medicine*, 63:298-300
2. Damiani E, et al. (2010) – Adverse reaction after ingestion of raw and boiled *Octopus vulgaris*. *Allergy*, 65(2):275-276
3. Rosado A, et al. (2009) – Occupational asthma caused by octopus particles. *Allergy*, 64(7):1101-1102
4. Carillo T, et al. (1994) – Anaphylaxis due to limpet ingestion. *Ann Allergy*, 73(6):504-508
5. Guilloux L, et al. (1998) – Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*).II. In vitro study. *Allergy*, 53(2):151-158
6. Rodriguez-Del Rio P, et al. (2009) – Selective allergy to *Venus antiqua* clam. *Allergy*, 64(5):815
7. Taylor SL (2008) – Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res*, 54:139-177
8. Martins LM, et al. (2005) – The *Helix aspersa* (brown garden snail) allergen repertoire. *Int Arch Allergy Immunol*, 136(1):7-15
9. Asturias JA, et al. (2002) – Cloning, isolation, and IgE-binding properties of *Helix aspersa* (brown garden snail) tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol*, 128(2):90-96
10. Miyazawa H, et al. (1996) – Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol*, 98(5):948-953

| | |
|-----------------|---------|
| Empfindlichkeit | 1,7 ppb |
| Wiederfindung | 74-110% |
| Inkubationszeit | 60 min |

1. ALLGEMEINES

Nicht zuletzt aufgrund von Kreuzreaktivität zu Hausstaubmilben und Krustentieren stellen Mollusken eine bedeutende Gruppe von Nahrungsmittel-allergenen dar. Das nach heutigem Kenntnisstand wohl bedeutendste Protein ist dabei das Spezies-übergreifende Muskelprotein Tropomyosin. Dieses Leitprotein stellt einen hohen Anteil des Gesamtproteins gekochter und ungekochter Weichtier-Extrakte dar.

Für Molluskenallergiker sind versteckte Mollusken-proteine in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von allergenem Protein können allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen. Daher müssen Molluskenallergiker auf den Konsum von molluskenhaltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Aufgrund von Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln, kann bei einigen Lebensmitteln das Vorhandensein von Molluskenrückständen nicht ausgeschlossen werden. Um diese detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Mollusken (Tropomyosin) Test** stellt ein hoch sensibles Nachweissystem für Tropomyosin (aus *helix aspersa*) dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Mollusken-Rückständen in Fischprodukten, Suppen, Saucen, Backwaren und Fleischerzeugnissen geeignet. Aufgrund hoher Kreuzreaktivitäten ist der Test zur Detektion aller handelsüblichen Mollusken geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Mollusken (Tropomyosin) Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Mollusken-Tropomyosin gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf werden die Tropomyosin enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und dem Tropomyosin statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Tropomyosin 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 Tropomyosinkonzentration 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 Tropomyosin-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Tropomyosin Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 10, 40, 100, 400 ppb Tropomyosin), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Tropomyosin-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 Proben-Verdünnungspuffer (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)
- Ein 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. Tropomyosin könnte an den Oberflächen haften. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vor-extrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle Arten von festen Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, einer Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchgemischt 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 **40°C** inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.
3. Die Proben werden bei mindestens 2000 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 19 mL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. Anschließend wird die Suspension für 15 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad bei **40°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.

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-Tropomyosin-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 ppb (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppb für Tropomyosin abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Tropomyosin-Gehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Tropomyosin-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Um aus dem ermittelten Tropomyosin-Gehalt [ppb] den Gehalt eines zugrundeliegenden Rohprodukts (**Feuchtgewicht**) zu erhalten, muss das Ergebnis mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor (F) multipliziert werden.

Die folgenden Umrechnungsfaktoren wurden anhand von Validierungsversuchen ermittelt:

| | |
|---|-------|
| Weinbergschnecke (<i>Helix aspersa</i>), blanchiert | 550 |
| Weinbergschnecke (<i>Helix pomatia</i>), blanchiert | 860 |
| Abalone (<i>Haliotis</i>), roh | 200 |
| Abalone (<i>Haliotis</i>), gekocht | 580 |
| Jakobsmuschel (<i>Pecten jacobaeus</i>), roh | 4850 |
| Jakobsmuschel (<i>Pecten jacobaeus</i>), gekocht | 6580 |
| Grünschalmuschel (<i>Perna canalic.</i>), roh | 8620 |
| Grünschalmuschel (<i>Perna canalic.</i>), gekocht | 11230 |
| Miesmuschel (<i>Mytilus edulis</i>), roh | 14990 |
| Miesmuschel (<i>Mytilus edulis</i>), gekocht | 16740 |
| Teppichmuschel (<i>Venerupis pull.</i>), roh | 4965 |
| Teppichmuschel (<i>Venerupis pull.</i>), gekocht | 6190 |
| Auster (<i>Ostreidae</i>), roh | 2940 |
| Auster (<i>Ostreidae</i>), gekocht | 4816 |
| Octopus (<i>Octopoda</i>), roh | 1360 |
| Octopus (<i>Octopoda</i>), gekocht | 1360 |
| Tintenfisch (<i>Theutida</i>), roh | 700 |
| Tintenfisch (<i>Theutida</i>), gekocht | 670 |

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.

| Tropomyosin (ppb) | OD % von 400 ppb |
|-------------------|------------------|
| 400 | 100 |
| 100 | 36 |
| 40 | 18 |
| 10 | 7 |
| 0 | 3 |

11. TECHNISCHE DATEN**Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Mollusken** (Tropomyosin) **Tests** beträgt 1,7 ppb (Tropomyosin, helix aspersa).

Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden unteren Nachweisgrenzen [ppb].

| | |
|-------------|-----|
| Soja-Sauce | 0,3 |
| Gemüsesuppe | 2,1 |
| Backwaren | 3,9 |
| Fisch | 1,9 |
| Fleisch | 3,1 |

Die untere Bestimmungsgrenze des **Mullusken** (Tropomyosin) **Tests** beträgt 10 ppb.

Proben mit Ergebnissen kleiner der Bestimmungsgrenze sollten aufgrund der Vielfalt an Matrices und deren Einfluss auf den Hintergrund als negativ bewertet werden.

Präzision

| | |
|-----------------------|------|
| Intra-Assay Präzision | 5-6% |
| Inter-Assay Präzision | 3% |

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockerter Proben bestimmt:

| | |
|-------------|------|
| Soja-Sauce | 74% |
| Gemüsesuppe | 88% |
| Backwaren | 100% |
| Fisch | 103% |
| Fleisch | 110% |

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben (Soja-Sauce, Gemüsesuppe, Backwaren, Fisch, Fleisch) über fünf Stufen ergab Verdünnungslinearitäten von 89-107%.

Spezifität






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

| | | |
|------------------|---------------|----------------|
| Aprikose | Kartoffel | Pflaume |
| Bohne, weiss | Kerbel | Pinienkern |
| Buchweizen | Kichererbse | Pistazie |
| Cashew | Kirsche | Reis |
| Cayenne | Kiwi | Rind |
| Chili | Kokosnuss | Rindergelatine |
| Cumin | Kresse | Roggen |
| Dorsch | Kürbiskern | Sacharose |
| Ei | Kümmel | Schafsmilch |
| Erbse | Lamm | Schwein |
| Eiweißpulver | Linse | Sellerie |
| Erdnuss | Lupine | Senf |
| Fischgelatine | Mais | Sesam |
| Gerste | Macadamianuss | Soja |
| Gliadin | Mandel | Soja-Lecithin |
| Guarkernmehl | Marone | Sonnenblumenk. |
| Hafer | Mohn | Tofu |
| Haselnuss | Muskat | Tomate |
| Hausenblase | Paprika | Vollmilch |
| Huhn | Paranuss | Walnuss |
| Johannisbrotkern | Pecannuss | Weizen |
| Kakao | Pfeffer | Ziegenmilch |
| Karotte | Pfirsich | Zwiebel |

12. LITERATUR

1. Wiszniewska M, et al. (2013) – Occupational allergy to squid (*Loligo vulgaris*). *Occup Medicine*, 63:298-300
2. Damiani E, et al. (2010) – Adverse reaction after ingestion of raw and boiled *Octopus vulgaris*. *Allergy*, 65(2):275-276
3. Rosado A, et al. (2009) – Occupational asthma caused by octopus particles. *Allergy*, 64(7):1101-1102
4. Carillo T, et al. (1994) – Anaphylaxis due to limpet ingestion. *Ann Allergy*, 73(6):504-508
5. Guilloux L, et al. (1998) – Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*).II. In vitro study. *Allergy*, 53(2):151-158
6. Rodriguez-Del Rio P, et al. (2009) – Selective allergy to *Venus antiqua* clam. *Allergy*, 64(5):815
7. Taylor SL (2008) – Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res*, 54:139-177
8. Martins LM, et al. (2005) – The *Helix aspersa* (brown garden snail) allergen repertoire. *Int Arch Allergy Immunol*, 136(1):7-15
9. Asturias JA, et al. (2002) – Cloning, isolation, and IgE-binding properties of *Helix aspersa* (brown garden snail) tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol*, 128(2):90-96
10. Miyazawa H, et al. (1996) – Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol*, 98(5):948-953

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Français | Espanol | Italiano |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitäts-kennzeichnung | 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 | Usage 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 Cat. |
|  | 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 | Temperature de conservation | Temperatura de conservacion | 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> | Distributor | Vertreiber | Distributeur | Distribuidor | Distributore |