

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# Casein ELISA



**DECASE01**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**TABLE OF 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 .....	5
8. PROCEDURE.....	5
9. CALCULATION OF RESULTS.....	6
10. TYPICAL STANDARD VALUES .....	6
11. PERFORMANCE.....	7
1. ALLGEMEINES .....	9
2. TESTPRINZIP .....	9
3. VORSICHTSMAßNAHMEN .....	9
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN.....	10
5. REAGENZIEN .....	10
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN .....	10
7. PROBENVORBEREITUNG .....	11
8. TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	13
10. TYPISCHE STANDARDKURVE .....	13
11. TECHNISCHE DATEN .....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	16

Sensitivity (Casein)	0.00-0.03 ppm
Recovery	82-102%
Incubation Time	60 min

## 1. GENERAL INFORMATION

Bovine milk belongs to the most important allergenic food ingredients especially for children. Already very low amounts of bovine milk can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, milk allergic persons must strictly avoid the consumption of milk or milk containing food. In particular the presence of hidden milk proteins such as in sausage, cookies, convenience food or beverages represent a critical problem for milk allergic persons. According to EU Directive 2003/89/EG the addition of bovine milk has to be labeled. For the detection of bovine milk in foodstuffs, sensitive detection systems are required. Approximately 80% of bovine milk proteins are caseins which are composed of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. So these heat-stable allergens represent the main fraction of bovine milk proteins.

The Demeditec Casein ELISA represents a highly sensitive detection system and is particularly capable of the identification and quantification of bovine casein residues in cookies, bread crumbs, sausage, orange juice, wine, soy products and chocolate.

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Casein** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against casein is bound on the surface of a microtiter plate. Casein 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 casein 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 casein 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-casein antibodies.
2. **CAL 1 – 5 100x** Casein Standards (0, 0.2, 0.6, 2, 6 ppm of casein): 5 vials with 2.0 mL as 100x concentrate, dyed brownish. Dilute 20 µL of standard with 1980 µL **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer to achieve the concentrations named above. Stored at 4°C the diluted standards are stable for at least 24 hours.  
**Note: The concentrations above refer to the 100x diluted standards.**
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-casein-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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 5x** Extraction and sample dilution buffer (Carbonate buffer): 2 x 120 mL as 5x concentrate, dyed red. Dilute 1+4 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
- 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 a 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. 0.5 g of the homogenized mixture is suspended in 10 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.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at  $\geq 2000$  g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. Due to high matrix effects meat and sausage samples should be further diluted 1 + 4 with **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer.
5. 100  $\mu$ L 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:**

0.5 mL of liquid sample is diluted in 9.5 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a pre-heated 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. For wine samples the incubation for 15 min at 60°C as well as the centrifugation step are not necessary and can be omitted.

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 **diluted** standards should be determined at least twofold. When samples in great numbers 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  $\mu$ L of **diluted** 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  $\mu$ L 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 absorbances.
5. Pipet 100  $\mu$ L of conjugate (anti-casein-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L of stop solution (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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 **diluted** 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 meat containing samples or 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 casein in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

For calculation of the amount of a corresponding raw product, the casein concentration has to be multiplied with a product specific conversion factor (F).

The following conversion factors have been determined by means of validation experiments:

Whole milk	42
Skim milk powder (MoniQA MQA 092014)	4,4
Skim milk powder(NIST RM1549)	3,6
Whole Milk Powder (NIST RM8435)	4,9
Caseinate	1,2

## 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 6 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.

Casein (ppm)	% binding of 6 ppm
6	100
2	75
0.6	44
0.2	23
0	8

## 11. PERFORMANCE

### Sensitivity

Based on the values derived from blank matrix signal + 3 x SD, a general LOD for the **Demeditec Casein test** was determined as 0.03 ppm..

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

Cookies	0.02
Bread Crumbs	0.03
Sausage	0.02
Chocolate	0.00
White wine	0.02
Red Wine	0.02
Soy Milk	0.02
Orange Juice	0.03

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".

### Specificity

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

Adzuki bean	Chicken	Ginger, dried	Oats	Rice, white
Almond	Chickpea	Ginger, fresh	Onion	Rye
Barley	Chili	Gliadin	Paprika	Saccharose
Bean, white	Cinnamon	Guar gum	Pea	Shrimps
Beef	Clove	Gum arabic	Peach	Soy flour
Beta- lactoglobulin	Cocoa	Hazelnut	Peanut	Soy lecithin
Bovine gelatin	Coconut	Hempseed	Pecan	Split pea
Brazil nut	Corn	Horseradish	Pepper, black	Sunflower seed
Buckwheat	Cumin	Kidney bean	Pineseed	Thyme
Cabbage, white	Dill	Kiwi	Pistachio	Tofu
Caraway	Duck	Lamb	Poppy seed	Tomato
Cardamom	Egg	Leek	Pork	Turkey
Carrot	Fennel	Lentil	Potato	Turmeric
Cashew	Fenugreek	Lima bean	Prawn	Walnut
Celery	Flaxseed	Lupin	Pumpkin seed	Wheat
Cherry	Garden cress	Macadamia	Radish	
Chestnut	Garlic, fresh	Mustard	Rapeseed	
Chia	Garlic, granulated	Nutmeg	Rice, brown	

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:

Beef	Lamb	Pork
Prawn	Rapeseed	

The following cross-reactions were determined:

Cod	0.00002%
Ewe's milk	< 1.2%
Goat's milk	< 1.1%
Sesame	0.00004%

### Precision

Intra-assay Precision	5 - 11%
Inter-assay Precision	8 - 14%

### Linearity

The serial dilution of spiked samples (cookies, bread crumbs, chocolate, sausage, soy milk, orange juice and white wine) resulted in a dilution linearity of 100% - 127%.

### Recovery

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

Cookies	99%
Bread crumbs	84%
Chocolate	85%
Sausage	82%
Soy milk	89%
Orange juice	87%
White wine	102%
Red wine	102%



Empfindlichkeit (Casein)	0,00-0,03 ppm
Wiederfindung	82 – 102%
Inkubationszeit	60 min

## 1. ALLGEMEINES

Kuhmilch gehört insbesondere bei Kindern zu den wichtigsten allergieauslösenden Nahrungsmitteln. Schon sehr geringe Mengen von Kuhmilch können allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen. Aus diesem Grund müssen Kuhmilchallergiker auf den Konsum von Kuhmilch oder kuhmilchhaltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Insbesondere das Vorhandensein versteckter Kuhmilchproteine wie z.B. in Wurst, Gebäck, Fertigprodukten oder Getränken stellt für Kuhmilchallergiker ein großes Problem dar. In der Europäischen Union ist der Einsatz von Kuhmilch nach EU Richtlinie 2003/89/EG kennzeichnungspflichtig. Um Kuhmilch detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Etwa 80% der Kuhmilchproteine sind Caseine, welche sich aufteilen in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Caseine. Diese hitzestabilen Allergene stellen damit den Hauptanteil der Kuhmilchproteine dar.

Der **Casein Test** stellt ein hochsensibles Nachweissystem für Caseine dar und ist insbesondere zur Identifizierung und Quantifizierung von Kuhmilch-Casein in Keksen, Panade, Wurst, Orangensaft, Wein, Sojaprodukten und Schokolade geeignet.

## 2. TESTPRINZIP

Der **Casein Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Caseine gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf werden die Casein enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Casein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Caseine 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 Farbreaktion 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 Casein-Konzentration 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 Casein-bindenden Antikörpern.
2. **CAL** **1** – **5** **100x** Casein Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0; 0,2; 0,6; 2; 6 ppm Casein), als 100x-Konzentrat, bräunlich eingefärbt. Gebrauchslösung: 20 µL Standard mit 1980 µL endverdünntem Extraktions- und Verdünnungspuffer verdünnen, um die oben genannten Konzentrationen zu erhalten. Die endverdünnten Standards sind bei 4°C mindestens 24 Stunden haltbar.  
**Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die 100x verdünnten Standards.**
3. **ENZ** **CONJ** Konjugat (anti-Casein-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB** **TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP** **SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM** **DIL** **5x** Extraktions- und Verdünnungspuffer (Carbonat-Puffer), 2 x 120 mL als 5x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+4 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
- 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. 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, Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchmischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 0,5 g entnommen und in 10 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. 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.
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. Fleisch- bzw. Wurstproben werden nach der Extraktion aufgrund erhöhter Matrixeffekte 1 + 4 mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt.
5. 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:

0,5 mL flüssige Probe wird in 9,5 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. Für Wein Proben sind die Inkubation für 15 min bei 60°C sowie die anschließende Zentrifugation nicht nötig. Die verdünnte Probe kann direkt im Test eingesetzt werden.

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 **verdünnten** Standards sollten in jedem Fall mindestens 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 **verdünnte** 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-Casein-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  $\mu\text{L}$  Stopp-Lösung (0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 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 **verdünnten** 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 Casein abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Casein-Gehalt der Probe. Sollte der Extrakt aufgrund Fleisch-haltiger Proben oder eines zu hohen Casein-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Um aus dem ermittelten Casein-Gehalt den Gehalt eines zugrundeliegenden Rohprodukts zu erhalten, muss das Ergebnis mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor (F) multipliziert werden.

Die folgenden Umrechnungsfaktoren wurden anhand von Validierungsversuchen ermittelt:

Vollmilch	42
Magermilchpulver (MoniQA MQA 092014)	4,4
Magermilchpulver (NIST RM1549)	3,6
Vollmilchpulver (NIST RM8435)	4,9
Caseinat	1,2

## 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.

Casein (ppm)	OD-% von 6 ppm
6	100
2	75
0,6	44
0,2	23
0	8

## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze (LOD) des **Demeditec Casein Tests** beträgt 0,03 ppm bezogen auf die Standardkurve.

Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden unteren Nachweisgrenzen [ppm]:

Kekse	0,02
Panade	0,03
Wurst	0,02
Schokolade	0,00
Weißwein	0,02
Rotwein	0,02
Sojamilch	0,02
Orangensaft	0,03

Die untere Bestimmungsgrenze (LOQ) des **Demeditec Casein Tests** beträgt 0,2 ppm.

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 Bohne	Gliadin	Knoblauch, granuliert	Paprika	Sellerie
Beta Lactoglobulin	Guakernmehl	Kokosnuss	Paranuss	Senf
Bockshornklee	Gummi arabicum	Kümmel	Pecannuss	Shrimps
Bohne, weiß	Hafer	Kürbiskern	Pfeffer, schwarz	Soja-Lecithin
Buchweizen	Hanfsamen	Lamm	Pfirsich	Sojamehl
Cashew	Haselnuss	Lauch	Pinienkern	Sonnenblumenkern
Chia	Huhn	Leinsamen	Pistazie	Thymian
Chili	Ingwer, frisch	Limabohne	Pute	Tofu
Cumin	Ingwerpulver	Linse	Raps	Tomate
Curcuma	Kakao	Lupine	Reis, braun	Vollei
Dill	Kardamom	Macadamia	Reis, weiß	Walnuss
Ente	Karotte	Mais	Rettich	Weißkohl
Erbse	Kartoffel	Mandel	Rindergelatine	Weizenkörner
Erdnuss	Kichererbse	Marone	Rindfleisch	Zimt
Fenchel	Kidneybohne	Meerrettich	Roggen	Zwiebel
Garnele	Kirsche	Mohn	Saccharose	
Gartenkresse	Kiwi	Muskat	Schälerbse	
Gerste	Knoblauch, frisch	Nelke	Schweinefleisch	

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:

Garnele	Lamm	Raps
Rindfleisch	Schweinefleisch	

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Dorsch	0,00002%
Schafsmilch	< 1,2%
Sesam	0,00004%
Ziegenmilch	< 1,1%

### Präzision

Intra-Assay Präzision	5 - 11%
Inter-Assay Präzision	8 - 14%

### Linearität














Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Kekse, Panade, Schokolade, Wurst, Sojamilch, Orangensaft und Weißwein) ergab Verdünnungslinearitäten von 100 – 127%.

### Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Kekse	99%
Panade	84%
Schokolade	85%
Wurst	82%
Sojamilch	89%
Orangensaft	87%
Weißwein	102%
Rotwein	102%

**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 y 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