

Product information

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



User's Manual

Fish (Parvalbumin) ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of fish in food



DEFISE01



96 wells

Sensitivity (Cod)	1.4 ppm
Recovery	93-117%
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Fishes belong to the most frequent elicitors of food allergies. The allergies are predominantly induced by the low-molecular, calcium-binding muscle protein parvalbumin. The protein is characterized by its high heat resistance and stability against denaturing agents and proteolytic enzymes. Predominantly in regions with a high consumption of fish like Scandinavia, Japan or the Mediterranean countries, fish allergies represent a heavy health problem. The symptoms are ranging from inflammation of the skin over gastrointestinal and respiratory problems up to live-threatening anaphylactic shock. In spite of the high biodiversity most patients react with allergic symptoms to several fish species due to the high cross-reactivity between the fish allergens.

For fish-allergic persons hidden fish allergens in food are a critical problem. Already very low amounts of fish can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, fish-allergic persons must strictly avoid the consumption of fish containing food. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process, is often noticed. This explains why in many cases the existence of fish residues in food cannot be excluded. For this reason sensitive detection systems for fish residues in foodstuffs are required.

The **Demeditec Fish ELISA** represents a highly sensitive detection system for fish, based on the trans-species allergen parvalbumin. It is particularly capable of the quantification of fish residues in wine, soups, sauces, crackers, surimi and asia products.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Fish ELISA** is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against fish proteins is bound on the surface of a microtiter plate. Fish 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 fish proteins 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 terminated by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of fish 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 (micro-pipets, 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-fish antibodies.
2. **CAL 1 – 5** Cod Standards (0; 4; 10; 40; 100 ppm of cod): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-fish-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. Fish proteins could adsorb 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 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.

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-fish-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 cod reference standard against its concentration in ppm on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the cod 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 equivalent concentration of cod in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. If the fish species of the sample is known, the amount of the appropriate species can be calculated by multiplying the test result (cod) with a species specific conversion factor:

Fish species	Conversion factor (F)
Eel	29
Flounder	7.1
Perch	5.2
Trout	2.0
Pike	0.3
Herring (smoked)	13
Carp	2.6
Salmon	1.7
Mackerel (smoked)	50
Red mullet	7.5
Shark catfish	4.2
Redfish	103
Red Snapper	29
Samlet	1.7
Sardine	101
Haddock	21
Plaice	2.4
Swordfish	1250
Hake	12
Coalfish	3.0
Devilfish	274
Spined loach	32
Turbot	27
Tuna	370
Catfish	1.7
Bass	5.0
Zander	11

It has to be considered that the standardisation as well as the conversion factors relate to fresh fish. For the interpretation of the test results, the grade of process of the respective food sample has to be accounted for. Validation experiments showed that cooked cod meat (20 min) resulted in a reactivity of 25% compared to fresh cod.

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 100 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.

Cod (ppm)	% binding of 100 ppm
100	100
40	63
10	24
4	14
0	7

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Fish test** is 1.4 ppm (cod) for the standard curve. Validation experiments with common matrices resulted in the following LODs [ppm].

Wine (red)	1.5
Soup	1.3
Worcester Sauce	0.3
Asia Sauce	2.1
Cracker	0.5
Surimi	1.8
Spring Roll	1.3

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Fish test** is 4 ppm.

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	7-12%
Inter-assay Precision	4-10%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (Wine, soup, Worcester sauce, asia sauce, cracker, surimi and spring roll) resulted in a dilution linearity of 89–105%.

Cross-reactivity

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

Almond	Hazelnut	Pork
Barley	Isinglass	Potato
Bean	Lamb	Pumpkin seed
Beef	Macadamia	Rice
Brazil nut	Milk	Rye
Buckwheat	Millet	Scallop
Carrot	Mustard	Sesame
Cashew	Oat	Shrimp
Celery	Onion	Soy
Chicken	Pea	Sunflower seed
Corn	Peanut	Walnut
Egg	Pecan	Wheat
Fish gelatin	Pistachio	

Recovery

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

Wine (red)	103%
Soup	117%
Worcester Sauce	112%
Asia Sauce	103%
Cracker	99%
Surimi	114%
Spring Roll	93%

12. REFERENCES

1. Faeste CK, et al. (2008) – Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immun Methods*, 329(1-2):45-55
2. Weber P, et al. (2009) – Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with parv-19 anti-parvalbumin antibodies. *J Agric Food Chem*, 57(23): 11328-11334
3. Gajewski KG, et al. (2009) – Monoclonal antibody specific to major fish allergen: parvalbumin. *J Food Protect*, 72(4):818-825
4. Chen L, et al. (2006) . Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem*, 54(15): 5577-5582
5. Swoboda I, et al. (2002) – Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen (...). *J. Immun*, 168 :4576-4584
6. Griesmeier U, et al. (2009) – Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy*, 65(2):191-198
7. Lim DLC, et al. (2008) – Parvalbumin – the major tropical fish allergen. *Ped All Imm*, 19(5):399-407
8. Lifrani A, et al. (2009) – Development of animal models and sandwich-ELISA tests to detect the allergenicity of fining agent residues in wines, *J Agric food Chem*, 57(2):525-534
9. Chatterjee U, et al. (2006) – Changes in the allergenicity during different preparations of pomfret, hilsa, bhetki and mackerel fish as illustrated by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. In *Arch allergy Immunol*, 141(1):1-10
10. Van Do T, et al. (2005) – Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immun*, 116(6):1314-1320

Empfindlichkeit (Dorsch)	1,4 ppm
Wiederfindung	93-117%
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Fische zählen zu den häufigsten Auslösern von Nahrungsmittelallergien. Primär werden sie durch das niedermolekulare, Calcium-bindende Muskelprotein Parvalbumin ausgelöst, welches sich durch eine hohe Hitzeresistenz und Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien und proteolytischen Enzymen auszeichnet. Vor allem in Regionen mit sehr hohem Fischkonsum, wie z.B. Skandinavien, Japan oder den mediterranen Ländern, stellen Fischallergien ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Die Symptome reichen von Hautreizungen über gastrointestinale Beschwerden und respiratorische Probleme bis hin zum lebensbedrohlichen ana-phylaktischen Schock. Trotz der hohen Artenvielfalt reagieren die meisten Patienten auf mehrere Fischarten mit allergischen Symptomen, was in der hohen Kreuzreaktivität zwischen den Fischallergenen begründet ist.

Für Fischallergiker sind versteckte Fischproteine in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von Fisch können die allergischen Symptome auslösen. Daher müssen Fisch-Allergiker auf den Konsum von Fisch oder Fisch-haltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Aufgrund von Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln, kann bei einigen Lebensmitteln das Vorhandensein von Fischrückständen nicht ausgeschlossen werden. Um diese detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Demeditec Fisch ELISA** stellt ein hoch sensibles Nachweissystem für Fisch, basierend auf dem Artenübergreifenden Allergen Parvalbumin dar. Er ist insbesondere zur Quantifizierung von Rückständen in Wein, Suppen, Saucen, Crackern, Surimi und Asia-Produkten wie z.B. Frühlingsrollen geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Fisch Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Fischprotein gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf werden die Fisch enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Fischprotein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Fischprotein 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 Fischkonzentration 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 müssen 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 Fisch-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Dorsch Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 4, 10, 40, 100 ppm Dorsch), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Fisch-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. Fischproteine könnten 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 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. 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 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.

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-Fisch-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 Dorsch abgelesen. **Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Dorsch-äquivalenten-Fischgehalt der Probe, die Probenverdünnung ist bereits berücksichtigt.** Sollte die Fischart bekannt sein, kann durch Multiplikation mit einem artenspezifischen Umrechnungsfaktor der Gehalt der entsprechenden Fischart berechnet werden:
4. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Fisch-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Fischart	Umrechnungsfaktor (F)
Aal	29
Flunder	7,1
Flussbarsch	5,2
Forelle	2,0
Hecht	0,3
Hering (geräuchert)	13
Karpfen	2,6
Lachs	1,7
Makrele (geräuchert)	50
Meerbarbe	7,5
Pangasius	4,2
Rotbarsch	103
Roter Schnapper	29
Saibling	1,7
Sardine	101
Schellfisch	21
Scholle	2,4
Schwertfisch	1250
Seehecht	12
Seelachs	3,0
Seeteufel	274
Steinbeisser	32
Steinbutt	27
Thunfisch	370
Wels	1,7
Wolfsbarsch	5,0
Zander	11

Es ist zu berücksichtigen, dass sich die Standardisierung als auch die Umrechnungsfaktoren auf frischen Fisch beziehen. Der Prozessierungsgrad des jeweiligen Nahrungsmittels muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Validierungsversuche zeigten, dass gekochtes Dorschfleisch (20 min) eine Reaktivität von 25% verglichen mit frischem Dorsch aufweist.

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.

Dorsch (ppm)	OD % von 100 ppm
100	100
40	63
10	24
4	14
0	7

11. TECHNISCHE DATEN**Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Fisch Tests** beträgt 1.4 ppm (Dorsch). Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden unteren Nachweisgrenzen [ppm].

Wein (rot)	1,5
Suppe	1,3
Worcester-Sauce	0,3
Asia-Sauce	2,1
Cracker	0,5
Surimi	1,8
Frühlingsrolle	1,3

Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec Fisch Tests** beträgt 4 ppm. Proben mit Ergebnissen kleiner der Bestimmungsgrenze sollten aufgrund der Vielfalt an Matrices und deren Einfluss auf den Hintergrund als negativ bewertet werden.

Präzision (Konzentration)

Intra-Assay Präzision	7-12%
Inter-Assay Präzision	4-10%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Wein, Suppe, Worcester-Sauce, Asia-Sauce, Cracker, Surimi und Frühlingsrolle) ergab Verdünnungslinearitäten von 89-105%.

Spezifität

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

Bohne	Kammuschel	Rind
Buchweizen	Karotte	Roggen
Cashew	Kartoffel	Schwein
Ei	Kürbiskern	Sellerie
Erbse	Lamm	Senf
Erdnuss	Macadamia	Sesam
Fischgelatine	Mais	Shrimps
Gerste	Mandel	Soja
Hafer	Milch	Sonnenblumenk.
Haselnuss	Paranuss	Walnuss
Hausenblase	Pecannuss	Weizen
Hirse	Pistazie	Zwiebel
Huhn	Reis	

Wiederfindung






Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Wein (rot)	103%
Suppe	117%
Worcester-Sauce	112%
Asia-Sauce	103%
Cracker	99%
Surimi	114%
Frühlingsrolle	93%

12. LITERATUR

1. Faeste CK, et al. (2008) – Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immun Methods*, 329(1-2):45-55
2. Weber P, et al. (2009) – Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with parv-19 anti-parvalbumin antibodies. *J Agric Food Chem*, 57(23): 11328-11334
3. Gajewski KG, et al. (2009) – Monoclonal antibody specific to major fish allergen: parvalbumin. *J Food Protect*, 72(4):818-825
4. Chen L, et al. (2006) . Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem*, 54(15): 5577-5582
5. Swoboda I, et al. (2002) – Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen (...). *J. Immun*, 168 :4576-4584
6. Griesmeier U, et al. (2009) – Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy*, 65(2):191-198
7. Lim DLC, et al. (2008) – Parvalbumin – the major tropical fish allergen. *Ped All Imm*, 19(5):399-407
8. Lifrani A, et al. (2009) – Development of animal models and sandwich-ELISA tests to detect the allergenicity of fining agent residues in wines, *J Agric food Chem*, 57(2):525-534
9. Chatterjee U, et al. (2006) – Changes in the allergenicity during different preparations of pomfret, hilsa, bhetki and mackerel fish as illustrated by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. In *Arch allergy Immunol*, 141(1):1-10
10. Van Do T, et al. (2005) – Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immun*, 116(6):1314-1320

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konfirmitäts-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