

Product information

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



Peanut ELISA



DEPEAE01



96



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

CONTENTS/ INHALTSVERZEICHNIS

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

Sensitivity (Peanut)	0.06 – 0.25 ppm
Recovery	93 – 102%
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Peanut (*Arachis hypogaea*) belongs to the legumes. With 25 % the fraction of proteins in peanuts is very high. Many of these proteins are known for being allergenic, such as Arachins and Conarachins which are contained in relative high amounts. For this reason peanut represents one of the most important food allergens. For peanut allergic persons hidden peanut allergens in food are a critical problem. Already very low amounts of peanuts can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, peanut allergic persons must strictly avoid the consumption of peanuts or peanut containing food. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process is often noticed. The chocolate production process is a representative example. This explains why in many cases the existence of peanut residues in foods cannot be excluded. For this reason sensitive detection systems for peanut residues in foodstuffs are required.

The **Demeditec Peanut ELISA** represents a highly sensitive detection system and is particularly capable of the quantification of peanut residues in cookies, cereals, ice cream, chocolate and hazelnut.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Peanut** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against peanut proteins is bound on the surface of a microtiter plate. Peanut 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 peanut 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 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 peanut 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 (micropipettes, 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-peanut antibodies.
2. **CAL 1 – 5** Peanut Standards (0; 1; 4; 10; 40 ppm of peanut): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-peanut-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 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 micropipettes
- Volumetric flask
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Plastic bag to store unused microtiter strips

Reagents

- double distilled water
- Extraction additive for polyphenol containing samples (DEEXSCH2)

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. Peanut proteins adhere very strongly to different surfaces. In certain cases they can resist a common dishwasher cleaning. To identify possible cross-contamination caused by previous extractions it is strongly recommended to note the sequence of the extractions.

The following sample preparation should be applied for solid samples:

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

The following sample preparation should be applied for liquid samples:

1 mL of liquid sample is diluted in 19 mL of pre-diluted extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a 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.

Attention:

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

8. PROCEDURE

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

In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and a second time 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-peanut-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 (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

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

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

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 40 ppm standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

Peanut (ppm)	% binding of 40 ppm
40	100
10	42
4	20
1	8

0	4
---	---

11.PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Peanut test** is 0.08 ppm peanut.

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

Cookies	0.06
Ice-cream	0.25
Chocolate	0.24
Cornflakes	0.25
Hazelnut	0.14

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Peanut test** is 1 ppm peanut.

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

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

Cross-reactivity

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

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

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:

Almond	Carob gum	Fenugreek
Lentil	Pecan	Soy flour

The following cross reactions were determined:

Cayenne	0.0012%
Clove	0.0001%
Cocoa	0.0002%
Gum arabic	0.0006%

Applying the Extraction Additive, no cross-reaction for cocoa could be detected.

Precision

Intra-assay Precision	7 – 10%
Inter-assay Precision	2 – 11%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (cookies, cereals, ice cream and chocolate) resulted in a dilution linearity of 85% - 115%.

Recovery

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

Cookies	97%
Cereals	102%
Ice cream	93%
Chocolate	96%
Hazelnut	96%

Empfindlichkeit	0,06 – 0,25 ppm
Wiederfindung	93 – 102%
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) gehört zu den Leguminosen und hat mit ca. 25% einen sehr hohen Proteinanteil im Kern. Viele dieser Proteine sind als allergieauslösend bekannt, wie z.B. die in relativ großen Mengen enthaltenen Arachine und Conarachine. Aus diesem Grund stellt die Erdnuss eines der bedeutendsten Nahrungsmittelallergene dar. Für Erdnuss-Allergiker sind versteckte Erdnussallergene in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von Erdnuss lösen allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock aus. Aus diesem Grund müssen Erdnussallergiker auf den Konsum von Erdnüssen oder erdnusshaltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Aufgrund von Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln wie z.B. bei Schokolade, kann bei einigen Lebensmitteln das Vorhandensein von Erdnussrückständen nicht ausgeschlossen werden. Um diese detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Demeditec Erdnuss Test** stellt ein hochsensibles Nachweissystem dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Erdnussrückständen in Keksen, Cerealien, Eiscreme, Schokolade und Haselnuss geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Erdnuss Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Erdnussprotein gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Erdnuss enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Erdnussprotein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Erdnussprotein gerichteter zweiter Antikörper wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzu pipettiert 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 Erdnusskonzentration 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 erdnussbindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Erdnuss Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 1, 4, 10, 40 ppm Erdnuss), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Erdnuss-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 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)
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

Reagenzien

- bidestilliertes Wasser
- Extraktionsadditiv für Polyphenol-haltige Proben (DEEXSCH2)

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. Erdnussproteine haften sehr stark an den Oberflächen und können in manchen Fällen selbst einer herkömmlichen Spülmaschinenreinigung standhalten. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vorextrakte 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 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.
5. 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.

Achtung:

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bidestilliertem Wasser **verdünnt** werden. Die **gebrauchsfertigen** Standards sollten in jedem Fall im Doppelansatz bestimmt werden. Bei größeren Mengen von Proben sollten die Standards einmal vor und einmal nach den Proben pipettiert und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen werden. Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen. Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Erdnuss-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 (1 N saure Lösung) 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 Erdnuss abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Erdnussgehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Erdnussgehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

10. TYPISCHE STANDARDKURVE

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

Erdnuss (ppm)	OD-% von 40 ppm
40	100
10	42
4	20
1	8
0	4

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze (LOD) des **Demeditec Erdnuss Tests** beträgt 0,08 ppm bezogen auf die Standardkurve.

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

Kekse	0,06
Eiscreme	0,25
Schokolade	0,24
Cornflakes	0,25
Hazelnuss	0,14

Die untere Bestimmungsgrenze (LOQ) des **Demeditec Erdnuss Tests** beträgt 1 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	Gartenkresse	Knoblauch, granuliert	Pecannuss	Senf
Apfel	Gerste	Kokosnuss	Pfeffer, schwarz	Sesam
Aprikose	Gliadin	Kümmel	Pfirsich	Shrimps
Bockshornklee	Guakernmehl	Kürbiskern	Pinienkern	Soja-Lecithin
Bohne, weiß	Hafer	Lamm	Pistazie	Sojamehl
Buchweizen	Haselnuss	Leinsamen	Porree	Sonnenblumenkern
Cashew	Huhn	Linse	Pute	Thymian
Chia	Ingwer, frisch	Lupine	Raps	Tofu
Chili	Ingwer, gemahlen	Macadamia	Reis	Tomate
Cumin	Johannisbrotkernmehl	Mais	Rettich	Vollei
Curcuma	Kardamom	Mandel	Rindergelatine	Vollmilch
Dill	Karotte	Marone	Rindfleisch, gekocht	Walnuss
Ente	Kartoffel	Meerrettich	Rindfleisch, roh	Weißkohl
Erbse	Kichererbse	Milchpulver	Roggen	Weizenkörner
Fenchel	Kidneybohne	Mohn	Saccharose	Ziegenmilch
Fisch / Dorsch	Kirsche	Muskatnuss	Schälerbse	Zimt
Garnele, gekocht	Kiwi	Paprika	Schweinefleisch	Zwiebel
Garnele, roh	Knoblauch, frisch	Paranuss	Sellerie	

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:

Bockshornklee	Johannisbrotkernmehl	Linse
Mandel	Pecannuss	Sojamehl

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Cayenne	0,0012%
Gummi arabicum	0,0006%
Kakao	0,0002%
Nelke	0,0001%

Bei Verwendung des Extraktionsadditivs konnte keine Kreuzreaktion von Kakao detektiert werden.

Präzision

Intra-Assay Präzision	7 – 10%
Inter-Assay Präzision	2 – 11%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Kekse, Cerealien, Eiscreme, Schokolade) ergab Verdünnungslinearitäten von 85 – 115%.

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Kekse	97%
Cerealien	102%
Eiscreme	93%
Schokolade	96%
Haselnuss	96%

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