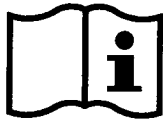


# Product information

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



## User's Manual

# Crustaceans (Tropomyosin) ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Crustacean Tropomyosin in food



DECRUE01



96

Sensitivity	0.9 ppb
Recovery	84-97 %
Incubation Time	60 min

## 1. GENERAL INFORMATION

Not only by reason of their cross-reactivity to house dust mites crustaceans represent an important group of food allergens. In this regard tropomyosin, which can be found in all common crustacean species, is the most important protein. In cooked crustacean extracts this protein represents approximately 20% of total protein.

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

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

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

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

## 3. PRECAUTIONS

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

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

## 4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

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

## 5. REAGENTS

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

1. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-tropomyosin antibodies.
2. Tropomyosin Standards (0; 20; 60; 200; 400 ppb of tropomyosin): 5 vials with 1.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. Conjugate (anti-tropomyosin-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL, ready-to-use.
6. 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. 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. Plastic bag to store unused microtiter strips.
9. 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)

### Reagents

- double distilled water

## 7. SAMPLE PREPARATION

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

The following sample preparation should be applied for solid samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample drawing, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 20 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at **40°C**. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at 2000 g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. 100 µL of particle-free solution are applied per well. If the results of a sample are out of the measuring range, further dilution with the **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer is necessary. The additional dilution has to be considered when calculating the concentration.

The following sample preparation should be applied for liquid samples:

1 mL of liquid sample is diluted in 19 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at **40°C**. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

## 8. PROCEDURE

The washing solution is supplied as 10x concentrate and has to be **diluted** 1+9 with double distilled water before use. In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and once after the samples. For final interpretation the arithmetic mean is used for calculation. In consideration of GLP and quality control requirements a duplicate measurement of samples is recommended.

The procedure is according to the following scheme:

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL **ready-to-use** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-tropomyosin-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (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 ppb on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of tropomyosin in ppb from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

The determined amount of tropomyosin [ppb] can be used to calculate the amount of the corresponding crustacean raw product (dry weight). Therefore the amount of tropomyosin has to be multiplied with a conversion factor (F).

The following conversion factors were determined by validation experiments:

Black tiger prawns, raw	60
Black tiger prawns, cooked	260
Lobster, raw	290
Lobster, cooked	270
Crawfish, raw	50
Crawfish, cooked	490
Spiny lobster, raw	8620
Spiny lobster, cooked	210
Shrimp, raw	70
Shrimp, cooked	70
Crab, blanched	230
Crab, cooked	520

## 10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 400 ppb standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Tropomyosin (ppb)	% binding of 400 ppb
400	100
200	64
60	22
20	9
0	3

## 11. PERFORMANCE

### Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Crustaceans (Tropomyosin) test** is 0.9 ppb (Tropomyosin, penaeus indicus).

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

Soy sauce	1.7
Vegetable soup	3.6
Bakery products	0.9
Fish	8.5
Meat	10.3

The limit of quantification (LOQ) of the Tropomyosin test is 20 ppb.

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

### Precision

Intra-assay Precision	6-8 %
Inter-assay Precision	5-12 %

### Recovery

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

Soy sauce	84 %
Vegetable soup	93 %
Bakery products	90 %
Fish	93 %
Meat	97 %

### Linearity

The serial dilution of spiked samples (soy sauce, vegetable soup, bakery products, fish, meat) resulted in dilution linearity of 74-114 %.

### Cross reactivity

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

Milk	Fish	Macadamia nut
Egg	Oyster	Chestnut
Wheat	Sunflower seeds	Pine nut
Rye	Pumpkin seeds	Soy
Oats	Cashew	Lecithin (soy)
Barley	Peanut	Pea
Rice	Hazelnut	Bean
Corn	Almond	Potato
Buckwheat	Pecan	Carrot
Sesame	Coconut	Leek
Pork meat	Brazil nut	Celery
Beef	Walnut	
Chicken meat	Pistachio	

## 12. REFERENCES

1. Fuller H, et al. (2006) – An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food and Agric Immun*, 17(1):43-52
2. Niamnuy C, et al. (2007) – Changes in protein compositions and their effects on physical changes of shrimps during boiling in salt solution. *Food Chem*, 108(1):165-175
3. Marianne T, et al. (2007) – Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in food. *J Agric Food Chem*, 55(20):8025-8032
4. Jeung BJ, et al. (1997) – Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J All Clin Immunol*, 100(2):229-234
5. Seiki K, et al. (2007) – A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *J Agric Food Chem*, 55(23):9345-9350
6. Reese G, et al. (2006) – Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of brown shrimp, *penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy*, 36(4):517-24
7. Walter M (2008) – *Krebstiere (Crustaceae) – Biologie, Vorkommen, Haltung und Erkrankungen, sowie ihre Bedeutung als Zootierobjekte und Lebensmittelressourcen – eine Literaturstudie*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany
8. Ayuso R, et al. (2002) – Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch allergy Immunol*, 127(1):27-37

Empfindlichkeit	0,9 ppb
Wiederfindung	84-97 %
Inkubationszeit	60 min

## 1. ALLGEMEINES

Nicht zuletzt aufgrund hoher Kreuzreaktivität zu Hausstaubmilben stellen Krustentiere eine bedeutende Gruppe von Nahrungsmittelallergenen dar. Das nach heutigem Kenntnisstand wohl bedeutendste Protein ist dabei das Spezies-übergreifende Muskelprotein Tropomyosin. Dieses Leitprotein stellt ca. 20% des Gesamtproteins gekochter Krustentier-Extrakte dar.

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

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

## 2. TESTPRINZIP

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

## 3. VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

#### 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

#### 5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Tropomyosin-bindenden Antikörpern.
2. Tropomyosin Standards: 5 Fläschchen mit je 1,0 mL (0, 20, 60, 200, 400 ppb Tropomyosin), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. Konjugat (anti-Tropomyosin-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Extraktions- und Proben-Verdünnungspuffer (TRIS), 2 x 120 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. 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. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
9. Arbeitsanleitung.

#### 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

##### Geräte

- 100 - 1000 µL Mikropipetten
- Messkolben
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

##### Reagenzien

- bidestilliertes Wasser



## 7. PROBENVORBEREITUNG

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

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle Arten von Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, einer Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchgemischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 20 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wird die Suspension für 15 min in einem vorgeheizten Wasserbad bei **40 °C** inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.
3. Die Proben werden bei mindestens 2000 g für 10 min zentrifugiert. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Für den Test werden pro Kavität 100 µL partikelfreie Lösung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für flüssige Proben angewandt werden:

1 mL flüssige Probe wird in 19 mL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. Anschließend wird die Suspension für 15 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad bei **40 °C** inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wird mit Punkt 3 der Feststoff-Extraktion fortgefahren.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

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

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

Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen.

Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Tropomyosin-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (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 ppb (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppb für Tropomyosin abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Tropomyosin-Gehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Tropomyosin-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

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

Die folgenden Umrechnungsfaktoren wurden anhand von Validierungsversuchen ermittelt:

Black Tiger Prawns, roh	60
Black Tiger Prawns, gekocht	260
Hummer, roh	290
Hummer, gekocht	270
Flußkrebs, roh	50
Flußkrebs, gekocht	490
Languste, roh	8620
Languste, gekocht	210
Shrimp, roh	70
Shrimp, gekocht	70
Krabbe, blanchiert	230
Krabbe, gekocht	520

## 10. TYPISCHE STANDARDKURVE

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

Tropomyosin (ppb)	OD % von 400 ppb
400	100
200	64
60	22
20	9
0	3

**11. TECHNISCHE DATEN****Empfindlichkeit**

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Krustentiere** (Tropomyosin) **Tests** beträgt 0,9 ppb (Tropomyosin, Penaeus indicus).

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

Sojasauce	1,7
Gemüsesuppe	3,6
Backwaren	0,9
Fisch	8,5
Fleisch	10,3

Die untere Bestimmungsgrenze des **Krustentiere** (Tropomyosin) **Tests** beträgt 20 ppb.

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

**Präzision**

Intra-Assay Präzision	6-8 %
Inter-Assay Präzision	5-12 %

**Wiederfindung**

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Soja-Sauce	84 %
Suppe	93 %
Backwaren	90 %
Fisch	93 %
Fleisch	97 %

**Linearität**

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben (Soja-Sauce, Gemüsesuppe, Backwaren, Fisch, Fleisch) über fünf Stufen ergab Verdünnungslinearitäten von 74 -114 %.

**Spezifität**











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

Milch	Fisch	Macadamianuss
Ei	Auster	Marone
Weizen	Sonnenblumenk.	Pinienkern
Roggen	Kürbiskerne	Soja
Hafer	Cashewnuss	Soja-Lecithin
Gerste	Erdnuss	Erbse
Reis	Haselnuss	Bohne
Mais	Mandel	Kartoffel
Buchweizen	Pecannuss	Karotte
Sesam	Kokosnuss	Lauch
Schweinefleisch	Paranuss	Sellerie
Rindfleisch	Walnuss	
Huhn	Pistazie	

**12. LITERATUR**

1. Fuller H, et al. (2006) – An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food and Agric Immun*, 17(1):43-52
2. Niamnuy C, et al. (2007) – Changes in protein compositions and their effects on physical changes of shrimps during boiling in salt solution. *Food Chem*, 108(1):165-175
3. Marianne T, et al. (2007) – Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in food. *J Agric Food Chem*, 55(20):8025-8032
4. Jeoung BJ, et al. (1997) – Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J All Clin Immunol*, 100(2):229-234
5. Seiki K, et al. (2007) – A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *J Agric Food Chem*, 55(23):9345-9350
6. Reese G, et al. (2006) – Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of brown shrimp, *penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy*, 36(4):517-24
7. Walter M (2008) – *Krebstiere (Crustaceae) – Biologie, Vorkommen, Haltung und Erkrankungen, sowie ihre Bedeutung als Zootierobjekte und Lebensmittelressourcen – eine Literaturstudie*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany
8. Ayuso R, et al. (2002) – Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch allergy Immunol*, 127(1):27-37
9. Lopata AL, et al. (2010) – Shellfish allergy. *Clin Exp Allergy*, 40(6):850-858
10. Carnés, et al. (2007) – The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals. *Annals of All*, 98(4):349-354

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostique in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	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
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità