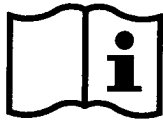


# Product information

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



## User's Manual

# Milk ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of bovine milk protein in food

**REF**

DEMILE01



96

Sensitivity (milk protein):	0.05 ppm
Recovery:	79 - 122 %
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.  $\beta$ -Lactoglobulin, the major allergen of whey, represents further 10 % of the total protein

The **Milk ELISA** represents a highly sensitive detection system for milk proteins based on NIST 1549 reference material. The test is likewise capable of the quantification of casein and  $\beta$ -lactoglobulin residues in food and is validated for cookies, bread crumbs, sausage, orange juice, wine, soy products and chocolate.

## 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Milk** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody mixture is bound on the surface of a microtiter plate. Milk protein 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 mixture directed against milk 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 milk proteins 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 found on the labels of the bottles and the outer package.

1. Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with milk protein binding antibodies.
2. Milk protein Standards, based on NIST RM 1549 reference material: 5 vials with 1.0 mL (0, 0.4, 1, 4, 10 ppm of milk protein), as 100x concentrate, dyed blue. 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. Conjugate (anti-milk protein-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 (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. 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

- 10, 100 - 1000 µL micropipets
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)

### 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 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 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:

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 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 **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 µL 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 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 absorbances.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-milk protein-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 **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 milk protein 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 milk protein concentration has to be multiplied with a product specific conversion factor (F).

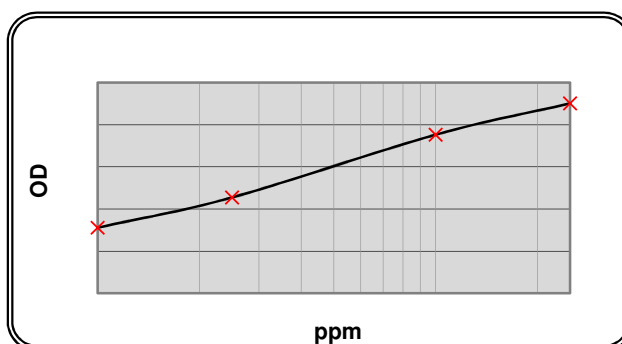
The following conversion factors have been determined by means of validation experiments:

Non fat milk powder (NIST RM1549)	2.7
Whole milk powder (NIST RM8435)	4.4
Caseinate	1.0
$\beta$ -Lactoglobulin	1.1

### 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 10 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.

Milk protein (ppm)	% binding of 10 ppm
10	100
6	86
1	50
0.4	32
0	9



## 10. PERFORMANCE

### Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Milk** test is 0.05 ppm of milk protein.

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

Soy milk	0.13
Orange juice	0.10
White wine	0.03
Bread crumbs	0.08
Cookies	0.16
Chocolate	0.10
Sausage	0.18

The limit of quantification (LOQ) of the **Milk** test is 0.4 ppm of milk protein.

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

### Specificity

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

Egg	Sesame	Almond
Wheat	Mustard	Cocoa
Rye	Lupin	Beef
Barley	Celery	Pork
Oats	Peanut	Chicken
Rice	Hazelnut	Cod
Corn	Pistachio	
Soy	Walnut	

The following cross-reactions were determined:

Ewe's milk	0.94 %
Goat's milk	0.01 %

### Precision

The following precisions based on concentrations were determined:

Intra-assay Precision	8 – 10 %
Inter-assay Precision	10 – 17 %

### 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 80 – 130 %.

### Recovery

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

Cookies	102 %
Bread crumbs	110 %
Chocolate	99 %
Sausage	88 %
Soy milk	79 %
Orange juice	106 %
White wine	122 %

## 11. REFERENCES

1. De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin. *J of Food Protection*, 70(7):1691-97
2. Restani P, et al. (1999) – Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin Exp Allergy*,29(7):997-1004
3. Mäkinen-Kiljunen S, et al. (1992) – A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin. *Allergy*, 47(4):347-52
4. Hefle SL, et al. (2004) – Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail milk-allergic complaint foods. *J Food Prot*, 67(9):1933-38
5. Patrick W, et al. (2009) – Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-Page, Western blot and immunostaining. *J Agric Food Chem*, 57(18):8399-405
6. Watanabe H et al. (2005) - Study on detection of allergenic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. *Sho Eis Zas*, 46(4):139-47
7. Downs ML, Taylor SL (2010) – Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *J Agric Food Chem*, 58(18):10085-91
8. De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin: influence of heat treatment on  $\beta$ -lactoglobulin immunoreactivity. *J Food Prot*, 70(7):1691-7
9. Abbott M, et al. (2010) – Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int*, 93(2):442-50
10. Levin ME, et al. (2005) – Anaphylaxis in a milk-allergic child after ingestion of soy formula cross contaminated with cow's milk protein. *Pediatrics*, 116(5):1223-5

---

Empfindlichkeit (Milchprotein)	0,05 ppm
Wiederfindung	79 – 122 %
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.  $\beta$ -Lactoglobulin, das Majorallergen der Molke, stellt weitere 10% des Gesamtproteins dar.

Der **Milch Test** stellt ein hochempfindliches Nachweissystem für Milchproteine, basierend auf NIST RM 1549 Standardmaterial, dar. Der Test ist gleichermaßen zur Quantifizierung von Caseinen und  $\beta$  Lactoglobulin in Nahrungsmitteln geeignet und wurde für Kekse, Panade, Wurst, Orangensaft, Wein, Sojaprodukte und Schokolade validiert.

## 2. TESTPRINZIP

Der **Milch Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Milchprotein gerichtetes Antikörpergemisch ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf werden die Milchprotein enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörpern und Milchprotein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markiertes, gegen Milchprotein gerichtetes zweites Antikörpergemisch 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 Milchprotein-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. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Milchprotein-bindenden Antikörpern.
2. Milchprotein Standards, basierend auf NIST RM 1549: 5 Fläschchen mit je 1,0 mL (0; 0,4; 1; 4; 10 ppm Milchprotein), als 100x-Konzentrat, blau 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. Konjugat (anti-Milchprotein-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 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. 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

- 10, 100, 1000 µL Mikropipetten
- 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. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vor-extrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für Feststoff-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 2500 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. 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 **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-Milchprotein-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 **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 Milchprotein abgelesen. **Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Milchprotein-Gehalt der Probe, die Probenverdünnung ist bereits berücksichtigt.** Sollte der Extrakt aufgrund Fleisch-haltiger Proben oder eines zu hohen Milchprotein-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

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

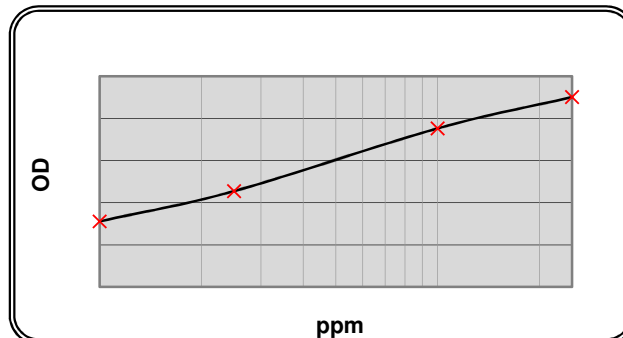
Die folgenden Umrechnungsfaktoren wurden anhand von Validierungsversuchen ermittelt:

Magermilchpulver (NIST RM1549)	2,7
Vollmilchpulver (NIST RM8435)	4,4
Caseinat	1,0
β-Lactoglobulin	1,1

## 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.

Milchprotein (ppm)	OD-% von 10 ppm
10	100
4	86
1	50
0,4	32
0	9



## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Milch Tests** beträgt 0,05 ppm Milchprotein.

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

Sojamilch	0,13
Orangensaft	0,10
Weißwein	0,03
Panade	0,08
Keks	0,16
Schokolade	0,10
Wurst	0,18

Die untere Bestimmungsgrenze des **Milch Tests** beträgt 0,4 ppm Milchprotein.

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

### Spezifität

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

Ei	Sesam	Mandel
Weizen	Senf	Kakao
Roggen	Lupine	Rind
Gerste	Sellerie	Schwein
Hafer	Erdnuss	Huhn
Reis	Haselnuss	Dorsch
Mais	Pistazie	
Soja	Walnuss	

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Schafsmilch	0,94 %
Ziegenmilch	0,01 %

### Präzision

Folgende Präzisionen, bezogen auf die Konzentration, wurden ermittelt:

Intra-Assay Präzision	8 – 10 %
Inter-Assay Präzision	10 – 17 %

### Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Kekse, Panade, Schokolade, Wurst, Sojamilch, Orangensaft und Weißwein) ergab Verdünnungslinearitäten von 80 – 130 %.

### Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Keks	102 %
Panade	110 %
Schokolade	99 %
Wurst	88 %
Sojamilch	79 %
Orangensaft	106 %
Weißwein	122 %




## 12. LITERATUR

1. De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin. *J of Food Protection*, 70(7):1691-97
2. Restani P, et al. (1999) – Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin Exp Allergy*,29(7):997-1004
3. Mäkinen-Kiljunen S, et al. (1992) – A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin. *Allergy*, 47(4):347-52
4. Hefle SL, et al. (2004) – Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail milk-allergic complaint foods. *J Food Prot*, 67(9):1933-38
5. Patrick W, et al. (2009) – Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-Page, Western blot and immunostaining. *J Agric Food Chem*, 57(18):8399-405
6. Watanabe H et al. (2005) - Study on detection of allergenic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. *Sho Eis Zas*, 46(4):139-47
7. Downs ML, Taylor SL (2010) – Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *J Agric Food Chem*, 58(18):10085-91
8. De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin: influence of heat treatment on  $\beta$ -lactoglobulin immunoreactivity. *J Food Prot*, 70(7):1691-7
9. Abbott M, et al. (2010) – Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int*, 93(2):442-50
10. Levin ME, et al. (2005) – Anaphylaxis in a milk-allergic child after ingestion of soy formula cross contaminated with cow's milk protein. *Pediatrics*, 116(5):1223-5





## 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 Diagnostic 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