

Product information

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



Lysozyme ELISA

REF

DELYSE01



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..... | 6 |
| 11. PERFORMANCE..... | 6 |
| | |
| 1. ALLGEMEINES | 8 |
| 2. TESTPRINZIP | 8 |
| 3. VORSICHTSMAßNAHMEN | 8 |
| 4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN..... | 8 |
| 5. REAGENZIEN | 9 |
| 6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN | 9 |
| 7. PROBENVORBEREITUNG..... | 9 |
| 8. TESTDURCHFÜHRUNG | 10 |
| 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE..... | 10 |
| 10. TYPISCHE STANDARDKURVE | 11 |
| 11. TECHNISCHE DATEN | 11 |
| | |
| SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 12 |

| | |
|------------------------|----------|
| Sensitivity (Lysozyme) | 2/10 ppb |
| Recovery | 87 - 98% |
| Incubation Time | 60 min |

1. GENERAL INFORMATION

Hen's egg (*Gallus gallus*) is very rich of proteins and represents an important food source for humans. While proteins of egg yolk only have minor allergenicity, many proteins of egg white are known to be allergenic. In addition to ovalbumin, ovotransferrin, ovomucoid and livetin, lysozyme represents an important allergen. Primarily lysozyme is used as a preservative in wine and cheese industry. For allergic persons the consumption of lysozyme represents 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, lysozyme allergic persons must strictly avoid the consumption of lysozyme containing food. Non-declared addition of lysozyme in food is hazardous for allergic people. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process, is also problematic. Since July 1, 2012 the European Union requests allergen labeling for wine if milk or egg proteins are used during the production and are still present at a detection level of 0.25 mg/L or greater. Thus for the detection of lysozyme residues, sensitive assay systems are required.

The **Demeditec Lysozyme ELISA** represents a highly sensitive detection system for lysozyme and is particularly capable of the quantification of lysozyme residues in wine and cheese.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Lysozyme** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against lysozyme is bound on the surface of a microtiter plate. Lysozyme 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 lysozyme 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 lysozyme is directly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

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

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

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

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

5. REAGENTS

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

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-lysozyme antibodies.
2. **CAL 1 – 5** Lysozyme standards (0; 25; 50; 100; 250 ppb of lysozyme): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-lysozyme-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
- NaCl (if applicable)

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. 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 wine samples:

1. 1 ml of the wine sample is diluted in 19 mL of **pre-diluted** extraction buffer.
2. 100 µL of the wine 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 cheese and all other kinds of 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 10 mL of **pre-diluted** extraction buffer (in which 10 g / 100 mL NaCl is diluted prior to use). 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. Dilute 100 µL of supernatant in 900 µL **pre-diluted** extraction buffer (without NaCl).
5. 100 µL of this 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.

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 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-lysozyme-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 H_2SO_4) 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 wine sample concentrations. The dilution of wine samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure for wine samples is already considered. In case of using the extraction process for cheese or other samples than wine, the determined concentration **has to be multiplied by 5** in order to get the sample concentration. Additional dilution due to high sample concentration has also 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 lysozyme in ppb 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 250 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.

| Lysozyme (ppb) | % binding of 250 ppb |
|----------------|----------------------|
| 250 | 100 |
| 100 | 63 |
| 50 | 30 |
| 25 | 16 |
| 0 | 2 |

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Lysozyme test** is 2 ppb applying sample preparation method for wine and 10 ppb applying sample preparation method for other matrices.

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Lysozyme test** is 25 ppb applying sample preparation method for wine and 125 ppb applying sample preparation method for other matrices.

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

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:

| |
|-------------|
| Goat's milk |
|-------------|

The following cross-reactions were determined:

| | |
|--------------------------|-----------|
| Conalbumin | < 0.0001% |
| Egg white protein, total | 2.2% |
| Ovalbumin | < 0.0001% |
| Ovomucoid | < 0.0001% |

Precision

| | |
|-----------------------|--------|
| Intra-assay Precision | 2 - 6% |
| Inter-assay Precision | 2 - 3% |

Linearity

The serial dilution of spiked samples (white wine, red wine & cheese) resulted in a dilution linearity of 87% - 98%.

Recovery

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

| | |
|--------|-----|
| Wine | 98% |
| Cheese | 87% |

| | |
|---------------------------|----------|
| Empfindlichkeit (Lysozym) | 2/10 ppb |
| Wiederfindung | 87 - 98% |
| Inkubationszeit | 60 min |

1. ALLGEMEINES

Das Ei des Haushuhns (*Gallus gallus*) ist sehr proteinreich und stellt eine bedeutende Nahrungsquelle des Menschen dar. Während die Proteine des Eidotters nur begrenzte Allergenität aufweisen, sind viele Proteine des Eiklars als allergieauslösend bekannt. Neben Ovalbumin, Ovotransferrin, Ovomucoïd und Livetin stellt Lysozym ein bedeutendes Allergen dar. Lysozym wird vor allem in der Käse- und Weinindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt. Der Konsum von Lysozym stellt für Allergiker ein kritisches Problem dar. Schon sehr geringe Mengen des Allergens lösen allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock aus. Aus diesem Grund müssen Lysozym-Allergiker auf den Konsum von Lysozym-haltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Nicht deklarerter Zusatz von Lysozym in Lebensmitteln stellt für Allergiker eine Gefahr dar. Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln, sind ebenfalls problematisch. Seit 1. Juli 2012 verlangt die Europäische Union eine Kennzeichnung für Wein, wenn Milch- oder Ei-Protein im Produktionsprozess verwendet wurde und im Produkt ein Restgehalt von 0,25 mg/L oder höher nachweisbar ist. Um Spuren von Lysozym detektieren zu können, bedarf es somit sensitiver Nachweissysteme.

Der **Demeditec Lysozym ELISA** stellt ein hochsensibles Nachweissystem für Lysozym dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Lysozym-Rückständen in Wein und Käse geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Lysozym ELISA** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Lysozym gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Lysozym enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Lysozym statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Lysozym 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 Lysozym-Konzentration ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.

3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

5. REAGENZIEN

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

1. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Lysozym-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Lysozym-Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 25, 50, 100, 250 ppb Lysozym), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Lysozym-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 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. **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
- ggf. NaCl

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 Wein angewandt werden:

1. 1 mL Weinprobe wird in 19 mL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt.
2. Für den Test werden pro Kavität 100 µL der Wein-Lösung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Wein-Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für Käse und sonstige 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 1 g entnommen und in 10 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert, in welchem zuvor 10 g / 100 mL NaCl gelöst wurde. 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. 100 µL Überstand werden in 900 µL **verdünntem** Extraktionspuffer (ohne NaCl) verdünnt.
5. Für den Test werden pro Kavität 100 µL partikelfreie Verdünnung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Achtung:

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

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

Die **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-Lysozym-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 ppb (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppb für Lysozym abgelesen. Bei Anwendung der Probenvorbereitung für Wein beziehen sich die ermittelten Konzentrationen direkt auf den Lysozym-gehalt der eingesetzten Probe. Bei Anwendung der Probenvorbereitung für Käse und sonstige Produkte muss die ermittelte Konzentration noch mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um die Konzentration der Probe zu erhalten. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Proteingehalts-Gehalts 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.

| Lysozym (ppb) | OD-% von 250 ppb |
|---------------|------------------|
| 250 | 100 |
| 100 | 63 |
| 50 | 30 |
| 25 | 16 |
| 0 | 2 |

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Lysozym Tests** beträgt 2 ppb bei Anwendung der Probenextraktion für Wein und 10 ppb bei Anwendung der Probenextraktion für sonstige Proben. Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec Lysozym Tests** beträgt 25 ppb bei Anwendung der Probenextraktion für Wein und 125 ppb bei Anwendung der Probenextraktion für sonstige Proben. 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 | Kardamom | Pistazie |
| Aprikose | Karotte | Porree |
| Bockshornklee | Kartoffel | Pute |
| Bohne, weiß | Kichererbse | Raps |
| Buchweizen | Kidneybohne | Reis |
| Cashew | Kirsche | Rettich |
| Cayennepfeffer | Kiwi | Rindfleisch, roh |
| Chia-Samen | Knoblauch, frisch | Rindfleisch, gekocht |
| Chili | Knoblauch, granuliert | Roggen |
| Cumin | Kokosnuss | Saccharose |
| Dill | Kümmel | Schafsmilch |
| Ente | Kürbiskern | Schälerbse |
| Erbse | Kurkuma | Schweinefleisch |
| Erdnuss | Lamm | Sellerie |
| Fenchel (Tee) | Leinsamen | Senf |
| Fisch / Dorsch | Linse | Sesam |
| Garnele, roh | Lupine | Shrimps |
| Garnele, gekocht | Macadamia | Soja-Lectithin |
| Gartenkresse | Maismehl | Sojamehl |
| Gelatine | Mandel | Sonnenblumenkern |
| Gerste | Marone | Thymian |
| Gliadin | Meerrettich | Tofu |
| Guakernmehl | Mohn | Tomate |
| Gummi arabicum | Muskatnuss | Vollmilch |
| Hafer | Nelke | Walnuss |
| Haselnuss | Paprika | Weißkohl |
| Huhn | Paranuss | Weizen |
| Ingwer, frisch | Pecannuss | Ziegenmilch |
| Ingwer, gemahlen | Pfeffer, schwarz | Zimt |
| Johannisbrotkernmehl | Pfirsich | Zwiebel |
| Kakao | Pinienkern | |

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:

Ziegenmilch

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

| | |
|-----------------------|-----------|
| Conalbumin | < 0.0001% |
| Eiklarprotein, gesamt | 2.2% |
| Ovalbumin | < 0.0001% |
| Ovomucoid | < 0.0001% |

Präzision

| | |
|-----------------------|--------|
| Intra-Assay Präzision | 2 - 6% |
| Inter-Assay Präzision | 2 - 3% |

Linearität














Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über vier Stufen (Weißwein, Rotwein & Käse) ergab mittlere Verdünnungslinearitäten von 87 - 98%.

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

| | |
|------|-----|
| Wein | 98% |
| Käse | 87% |

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 |