

# Product information

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



# Milk ELISA

**REF**

**DEMILE01**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://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 .....	5
8. PROCEDURE .....	6
9. CALCULATION OF RESULTS .....	6
10. PERFORMANCE .....	7
1. ALLGEMEINES .....	9
2. TESTPRINZIP .....	9
3. VORSICHTSMAßNAHMEN .....	9
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN .....	9
5. REAGENZIEN .....	10
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN .....	10
7. PROBENVORBEREITUNG .....	11
8. TESTDURCHFÜHRUNG .....	12
9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	12
10. TYPISCHE STANDARDKURVE .....	13
11. TECHNISCHE DATEN .....	13
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	16

Sensitivity (milk protein):	0.01 - 0.24 ppm
Recovery:	91 - 109 %
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 1549a reference material. The test is likewise capable of the quantification of casein and  $\beta$ -lactoglobulin residues in food and is validated for almond milk, soy milk, oat milk, coconut milk, cookies, sausages and meat, chocolate, orange juice, spices, sweets and wine

## 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. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with milk protein binding antibodies.
2. **CAL 1 – 5 100x** Milk protein Standards, based on NIST RM 1549a reference material: 5 vials with 2.0 mL (0, 0.4, 1, 4, 10 ppm of milk protein), as 100x concentrate, dyed brownish. 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. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-milk protein-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 5x** 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. **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

- 10, 100 - 1000 µL micropipets
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Plastic bag to store unused microtiter strips

### Reagents

- Double distilled water
- Extraction additive (DEEXSCH2), optional, can be ordered separately

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

The following sample preparation should be applied for all solid food 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 or higher. 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 food 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 pre-heated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

The following variation should be applied for polyphenol containing food samples like chocolate and spices:

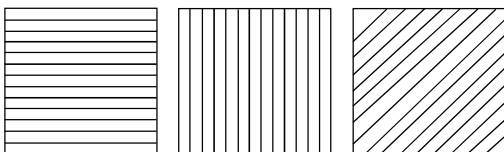
Add 1 g of extraction additive to 0.5 g/0.5 mL of sample before adding the **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer and continue the extraction process as stated above.

The following sample preparation should be applied for rinse water samples:

1. Adjust the pH of the sample to 9.5 (+/- 0.2)
2. 1 mL of liquid sample is diluted in 4 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. The process is continued at point 4 of solid food sample extraction process.

The following sample preparation should be applied for swab samples on dry surfaces:

1. Mark out 5x5 cm area or use swab directly on (e.g. uneven) area.
2. Moisten the swab in 1 mL **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer previously applied in a test tube.
3. Swab marked area by using crosshatch (1. horizontally, 2. vertically, 3. diagonally) technique while rotating the tip.



4. Place swab into the test tube.
5. Shake the test tube for 1 minute to release the sample from the swab. The process is continued at point 4 of solid food sample extraction process.

For wet surfaces exactly the same procedure is applied without prior need to moisten the swab.

## 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 following evaluation procedure should be applied for all **food samples** prepared by the procedure as stated *Sample Preparation*:

The pre-diluted standards are prepared for a direct determination of food sample concentrations. The dilution (1:20) of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered. Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

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

The following evaluation procedure should be applied for **rinse water samples** prepared according the procedure stated Sample Preparation:

1. Apply the evaluation procedure food samples as stated above.
2. Divide the result by 4 in order to compensate the different dilution factor of the extraction procedure to receive the sample concentration in mg/L.

The following evaluation procedure should be applied for **swab samples** prepared according the procedure stated in Sample Preparation:

1. Apply the evaluation procedure food samples as stated above.

2. Multiply the result (ppm) by 2 in order to compensate the different dilution factor of the extraction procedure to receive the sample concentration in ng/cm<sup>2</sup>.

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)	3.6
Non fat milk powder (MoniQA 092014)	3.3
Whole milk powder (NIST RM1549a)	4.8
Total milk	33
Yoghurt	31
Curd	19
Caseinate	1.0
Beta lactoglobulin	1.0

### 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	71
1	33
0.4	21
0	10

## 10. PERFORMANCE

### Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Milk** test is 0.21 ppm of milk protein related to the standard curve.

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

Almond milk	0.08
Soy milk	0.12
Oat milk	0.12
Coconut milk	0.04
Cookies	0.13
Sausage / meat	0.18
Chocolate	0.05
Orange juice	0.09
Spices	0.13
Sweets	0.09
Wine	0.07

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

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".

**Precision**

Intra-Assay Precision	6.9%
Inter-Assay Precision	5.7%
Inter-Extraction Precision	6.5%

**Linearity**

The serial dilution of spiked samples (almond milk, soy milk, oat milk, coconut milk, sausage / meat, chocolate, orange juice, spices, sweets and wine) resulted in a dilution linearity of 92- 108%.

**Specificity**

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

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

The following cross-reactions were determined:

Ewe's milk	0.25 %
Goat's milk	0.30 %

**Recovery**

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

Almond milk	101%
Soy milk	94%
Oat milk	99%
Coconut milk	107%
Cookies	99%
Sausage / meat	101%
Chocolate	100%
Orange juice	100%
Spices	92%
Sweets	102%
Wine	101%



---

Empfindlichkeit (Milchprotein)	0,01 - 0.24 ppm
Wiederfindung	91 - 109 %
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 hochsensibles Nachweissystem für Milchproteine, basierend auf NIST RM 1549a Standardmaterial, dar. Der Test ist gleichermaßen zur Quantifizierung von Caseinen und  $\beta$ -Lactoglobulin in Nahrungsmitteln geeignet und wurde für Mandelmilch, Sojamilch, Hafermilch, Kokosnussmilch, Kekse, Wurst und Fleisch, Schokolade, Orangensaft, Gewürze, Süßigkeiten und Wein 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. **SORB** **MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Milchprotein-bindenden Antikörpern.
2. **CAL** **1** - **5** **100x** Milchprotein Standards, basierend auf NIST 1549a Referenzmaterial: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0; 0,4; 1; 4; 10 ppm Milchprotein), als 100x-Konzentrat, bräunlich 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. **ENZ** **CONJ** Konjugat (anti-Milchprotein-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB** **TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP** **SOLN** Stopp-Lösung (1 N saure Lösung), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM** **DIL** **5x** Extraktions- und Probenverdünnungspuffer (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. **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

- 10, 100, 1000 µL Mikropipetten
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

### Reagenzien

- bidestilliertes Wasser
- Extraktionsadditiv (DEEXSCH2), optional, kann separat bestellt werden

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

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle Arten von festen Nahrungsmittelproben 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 0,5 g entnommen und in 10 mL **verdünntem** Extraktions- und Verdünnungspuffer 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 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** Extraktions- und Verdünnungspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für flüssige Nahrungsmittelproben angewandt werden:

0,5 mL flüssige Probe wird in 9,5 mL **verdünntem** Extraktions- und Verdünnungspuffer 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 Probenvorbereitung für feste Nahrungsmittelproben fortgefahren.

Folgende Abweichung sollte für polyphenolhaltige Proben wie Schokolade oder Gewürze angewandt werden:

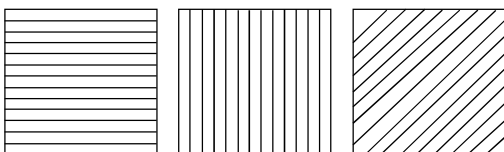
1 g Extraktionsadditiv werden zu 0,5 g/0,5 mL Probe gegeben bevor der **verdünnter** Extraktions- und Verdünnungspuffer hinzugefügt wird. Dann wird der Extraktionsprozess wie oben beschrieben fortgesetzt.

Folgende Probenvorbereitung sollte für CIP-Spül-wasser angewandt werden:

1. Der pH-Wert wird auf pH 9,5 (+/- 0,2) eingestellt.
2. 1 mL der Probe werden mit 4 mL **verdünntem** Extraktions- und Verdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wird mit Punkt 4 der Probenvorbereitung für feste Nahrungsmittelproben fortgefahren.

Folgende Probenvorbereitung sollte für Abstrichproben angewandt werden:

1. Es wird ein Bereich von 5x5 cm markiert oder eine adäquate Fläche (bei unebenen Bereichen) abgestrichen
2. 1 mL **verdünnter** Extraktions- und Verdünnungspuffer wird in ein Teströhrchen pipettiert und anschließend der Abstrich-Tupfer durch Eintauchen befeuchtet.
3. Die Fläche wird kreuzweise (1. horizontal, 2. vertikal, 3. diagonal) abgestrichen. Dabei wird der Abstrich-Tupfer gedreht.



4. Der Abstrich-Tupfer wird wieder in das Teströhrchen gesteckt.

Das Test-Röhrchen wird 1 min geschüttelt, um die Probe aus dem Abstrich-Tupfer zu lösen. Anschließend wird mit Punkt 4 der Probenvorbereitung für feste Nahrungsmittelproben fortgefahren.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bi-distilliertem 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 geringeren 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

Die folgende Prozedur sollte zur Auswertung von allen Nahrungsmittelproben, die, wie in der Probenvorbereitung beschrieben, hergestellt wurden, angewandt werden:

Die vorverdünnten Standards sind für eine direkte Bestimmung von Nahrungsmittelproben vorbereitet. Die Verdünnung (1:20) der Proben, wie oben im Extraktionsprozess beschrieben, ist bereits berücksichtigt. Zusätzliche Probenverdünnung aufgrund zu hoher Probenkonzentration muss berücksichtigt werden.

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion (OD 450) 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 Milch abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Milchgehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Milchgehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Die folgende Prozedur sollte zur Auswertung von CIP-Spülwasser-Proben, die, wie in der Probenvorbereitung beschrieben, hergestellt wurden, angewandt werden:

1. Es wird die Auswerteprozedur für Nahrungsmittelproben angewandt.
2. Das Ergebnis wird anschließend durch 4 geteilt, um die unterschiedlichen Probenverdünnungsfaktoren zu kompensieren und das Ergebnis in mg/L zu erhalten.

Die folgende Prozedur sollte zur Auswertung von Abstrich-Proben, die, wie in der Probenvorbereitung beschrieben, hergestellt wurden, angewandt werden:

1. Es wird die Auswerteprozedur für Nahrungsmittel-proben angewandt.
2. Das Ergebnis (ppm) wird anschließend mit 2 multipliziert, um den unterschiedlichen Probeverdünnungsfaktor zu kompensieren und das Ergebnis in ng/cm<sup>2</sup> zu erhalten. 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)	3,6
Magermilchpulver (MoniQA 092014)	3,3
Vollmilchpulver (NIST RM1549a)	4,8
Vollmilch	33
Joghurt	31
Quark	19
Caseinat	1,0
Beta lactoglobulin	1,0

## 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	71
1	33
0,4	21
0	10

## 11. TECHNISCHE DATEN

### Empfindlichkeit

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

Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden mittleren unteren Nachweisgrenzen (LOD) [ppm].

Mandelmilch	0,08
Sojamilch	0,12
Hafermilch	0,12
Kokosnussmilch	0,04
Kekse	0,13
Wurst / Fleisch	0,18
Schokolade	0,05
Orangensaft	0,09
Gewürze	0,13
Süßigkeiten	0,09
Wein	0,07

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

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.

**Präzision**

Intra-Assay Präzision	6,9%
Inter-Assay Präzision	5,7%
Inter-Extraktion Präzision	6,5%

**Linearität**

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben (Mandelmilch, Sojamilch, Hafermilch, Kokosnussmilch, Wurst / Fleisch, Schokolade, Orangensaft, Gewürze, Süßigkeiten und Wein) ergab Verdünnungslinearitäten von 92 - 108%.

**Spezifität**

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

Adzukibohne	Gartenkresse	Kiwi	Muskatnuss	Sellerie
Aprikose	Gerste	Knoblauch, frisch	Nelke	Senf, gelb
Bockshornklee	Gliadin	Knoblauch, granuliert	Paprika	Sesam
Bohne, weiß	Guarkernmehl	Kokosnuss	Paranuss	Shrimps
Buchweizen	Gummi arabicum	Kümmel	Pekannuss	Soja Lecithin
Cashew	Hafer	Kürbiskern	Pfeffer, schwarz	Sojamehl
Cayenne	Haselnuss	Kurkuma	Pfirsich	Sonnenblumenkern
Chia	Huhn	Lamm	Pinienkern	Thymian
Chili	Ingwer, frisch	Lauch	Pistazie	Tofu
Cumin	Ingwer, gemahlen	Leinsamen	Rapssamen	Tomate
Dill	Johannisbrotkernmehl	Linse	Reis	Truthahn
Dorsch	Kakao	Lupine	Rettich	Walnuss
Ei, getrocknet	Kardamom	Macadamianuss	Rindergelatine	Weißkohl
Ente	Karotte	Mais	Rindfleisch	Weizen
Erbse	Kartoffel	Mandel	Roggen	Zimt
Erdnuss	Kichererbse	Marone	Saccharose	Zwiebel
Fenchel	Kidneybohne	Meerrettich	Schälerbse	
Garnele	Kirsche	Mohn	Schwein	

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Schafsmilch	0,25 %
Ziegenmilch	0,30 %














**Wiederfindung**

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand mit Milchprotein aufgestockter Proben bestimmt:

Mandelmilch	101%
Sojamilch	94%
Hafermilch	99%
Kokosnussmilch	107%
Kekse	99%
Wurst / Fleisch	101%
Schokolade	100%
Orangensaft	100%
Gewürze	92%
Süßigkeiten	102%
Wein	101%



## 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