



RIDASCREEN®FAST Hazelnut

REF R6802

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Haselnuss

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of hazelnut

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA®, RIDASCREEN® und RIDASOFT®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA®, RIDASCREEN® and RIDASOFT®
are registered trademarks of R-Biopharm AG.
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Hazelnut (Art. Nr. R6802) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss (bzw. Haselnussproteinen) in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck)

Der ELISA ist für feinherbe Schokolade durch das BVL validiert (§64 Methode LFGB).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Das Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit) 30 min
Standardmaterial:	Haselnussbrei mit einem Proteingehalt von 15 %.
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,17 - 0,22 mg/kg Haselnuss Mittelwert: 0,19 mg/kg Haselnuss bzw. 0,0285 mg/kg Haselnuss-Protein
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg Haselnuss
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch Haselnussproteine. Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Dotierversuche erkannt werden.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann

unter folgendem Link abgerufen, gedruckt oder gespeichert werden:
<https://food.r-biopharm.com/>.

Weitere Produkte für den Nachweis von Haselnuss

Bioavid Lateral Flow Haselnuss / Hazelnut (Art. Nr. BL604-10, BL604-25)
SureFood® PCR ALLERGEN Hazelnut (Art. Nr. S3602)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Hazelnut (R6802) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss bzw. Haselnussproteinen in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Eis, Zerealien, Butterkekse und verschiedene Gewürze. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender selbst zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrixen entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15.) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Die Haselnuss (*Corylus avellana*) ist eine der beliebtesten Baumnüsse weltweit. Im Allgemeinen werden Haselnüsse in einer Vielzahl von Lebensmittelindustrien verwendet. Haselnüsse sind sehr häufige Zutaten von Schokoladenprodukten und werden auch als Snacks und in Backwaren wie Keksen verzehrt. Sie werden auch als Zusatz für Dressings, Salate oder zur Verfeinerung von Fischgerichten verwendet. Die Haselnuss ist eines von acht Lebensmitteln, die die häufigste Ursache für Lebensmittelallergien sind. In Mitteleuropa sind mehr als 90% der Haselnussallergien mit einer Allergie gegen Baumpollen verbunden. Der Verzehr von einigen Milligramm Haselnuss kann bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Deshalb ist die Kennzeichnung von haselnusshaltigen Produkten sehr wichtig und in den USA und der Europäischen Union sowie in vielen anderen Ländern obligatorisch. Die Hauptbedrohung für sensibilisierte Personen ist die Kontamination von Lebensmitteln mit Haselnüssen (z. B. Haselnuss Spuren in Schokolade, die keine Haselnüsse enthalten sollte). Daher ist es wichtig, Lebensmittel, die während des Produktionsprozesses kontaminiert

worden sein könnten, auf das Vorhandensein von unbeabsichtigten Spuren von Haselnüssen zu testen.

Nach der **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Haselnüsse und deren Produkte auf Lebensmitteletiketten als Allergen deklariert werden. Ähnliche Regelungen gibt es z. B. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Haselnuss-Proteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Haselnuss-Protein an die spezifischen Fängerantikörper. Das Ergebnis ist ein Antikörper-Antigen-Komplex. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zum Haselnuss-Gehalt in der Probe.

Das Ergebnis wird in mg/kg Haselnuss angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Standard 1* Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 mg/kg	2,6 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	2,5 mg/kg	2,6 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	5,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	10,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	20,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

* Die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Haselnuss-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Laborhandschuhe
- Waage
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. 50 ml Centrifuge Tubes von Greiner, Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (60 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 µm)
- Messpipetten

- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific, Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one, Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8 Kanalpipette für 100 µl
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2. Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Magermilchpulver (Lebensmittelqualität) (MMP)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Die Wells der Platten (beschichtete Platte aus dem Kit, sowie gegebenenfalls zusätzliche Platte zum Vorpipettieren (siehe Kapitel 10.2.)) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich; deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Eine bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten.
- Eine Extinktion kleiner 1,2 ($E_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 5.

9. Probenvorbereitung

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich zu reinigen,
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Stellen Sie sicher, dass der verdünnte Allergen Extraktionspuffer (AEP) rechtzeitig im 60 °C Wasserbad erhitzt wird.

Der Allergen Extraktionspuffer liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vor der Verdünnung durch Erwärmen (Wasserbad 37 °C) zu lösen. Anschließend das Konzentrat gut mischen. Das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der **verdünnte Allergen Extraktionspuffer (AEP)** hat eine Haltbarkeit von ca. 4 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bzw. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Im Laufe der Extraktion muss der Probe Magermilchpulver (MMP) zugesetzt werden. Entweder wird das MMP dem verdünnten AEP zugesetzt oder der eingewogenen Probe.

Für ersteren Fall müssen 5 g Magermilchpulver (MMP) auf 100 ml verdünntem AEP zugesetzt werden (**MMP-AEP**). Es sollte immer nur so viel MMP-AEP

hergestellt werden, wie benötigt wird. Der MMP-Puffer sollte nur einmalig auf 60 °C erwärmt und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

In den folgenden Kapiteln werden für die unterschiedlich verwendeten Puffer folgende Abkürzungen verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer
- MMP-AEP: final verdünnter AEP mit Zusatz von Magermilchpulver (MMP)

9.1. Extraktion für alle Proben (hier: Zugabe von MMP zur eingewogenen Probe)

Den AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

- Eine ausreichend große Menge der Probe (5 - 50 g bzw. 5 - 50 ml) gut homogenisieren (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen)
- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und 1 g MMP hinzugeben
- Mit 20 ml (bzw. 19 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9.) versetzen
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer)
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- Probe im Eisbad kurz abkühlen lassen (3 - 5 min)
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren)
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren
- Die Probenextrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) sind in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C etwa 1 Tag haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einen Monat aufbewahrt werden.

9.2. Extraktion für alle Proben (hier: Nutzung des MMP-AEP)

Den MMP-AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

- Eine ausreichend große Menge der Probe (5 - 50 g bzw. 5 - 50 ml) gut homogenisieren (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen)

- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und mit 20 ml (bzw. 19 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten MMP-AEP (siehe Kapitel 9.) versetzen, das Gefäß verschließen
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer)
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- Probe im Eisbad kurz abkühlen lassen (3 - 5 min)
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren)
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren
- Die Probenextrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) sind in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C etwa 1 Tag haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einen Monat aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit dest. Wasser mischen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 20 - 25 °C.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

Pipettenspitzen sollten vor dem Pipettieren in die Platte jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorgespült werden.

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (siehe Kapitel 5.1.) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und hiervon dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zwei Mal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zwei Mal wiederholen.
6. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell durch leichtes Schütteln der Platte mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung kann mittels 4-Parameter- oder Cubic Spline-Funktion erfolgen. Eine einmal gewählte Auswertemethode sollte beibehalten und nicht zwischen den beiden Funktionen gewechselt werden. Aufgrund der verwendeten Mathematik kann die Cubic Spline Funktion keine Konzentrationsangaben zwischen Standard 1 und Standard 2 (LOQ) berechnen. Die 4-Parameter-Funktion ermöglicht auch die Berechnung von Werten zwischen Standard 1 und Standard 2.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf die Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) entnommen werden.

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 20. Da ein Probenverdünnungsfaktor von 20 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4.*), kann die Haselnuss-Konzentration in mg Haselnuss pro kg Lebensmittel direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Der Proteingehalt des verwendeten Haselnuss-Standardmaterials beträgt 15 %. Um die Haselnuss-Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, muss das Ergebnis deshalb mit 0,15 multipliziert werden.

12. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisse zwischen LOD und LOQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Mit der 4-Parameter-Funktion ermittelte Werte sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests in diesem Bereich aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ als „< LOQ“ oder als „positiv, aber < LOQ“ angegeben werden. Matrixabhängig können auch Proben, die den Analyten nicht enthalten, ein Ergebnis in diesem Bereich aufweisen.

Ein Ergebnis unterhalb des LOD schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Allergenkomponenten, wie z. B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können. Die Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend formuliert werden.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche

Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden. Für die zusätzliche Verdünnung sollte der MMP-AEP verwendet werden.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450\text{ nm}}$) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten laut Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Allergen-Kontamination hinweisen.

13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD, LOQ) sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht. Dies macht sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse im Falle von Wiederholungsuntersuchungen bemerkbar, so dass Ergebnisse sowohl unterhalb als auch oberhalb der charakteristischen Grenzen (LOD, LOQ, höchster Standard) gefunden werden.

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ± 1 % gegeben.

Detaillierte Ergebnisse sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen vorliegen.

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Warengruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven / erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte (ausgelöst z. B. durch Polyphenole) sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Durch die Zugabe von Fremdprotein (abhängig vom Test z. B. BSA, Gelatine, Magermilchpulver) während der Extraktion oder der Testdurchführung können Matrixeffekte gegebenenfalls unterdrückt werden.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden. Dies kann die Wiederfindung beeinträchtigen.

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln auch erst in Erscheinung treten oder aber verloren gehen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Lebensmittel wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im Validierungsbericht beschrieben.

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können in verschiedenen Haselnusssorten unterschiedlich sein. Verschiedene Haselnusssorten können daher unterschiedliche Ergebnisse liefern, da eine Kalibrierung des Tests gegen exemplarische Haselnusssorten vorgenommen wurde.

14. Empfehlung

Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, wie sie in den Normen EN 15633-1 und 15842 aufgeführt werden (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen), zu befolgen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.

- Zur Qualitätskontrolle und zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Haselnuss-freie und Haselnuss-haltige (natürlich kontaminierte oder dotierte) Proben zu verwenden. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben kann es notwendig sein, den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR (z. B. SureFood®) durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

- Sensitivere Analyse: verbesserter Quantifizierungsbereich (0,625 mg/kg)
- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing method for the qualitative analysis of allergens in the production line or for laboratory equipment.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-01-23	Version 1
2021-03-12	Version 2 Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"> – Änderung Standard 1 und 2 von 1,3 ml auf 2,6 ml – Ausarbeitung Kapitel 11, 12, 13 und 14

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM)



Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN®FAST Hazelnut

Brief information

RIDASCREEN®FAST Hazelnut (Art. No. R6802) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of hazelnut (or hazelnut proteins) in food validated for the method (see chapter 1. Intended Use).

The ELISA has been validated for dark chocolate by the German BVL (§64 method LFGB).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)approx. 20 min test implementation (incubation time) 30 min
Standard material:	hazelnut mush with a protein content of 15 %.
Limit of detection: (matrix-dependent)	0.17 - 0.22 mg/kg (ppm) hazelnut mean: 0.19 mg/kg (ppm) hazelnut or 0.0285 mg/kg (ppm) hazelnut protein
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) hazelnut
Specificity:	The used antibodies specifically detect hazelnut proteins. Further information are contained in the validation report.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice manual. It lists minimum standards concerning the framework conditions when using test kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the link <https://food.r-biopharm.com/>.

Related products for hazelnut determination

Bioavid Lateral Flow Haselnuss / Hazelnut (Art. No. BL604-10, BL604-25)
SureFood® PCR ALLERGEN Hazelnut (Art. No. S3602)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Hazelnut (R6802) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of hazelnut or hazelnut proteins in food. Due to the large number of different food products, the following samples were examined representatively for different product groups within the scope of the test development: ice cream, cereals, butter cookies and various spices. It can be assumed that the test is also suitable for the analysis of other foods; this must be verified by the user himself.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices please refer to the Validation Report. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we make available in our Application Notes (see chapter 15.).

2. General

Hazelnut (*Corylus avellana*) is one of the most popular tree nuts worldwide. Generally, hazelnuts are used in a variety of food industries. Hazelnuts are very common ingredients of chocolate products and are also consumed as snacks and in bakery products such as cookies. They are also utilized as an add-on for dressings, salads or in order to refine fish meals. Hazelnut is one of eight foods, which are the most frequent cause of food allergies. In Central Europe, more than 90% of hazelnut allergies are associated with an allergy to tree pollens. Consumption of a few milligrams of hazelnut can induce allergic reactions in sensitized individuals. Therefore, labelling of hazelnut containing products is very important and compulsory in the USA and the European Union as well as in many other countries. The main threat for sensitized individuals is unintended contamination of hazelnut in food (e.g. hazelnut traces in chocolate which should not contain hazelnuts). Therefore, it is important to test foods, which may have been contaminated during their production process for the presence of unintended traces of hazelnuts.

According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, hazelnut and products thereof must be declared on food labels as allergen. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against hazelnut proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, present hazelnut protein will bind to the specific capture antibodies. The result is an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Then, antibody conjugated to peroxidase is added. This conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/Chromogen are added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the hazelnut content of the sample.

The result is expressed in mg/kg hazelnut.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	ready to use		48 wells
Allergen extraction buffer	green	concentrate	10x	100 ml
Standard 1*	transparent	ready to use	0 mg/kg	2.6 ml
Standard 2*	transparent	ready to use	2.5 mg/kg	2.6 ml
Standard 3*	transparent	ready to use	5.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	transparent	ready to use	10.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	transparent	ready to use	20.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	brown	concentrate	10x	100 ml
Conjugate	red	concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready to use		10 ml
Stop solution	yellow	ready to use		14 ml

* The dilution factor 20, which results after sample preparation, has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the hazelnut concentration of the samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Gloves
- Scale
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials (e.g. 50 ml centrifuge tubes from Greiner, Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 µm)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- If necessary: a further microtiter plate (e.g. universal binding, breakable MTP from Thermo Fisher Scientific, Art. No. 95029390 or low binding Greiner bio-one, Art. No. 655901)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µl
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2. Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Skim milk powder (food quality) (SMP)

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the plate (coated plate and pre-plate, if necessary (see chapter 10.2.)). Use separate pipet tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to addition in the wells.
- Extinction less than 1.2 ($E_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 5.

9. Sample preparation

Before starting and during the assay wear gloves. Airborne allergens and dirty laboratory equipment may lead to contamination of the assay. Therefore, please notice the following recommendations:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation,
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

Make sure to heat the diluted Allergen extraction buffer (AEB) in time in the 60 °C (140 °F) water bath.

The Allergen extraction buffer is provided as a 10fold concentrate and must be diluted prior use. Before dilution of the buffer concentrate, dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99 °F) completely and mix well. After that, dilute the heated buffer concentrate 1:10 (1+9) with dist. water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). The **diluted Allergen extraction buffer (AEB)** is either stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

In the course of the extraction, skim milk powder (SMP) has to be added. Either the SMP is added to the diluted AEB or to the weighed sample.

In case of first, add 5 g SMP per 100 ml diluted AEB. Prepare only the quantity of **SMP-AEB** that is actually needed. The SMP-AEB should only be heated once to 60°C (140 °F) and it should be used within 24 hours.

In the following chapter, the following abbreviations are used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer
- SMP-AEB: final diluted AEB with addition of skim milk powder (SMP)

9.1. Extraction for all samples (SMP added to the weighed sample)

Heat the AEB to 60 °C (140 °F) before sample extraction.

- Homogenize well a sufficient amount (5 - 50 g or 5 - 50 ml) of sample (grind it thoroughly to powder and mix well or mix well the solution respectively)
- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 ml) homogenized sample to a new vial and add 1 g SMP
- Add 20 ml (or 19 ml in case of liquid samples) pre-heated AEB (see chapter 9.)
- Mix vigorously (e.g. vortexer)
- Extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath by shaking occasionally
- Let the sample cool down shortly in ice water (3 - 5 min)
- Filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 x g; if possible at 4 °C (39 °F) (Alternatively: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x g) for 10 min in a microcentrifuge)
- Transfer the supernatant into a fresh vial
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored up to one day in a well-closed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Unused extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for one month.

9.2. Extraction for all samples (using SMP-AEB)

Heat the SMP-AEB to 60 °C (140 °F) before sample extraction.

- Homogenize well a sufficient amount (5 - 50 g or 5 - 50 ml) of sample (grind it thoroughly to powder and mix well or mix well the solution respectively)
- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 ml) homogenized sample to a new vial and add 20 ml (or 19 ml in case of liquid samples) pre-heated SMP-AEB (see chapter 9.)

- Mix vigorously (e.g. vortexer)
- Extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath by shaking casually
- Let the sample cool down shortly in ice water (3 - 5 min)
- Filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 x g; if possible at 4 °C (39 °F)
(Alternatively: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x g) for 10 min in a microcentrifuge)
- Transfer the supernatant into a fresh vial
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored up to one day in a well-closed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Unused extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for one month.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in dist. water (e.g. 200 µl conjugate + 2 ml dist. water, sufficient for 2 microtiter strips).

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for 4 weeks.

Components should be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting into the plate.

Do not use more than three strips (24 wells) at a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1.) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are

pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then exactly 100 µl are quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 100 µl of each standard or sample (prepared according to chapter 9.) in duplicate to the wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted wash buffer (see chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Pipette 100 µl of the diluted conjugate (see chapter 10.1.) to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted wash buffer (see chapter 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Pipette 100 µl of substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Pipette 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation can be done by use of the 4-parameter or cubic spline function. Once an evaluation method has been selected, it should be retained and not be switched between the two functions. The cubic spline function cannot calculate concentrations between standard 1 and standard 2 (LOQ) due to the used mathematics. The 4-parameter function enables also the estimation of values between standard 1 and standard 2.

For the evaluation it should be clarified, that the quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate (certificate of analysis) enclosed in the test kit.

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 20. A dilution factor of 20 is already taken into account with the standard concentrations (see chapter 4.*). Hence, the hazelnut concentration in mg hazelnut per kg of food can directly be read from the standard curve.

The protein content of the used hazelnut standard material is 15 %. Thus, the result must be multiplied by 0.15 to determine the hazelnut protein concentration of a sample.

12. Interpretation of results

Results between LOD and LOQ indicate a low allergen concentration in the sample. Due to the method's high variation below LOQ, results calculated by the 4-parameter function show a high uncertainty in this area. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LOQ" or as "positive, but < LOQ". Depending on the matrix, samples that do not contain the analyte may also show a result in this range.

A result below the LOD does not exclude an allergen contamination below the detection limit of the assay or that other allergen components, such as lipids, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

A further dilution and new detection of samples is recommended for extinction values ($E_{450 \text{ nm}}$) > standard 5. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the allergen concentration. Dilutions should be done with the SMP-AEB.

Compared to the certificate, higher extinction values ($E_{450 \text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits (LOD, LOQ) depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range. Higher result variation appear typically with repeated testing. This may cause results being below and above the test characteristic boundaries (LOD, LOQ, highest standard).

An incorrect weigh in of the sample to be analyzed will have a 1:1 effect on the measurement result (e.g. a 10 % higher concentration is measured with a weigh in of +10 %). A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max $\pm 1\%$.

For detailed results and further information for other food matrices, please refer to the validation report. In addition, data on individual foods may be available from proficiency tests and interlaboratory comparisons.

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product groups could be validated due to the large number of foods. When analyzing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results obtained by means of spike experiments. If necessary, a validation of the sample matrix of interest needs to be performed.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive / increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments.

The addition of foreign protein (depending on the test e.g. BSA, gelatine, skim milk powder) during extraction or test procedure may suppress matrix effects.

In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery.

Cross reactivities are side reactions of the used antibody with antigen showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with antigens from closely related species. In contrast to matrix effects, it is a specific reaction of the antigen with the antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as the actual analyte. Therefore, cross reactivities may also appear after food processing in single case or are lost.

For evaluation of the cross reactivity only one exemplary sample was analyzed, other samples may show a different result. All cross reactivities and exemplary analyzed matrices are described in the validation report.

The protein content and the protein composition may vary considerably between different hazelnut species. Furthermore, the affinity of the used antibody varies from species to species. Therefore, different species may produce different results, since exemplary hazelnut species were used for calibration.

14. Recommendation

Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in the standards EN 15633-1 and 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control and to ensure an accurate and correct test procedure. Hazelnut-free and hazelnut-containing (naturally contaminated or spiked) samples should be used. An example of a spike experiment is given in the validation report.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjustment of the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction may be necessary.
- To perform a PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the results.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- More sensitive analysis: improved LOQ (0.625 mg/kg)
- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing method for the qualitative analysis of allergens in the production line or for laboratory equipment.

Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2018-01-23	Version 1
2021-03-12	Version 2 Changes made: <ul style="list-style-type: none">– Volume change from Standard 1 and 2 from 1.3 ml to 2.6 ml– Editing chapter 11, 12, 13 and 14

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Fricke, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321