

RIDASCREEN® Peanut

REF R6811

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Erdnuss und Erdnussprotein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of peanut and peanut protein



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® Peanut (Art. Nr. R6811) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss und Erdnussprotein in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Der RIDASCREEN® Peanut ist zertifiziert bei AOAC-RI (PTM Nr. 112102).

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 50 min
Standardmaterial:	NIST Referenzmaterial 2387 (Erdnussbutter) (Proteingehalt: 22,2 ± 0,5 g / 100 g)
Nachweisgrenze:	0,15 mg/kg Erdnuss (entspricht 0,033 mg/kg Erdnussprotein) für weitere Informationen zur statistischen Ermittlung siehe den Validierungsbericht
Bestimmungsgrenze:	0,75 mg/kg Erdnuss (entspricht 0,166 mg/kg Erdnussprotein)
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch Erdnussproteine. Es besteht keine Kreuzreaktivität gegen 91 getestete Lebensmittel.

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der in diesem Test 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 Doterversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13. Grenzen der Methode).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. 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 der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt oder gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Erdnuss

Bioavid Lateral Flow Erdnuss / Peanut (Art. Nr. BL606-10; BL606-25)

Bioavid Lateral Flow Erdnuss / Peanut inkl. Hook Linie (Art. Nr. BLH706-20)

SureFood® ALLERGEN Peanut (Art. Nr. S3603)

SureFood® ALLERGEN 4plex Peanut / Hazelnut / Walnut + IAC (Art. Nr. S3402)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Peanut (Art. Nr. R6811) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss und Erdnussprotein in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Produktkategorien im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Puffreis, Müsliriegel, Kekse, Eis, Studentenfutter und Milkschokolade. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits auf diese Produktkategorie zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrixen entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

2. Allgemeines

Obwohl die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) zu den Hülsenfrüchten und nicht zu den Nüssen gehört, ist ihr Geschmack und ihr üblicher Verzehr ähnlich wie bei den Baumnüssen. Die Erdnuss ist sozusagen eine der beliebtesten "Nüsse" weltweit. Erdnüsse sind sehr häufig Zutaten von Schokoladenprodukten und werden auch als Snacks und in Backwaren wie Keksen verzehrt.

Mit 25 % ist der Anteil an Proteinen in Erdnüssen sehr hoch. Viele dieser Proteine sind als allergieauslösend bekannt, wie z. B. Arachine und Conarachine, die in relativ hohen Mengen enthalten sind. Die Erdnuss ist auch

eines der acht Lebensmittel, die die häufigste Ursache für Lebensmittelallergien sind. Allergien gegen Erdnüsse gehören zu den schwersten Allergien und können zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks führen. Der Verzehr von weniger als einem Milligramm Erdnuss kann bei sehr sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Deshalb ist die Kennzeichnung erdnusshaltiger Produkte in den USA und der Europäischen Union sowie in vielen anderen Ländern obligatorisch. Die Hauptgefahr für sensibilisierte Personen ist die Kontamination von Erdnüssen in Lebensmitteln, die erdnussfrei sein sollen (z. B. Erdnussspuren in Schokolade, die keine Erdnüsse enthalten sollte). Daher ist es wichtig, Lebensmittel, die während des Produktionsprozesses kontaminiert worden sein könnten, auf das Vorhandensein von unbeabsichtigten Erdnussspuren zu testen.

Im Jahr 2019 haben Taylor et al. (2019 VITAL Scientific Expert Panel Recommendations, The Allergen Bureau Limited (<http://allergenbureau.net/>)) die VITAL-Werte für Erdnüsse neu bewertet und haben festgestellt, dass der ED01-Wert - die Dosis, auf die 99 % der Erdnussallergiker nicht reagieren - bei 0,2 mg Erdnussprotein liegt. Der ED05-Wert - die Dosis, auf die 95 % der Erdnussallergiker nicht reagieren - liegt bei 2,1 mg Erdnussprotein.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Erdnussproteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandene Erdnussproteine an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidase-gekoppelten Antikörper-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Eine Substrat/Chromogen-Lösung wird in die Mikrotiterstreifen gegeben und inkubiert. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Lösung, die proportional zur Erdnussproteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Erdnuss oder Erdnussprotein angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 96 Bestimmungen durchgeführt

werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	Grün	Konzentrat	10x	100 ml
Standard 1* Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	0,75 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	1,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	3,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	6,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 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 Erdnuss-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (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
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2. Reagenzien

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

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

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

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) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- 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 Laborausüstung 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 reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.

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

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.

Stellen Sie sicher, dass der AEP rechtzeitig im 60 °C Wasserbad erhitzt wird.

Im folgenden Kapitel wird folgende Abkürzung verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer

9.1. Extraktion mit AEP und Magermilchpulver (MMP)

Den AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

- Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) der Laborprobe um sicherzustellen, dass eine repräsentative Prüfmenge entnommen wird.
- 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. im Falle von flüssigen Proben 19 ml) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9. Probenvorbereitung) versetzen.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) unter gelegentlichem Schütteln extrahieren.
- Probe im Eisbad für 3 - 5 min abkühlen lassen.
- 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 zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) sollte im Falle einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) noch am gleichen Tag im ELISA getestet werden. Er ist in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C zwei Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei - 20 °C einen Monat aufbewahrt werden.

Anmerkung

Alternativ zur Einwaage des MMP zur Probe, kann das MMP dem AEP zugefügt werden (1 g MMP pro 20 ml AEP). Die Haltbarkeit des MMP-AEP beträgt nur 1 Tag.

Im Falle von Proben mit Konzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereiches sollten weitere Verdünnungen der Extrakte mit MMP-AEP durchgeführt werden (1 g MMP pro 20 ml AEP).

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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.

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 werden dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanalpipette 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 20 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
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 mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min¹ nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

¹ Aktuelle Daten zeigen, dass eine Messung bis zu 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung möglich ist (nicht Bestandteil des AOAC Approvals). Für das AOAC Approval war eine Messung innerhalb von 10 min vorgegeben.

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 sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

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 und sollte dem aktuellen Testlauf möglichst entsprechen.

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen (eine Kavität pro Extrakt) ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird und auch nicht dem Vorgehen für das AOAC Approval entspricht. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

12. Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis wird in mg Erdnuss pro kg Lebensmittel angegeben. Ein aus dem Proteingehalt des Erdnuss-Referenz-Standardmaterials (22,2 %) ermittelter Umrechnungsfaktor von 0,222 kann zur Berechnung der Erdnussproteinkonzentration in mg/kg verwendet werden. Multiplizieren Sie das erhaltene Ergebnis in mg/kg Erdnuss mit 0,222, um den Erdnussproteingehalt in der Lebensmittelmatrix zu erhalten.

Ergebnisse zwischen LOD und LOQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Ermittelte Werte in diesem Bereich sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ „< LOQ“ angegeben werden.

Ein Ergebnis unterhalb des LOD schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere Erdnusskomponenten, 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. Weitere Verdünnungen sollten mit dem MMP-AEP durchgeführt werden (1 g MMP pro 20 ml AEP).

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 Erdnusskontamination hinweisen.

13. Grenzen der Methode

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

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

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

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse bemerkbar macht. Hierdurch können besonders Proben, die an den charakteristischen Grenzen der Methode (LOD, LOQ, obere Grenze des Messbereichs) liegen, zwischen den Bereichen der Kalibrationskurve wechseln.

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 aktuellen Validierungsbericht. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen.

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen 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 sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

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

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des im Tests 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 repräsentative Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle analysierten Kreuzreaktivitäten sind im Validierungsbericht beschrieben.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, die in Normen wie EN 15633-1 und EN 15842 aufgeführt sind (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 Erdnuss-freie und Erdnuss-haltige (natürlich oder künstlich kontaminierte) 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.









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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2021-02-01	Freigabeverision, Ersterstellung
2021-12-16	<p>Aktuelle Version</p> <p>Vorgenommene Änderungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Neue statistische Bewertung der LoD (0,15 mg/kg) gemäß AOAC – Generelle sprachliche Überarbeitung – Anpassungen in Kapitel 1. Verwendungszweck – Änderung der Entsorgungsklausel im Kapitel 6. – Kapitel 10.2. Testdurchführung: Zeitspanne nach Zufügen von Stopp-Lösung bis zum Messen von 10 min auf 30 min erhöht – Ergänzung im Kapitel 11. Auswertung (verschoben aus Kapitel Empfehlung) – Ausarbeitung der Kapitel 11. Auswertung, 12. Interpretation der Ergebnisse, 13. Grenzen der Methode, 14. Empfehlung und 15. Weitere Applikationen

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® Peanut

Brief information

RIDASCREEN® Peanut (Art. No. 6811) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of peanut and peanut protein in food validated for the method (see chapter 1. Intended use).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

The RIDASCREEN® Peanut is certified at AOAC-RI (PTM No. 112102).

- Sample preparation: homogenization, extraction and centrifugation
- Time requirement: sample preparation (for 10 samples)... approx. 20 min
test implementation (incubation time)..... 50 min
- Standard material: NIST Reference Material 2387 (peanut butter)
(Protein content: 22.2 ± 0.5 g / 100 g)
- Limit of detection: 0.15 mg/kg (ppm) peanut
(corresponds to 0.033 mg/kg (ppm) peanut protein)
for further information on the statistical evaluation see
the validation report
- Limit of quantification: 0.75 mg/kg (ppm) peanut
(corresponds to 0.166 mg/kg (ppm) peanut protein)
- Specificity: The antibodies used specifically detect peanut proteins. The system shows no cross reactivity to 91 tested food commodities.

Further information are contained in the validation report.

Cross reactivities of the antibodies used for this test kit 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 spiking experiments (see chapter 13. Limits of the method).

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related products for peanut determination

Bioavid lateral flow Erdnuss / Peanut (Art. No. BL606-10; BL606-25)

Bioavid lateral flow Erdnuss / Peanut incl. hook line (Art. No. BLH706-20)

SureFood® ALLERGEN Peanut (Art. No. S3603)

SureFood® ALLERGEN 4plex Peanut / Hazelnut / Walnut + IAC (Art. No. S3402)

1. Intended use

RIDASCREEN® Peanut (Art. No. R6811) is a sandwich enzyme immunoassay test developed for the quantitative analysis of peanut and peanut protein in food. Due to the large number of different food products, the following samples were examined as representative for different food product categories within the scope of the test development: puffed rice cereals, granola bar, cookies, ice cream, trail mixes and milk chocolate. It can be assumed that the assay is also suitable for the analysis of other foods, however, this must be verified by the user before applying the test kit to that food category.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report.

2. General information

Although peanut (*Arachis hypogaea*) botanically belongs to the legume family and not to the nuts family, its taste and usual consumption is similar to that of tree nuts. Peanut is, so to speak, one of the most popular "nuts" consumed worldwide. They are very common ingredients in chocolate products and are also consumed as snacks and in baked goods such as cookies.

The peanut protein content of 25 % in peanuts is very high. Many of these proteins are known to be allergenic, such as the arachins and the conarachins, which are present in relatively high amounts. Peanut is also one of the eight foods that are responsible for the most common cause of food allergies. Allergies to peanuts are among the most severe allergies and can lead to life-

threatening anaphylactic shocks. The consumption of less than one milligram of peanut can cause allergic reactions in very sensitized people. Therefore, labeling of peanut-containing products is mandatory in the USA and the European Union as well as in many other countries. The main danger for sensitized persons is the contamination of peanuts in food products that are supposed to be peanut-free (e.g. peanut traces in chocolate that should not contain peanuts). It is therefore important to test food that may have been contaminated during the production process for the presence of unintentional peanut traces.

In 2019, Taylor et al. (2019 VITAL Scientific Expert Panel Recommendations, The Allergen Bureau Limited (<http://allergenbureau.net>)) re-evaluated the VITAL values for peanut and found that the ED01 value - the dose at which 99 % of peanut-allergic individuals will not react - is 0.2 mg of peanut protein. The ED05 value - the dose at which 95 % of peanut-allergic individuals will not react - is 2.1 mg of peanut protein.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against peanut proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, peanut proteins present in the sample will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Following the washing step, a solution containing antibody conjugated to peroxidase is added. This conjugate is bound to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the chromogen into a blue product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution which is proportional to the peanut protein concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg peanut or peanut protein.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a maximum of 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	0.75 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	3.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	6.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Ready to use		11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 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 peanut concentration of the samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 ml centrifuge tubes from Greiner, Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 14 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 μ m)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinders
- Variable 20 - 200 μ l and 200 - 1000 μ l 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 μ l
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2. Reagents

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

6. Warnings and precautions for the users

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

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

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

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

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 reddish substrate/chromogen prior to test implementation
- Value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 5

9. Sample preparation

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne allergens and dirty laboratory equipment 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.

The Allergen extraction buffer is provided as a 10-fold 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 (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). The **diluted Allergen extraction buffer (AEB)** is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

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

In the following chapter, the following abbreviation is used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer

9.1. Extraction with AEB and skim milk powder (SMP)

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

- Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) the laboratory sample to ensure that a representative test portion can be obtained.
- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 ml) of homogenized sample to a new vial and add 1 g SMP.
- Add 20 ml (or in case of liquid samples 19 ml) 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 in ice water for 3 - 5 min.
- Filter or centrifuge sample 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 to a new vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) should be tested by ELISA on the same day if stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). It can be stored for up to two days in a well-closed container at 2 - 8 °C. Unused extracts can be stored at - 20 °C (- 4 °F) for one month.

Remark:

As an alternative to weighing the SMP to the sample, the SMP can be added to the AEB (1 g SMP per 20 ml AEB). The shelf life of the SMP-AEB is only 1 day.

In case of samples with concentration above the calibration range, further dilutions should be made with the SMP-AEB (1 g SMP per 20 ml AEB).

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **wash buffer** is provided as a 10-fold 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 immediately 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.

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. Add 100 µl of each standard or sample (prepared according to chapter 9.) in duplicate to the wells and incubate for 20 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 as before. Repeat three more times (a total of four wash cycles).
4. Add 100 µl of the conjugate to each well and incubate for 20 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 as before. Repeat three more times (a total of four wash cycles).
6. Add 100 µl of the reddish substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 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 30 min¹ after addition of stop solution.

¹ Current data show that measurement is possible up to 30 min after addition of the stop solution (not part of the AOAC approval). For the AOAC approval, a measurement within 10 min was specified.

11. Evaluation

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter function.

For the evaluation it should be confirmed, that the quality criteria are fulfilled for the current test run. The shape of the standard curve should closely match the shape of the standard curve printed in the analysis certificate.

The assay can be also evaluated when running in single well per extract. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not consistent with standards like EN 15633-1 and EN 15842 and also does not correspond to the procedure for the AOAC Approval. 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 wells per extract.

12. Result interpretation

The test result is calculated in mg peanut per kg food. A conversion factor of 0.222 determined from protein content of 22.2 % of the peanut reference standard material can be used to calculate the peanut protein concentration in mg/kg. Multiply the result obtained in mg peanut per kg food by 0.222 to obtain the peanut protein content in the food matrix.

Results between LOD and LOQ indicate a low peanut concentration in the sample. Calculated results show a high uncertainty in this area due to the method's high variation below LOQ. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LOQ".

A result below the LOD does not exclude an allergen contamination below the detection limit of the assay, or that other peanut 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 absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the peanut concentration. Further dilutions should be made with the SMP-AEB (1 g SMP per 20 ml AEB).

Compared to the certificate, higher absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or peanut 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 depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

The protein content and protein composition may vary in different peanut varieties. Therefore, different peanut varieties may give different results, as the test was calibrated against exemplary peanut varieties used with the standard material.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range resulting in higher variation. This may cause a switch of results between the different areas of the calibration curve especially at the test characteristic boundaries (LOD, LOQ, upper limit of measurement range).

An incorrect weight 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 ± 1 %.

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

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product categories 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 will need 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.

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

Cross reactivities are side reactions of the antibody used for preparing the test kit 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 representative sample was analyzed, other samples may show a different result. All analyzed cross reactivities are described in the validation report.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in standards like EN 15633-1 and EN 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- To pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- To carry along test controls for quality control and to ensure an accurate and correct test procedure. Peanut-free and peanut-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, adjust the sample's pH value (pH 6.5 - 7.5) to neutral prior to extraction.
- To perform a PCR (e.g. SureFood[®]) for confirmation of the result.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt[®] / Bolt[™]) are used.









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
2021-02-01	Release version
2021-12-16	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– New statistical evaluation of LoD (0.15 mg/kg) according to AOAC– General linguistic revision– Adaptations in chapter 1. Intended use– Modification of the disposal clause in chapter 6.– Chapter 10.2. Test procedure: time span adding stop solution until measuring increased from 10 min to 30 min– Addition in chapter 11. Evaluation (moved from chapter Recommendation)– Revision of chapter 11. Evaluation, 12. Result interpretation, 13. Limits of the method, 14. Recommendation and 15. Further application notes

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 Frickel, Jochen Hirsch,

Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321