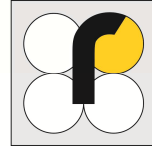


r-biopharm®



# **RIDASCREEN® FAST Cashew**

**Art. No. R6872**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Cashew

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of  
cashew

In vitro Test  
Lagerung bei 2 - 8 °C

In vitro test  
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard:

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

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales:

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

E-Mail : [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

Der RIDASCREEN®FAST Cashew (R6872) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von Cashew in Lebensmitteln entwickelt wurde. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen wie Backwaren und Süßspeisen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Kekse, Eis und Schokolade. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein 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

Nachweisgrenze: 0,13 (0,1 – 0,19) mg/kg (ppm) Cashew

Bestimmungsgrenze: 2,5 mg/kg (ppm) Cashew

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper reagiert spezifisch mit Cashewproteinen.

Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Pistazie.

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 Spikeversuche 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 der Webseite [www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

### **Produktangebot**

Bioavid Cashew Kerne/Cashew Kernel (Art.-Nr. BL610-10 und 25)

SureFood® ALLERGEN Cashew (Art.-Nr. S3615)

## 1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN®FAST Cashew (R6872) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von Cashew in Lebensmitteln entwickelt wurde. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen wie Backwaren und Süßspeisen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Kekse, Eis und Schokolade. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren. Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsreport. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes zur Verfügung stellen.

## 2. Allgemeines

Cashewproteine können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Cashew als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Der Cashewbaum (*Anacardium occidentale*) trägt Cashewäpfel an welchem die Cashewkerne hängen. Cashew wird zu 60 % als Snack verzehrt, die restlichen 40 % werden in Süßwaren verarbeitet. Die Präsenz von undeklariertem Cashew kann eine potentielle Risikoquelle für Cashewallergiker sein. Die Baumnuss-Allergie ist die am häufigsten vorkommende Allergie weltweit. Nach Walnuss ist die Allergie auf Cashew die zweithäufigste Form der Baumnuss-Allergie. Cashew ist ein sehr potentes Allergen und muss aus diesem Grund von Allergikern gemieden werden.

## 3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Cashew-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Cashew-Protein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den

Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Cashew-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/ Chromogen. Das Enzymkonjugat wandelt das 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 zu der Cashew-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Cashew angegeben.

#### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

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

\*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können die Cashew-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzgläser
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Messzylinder
- Filterpapier
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- wenn möglich Multikanal- und/oder Multistepper-Pipette

### 5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fischgelatine (Fisch-Gelatine liquid, Serva, Nr.: 22156.02)
- Magermilchpulver (Lebensmittelqualität)

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat-/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für Standard 5

## 9. Probenvorbereitung

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, Glasgefäße oder Spatel müssen vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Allergenreste zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen lösen (Wasserbad 37 °C) und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der 1:10 verdünnte Allergen Extraktionspuffer ist entweder ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C oder 12 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

### 9.1. Probenaufarbeitung feste Proben (**ohne** Magermilchpulver)

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g einer repräsentativen Probe abnehmen und 20 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 2500 g möglichst bei 4 °C und / oder filtrieren  
(alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen



## 9.2. Probenaufarbeitung flüssige Proben (**ohne** Magermilchpulver)

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 ml) homogenisieren
- 1 ml einer repräsentativen Probe abnehmen und 19 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 2500 g möglichst bei 4 °C und / oder filtrieren  
(alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen

## 9.3. Probenaufarbeitung Schokolade mit Kakaoanteil >75 % und reinem Kakao (**mit** Gelatine-Allergen Extraktionspuffer)

Für die Extraktion von Schokolade mit einem Kakao-Anteil von >75 % und reinem Kakao wird ein Gelatine-Allergen Extraktionspuffer benötigt: z.B. 1,25 g flüssige Fischgelatine (z.B. Fisch-Gelatine liquid, Serva, Nr.: 22156.02, Feststoffanteil 45 %) in einen Messzylinder geben und auf 100 ml mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer auffüllen, gut umrühren.

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g einer repräsentativen Probe abnehmen und 20 ml vorgewärmten (60 °C) Gelatine-Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 2500 g möglichst bei 4 °C und / oder filtrieren  
(alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen

## 9.4. Probenaufarbeitung Gewürze (**mit** Magermilch-Allergen Extraktionspuffer)

Für die Extraktion von Gewürzen wird ein Magermilch-Allergen Extraktionspuffer benötigt: z.B. 5 g Magermilchpulver (Lebensmittelqualität) in 100 ml final verdünntem Allergen Extraktionspuffer lösen.

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g einer repräsentativen Probe abnehmen und 20 ml vorgewärmten (60 °C) Magermilch-Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren

- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 2500 g möglichst bei 4 °C und / oder filtrieren  
(alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen

### **Anmerkung:**

**Der Gelatine-Allergen Extraktionspuffer ist bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) 1 Woche haltbar, der Magermilch-Allergen Extraktionspuffer ist bei 2 – 8°C einen Tag haltbar.**

**Weitere Verdünnungen sollten mit dem final verdünnten Allergen Extraktionspuffer durchgeführt werden.**

**Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar.**

## **10. Testdurchführung**

### 10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien 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 soviel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung 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. Das Konzentrat 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 ca. vier Wochen bei Raumtemperatur.

### 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 (z.B. low binding von Greiner bio-one, Kat.-Nr. 655101 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) verwendet werden, um eine Verzögerung und damit unterschiedliche Inkubationszeiten über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben (mind. 150 µl pro Kavität) werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert und 100 µl werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopplösung mit einer Multikanal- oder einer Multistep-Pipette zu pipettieren um einen 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 Standard bzw. der vorbereiteten Proben als Duplikate 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 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat zu allen Kavitäten geben, vorsichtig manuell mischen 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 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen 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 10 min nach Zugabe des Stopp Lösung messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels Cubic spline - Funktion erfolgen. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

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

Proben mit Extinktionswerten ( $E_{450\text{ nm}}$ ) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

### **Bitte beachten**

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Cashew-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (siehe 4. \*) - der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt.

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:20 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Cashew-Konzentrationen berücksichtigt werden.

### **Generell**

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere Komponenten, wie z.B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. In prozessierten (z.B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden, dies kann die Wiederfindung/Kreuzreaktivität beeinträchtigen.

Die Quantifizierung hängt von der Art und Dauer der Hitzebehandlung ab, so dass bei hoch erhitzten Proben die Wiederfindung stark reduziert sein kann.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet, andere Proben können verschiedene Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrizes sind im Validierungsbericht beschrieben.

### **Empfehlungen**

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, empfehlen wir:

- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.

- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood® durchzuführen
- bei einer Analyse mittels dem ChemWell® oder GEMINI Automaten, sich für weitere Informationen bitte an [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de) zu wenden

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

# RIDASCREEN®FAST Cashew

## Brief information

The RIDASCREEN®FAST Cashew (Art. No.: R6872) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of Cashew in food. Exemplarily for the food groups pastries and sweets have been tested during the assay's development: cookies, chocolate and ice cream. The assay can be likely used for analysis of other food samples too; this has to be checked by the user.

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

Limit of detection: 0.13 (0.1 – 0.19) mg/kg (ppm) cashew

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) cashew

Specificity: The antibodies specifically detect proteins from cashew.  
There is a cross-reactivity to pistachio.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. corn 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 (GEP) – Manual in the respective version. Such 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 website [www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

## **Related products**

Bioavid Cashew Kerne/Cashew Kernel (Art.-No. BL610-10 und 25)

SureFood® ALLERGEN Cashew (Art.-No. S3615)

## 1. Intended use

The RIDASCREEN®FAST Cashew (Art. No.: R6872) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of Cashew in food. Exemplarily for the food groups pastries and sweets have been tested during the assay's development: cookies, chocolate and ice cream. The assay can be likely used for analysis of other food samples too; this has to be checked by the user. Limit of detection and limit of quantification depend on the tested food matrix, the level of food processing, and the extraction method. Detailed results and further validation information about other sample matrices can be found in the brochure Product Information. Additionally, results from proficiency tests and inter laboratory trials may exist for different food matrices. Further applications are frequently validated in our laboratory and provided in the Application Notes.

## 2. General

Cashew proteins can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed products. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, cashew must be declared on food labels as it can induce allergic reactions. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand. The cashew tree (*Anacardium occidentale*) produces the cashew apple and cashew kernels. 60 % of cashew is consumed as snacks, remaining 40 % are used in candies. The presence of undeclared cashew is a potential risk for cashew allergic patients. The tree nut allergy is the major allergy worldwide. Beside walnut, cashew is the second most common tree nut allergy. Cashew is a very potent allergen and has to be avoided by allergic patients.

## 3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to cashew proteins. By adding standards and samples to the wells, cashew protein present will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody 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. The detection of cashew protein takes place by adding Substrate/Chromogen. The enzyme conjugate converts the 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 cashew concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg cashew.



## 4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Allergen extraction buffer	Green	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0.0 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	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 ml
Conjugate	Red	<b>Concentrate</b>	<b>11x</b>	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 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the cashew concentrations of samples can directly be read from the standard curve.

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal glass vials
- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- graduated cylinder
- paper filter
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- if possible multichannel pipette and/or multistep pipette

## 5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- fish gelatin (Fisch-Gelatine liquid, Serva, No.: 22156.02)
- skim milk powder (food quality)

## 6. Warnings and precautions

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. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Storage instructions

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

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at room temperature

Reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

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

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.8$ ) for standard 5

## 9. Preparation of Samples

Working devices such as a mill, glass vials or spatulas must be cleaned before and after each sample preparation to remove any remains of allergen and to avoid contamination.

The **Allergen extraction buffer** is provided as a **10fold concentrate**. Before dilution, dissolve possibly formed crystals by heating (water bath 37 °C / 98.6 °F)

and mix well. Dilute the heated concentrate 1:10 (1+9) with distilled water (e.g. 100 ml concentrate + 900 ml dist. Water). The diluted Allergen Extraction buffer is either stable at 20 – 25 °C (68 - 77 °F) for four weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

#### 9.1. Sample preparation solid samples (**without** skim milk powder)

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of a representative sample and add 20 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

#### 9.2. Sample preparation liquid samples (**without** skim milk powder)

- take 1 ml of a representative sample and add 19 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

#### 9.3. Sample preparation chocolate with a cocoa fraction of >75 % and pure cocoa (**with** gelatin allergen extraction buffer)

For the extraction of chocolate with a cocoa fraction of >75 % and pure cocoa a gelatin Allergen extraction buffer is required: e.g. add 1.25 g liquid fish gelatin (e.g. Fish-gelatine liquid, Serva, No.: 22156.02, 45 % solid components) to a graduated cylinder and fill up to 100 ml with final diluted Allergen extraction buffer, mix well.

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of a representative sample and add 20 ml preheated (60 °C / 140 °F) gelatin Allergen extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath

- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

#### 9.4. Sample preparation spices (**with** skim milk Allergen extraction buffer)

For the extraction of spices a skim milk Allergen extraction buffer is required: e.g. solve 5 g skim milk powder (food quality) in 100 ml final diluted allergen extraction buffer.

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of a representative sample and add 20 ml preheated (60 °C / 140 °F) skim milk Allergen extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

#### **Remark:**

**The gelatin Allergen extraction buffer can be stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) for 1 week, the skim milk allergen extraction buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 1 day.**

**Further dilutions should be prepared with the finally diluted Allergen Extraction buffer.**

**The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days.**

## **10. Test implementation**

### 10.1. Preliminary comments

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 solution 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) with distilled water (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml distilled 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 distilled 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 room temperature for approx. four weeks.

## 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 the same time. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one, Cat.-No. 655101 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) should be used to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples (at least 150 µl for every well) are pipetted into the uncoated plate and then 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 standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1). Repeat two more times.
4. Add 100 µl of the conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 -77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually 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 10 minutes after addition of stop solution.

## 11. Results

A special software, the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win / RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a cubic spline function. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

In comparison with the certificate, higher values of the absorbance ( $A_{450\text{ nm}}$ ) for the calibration curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ( $A_{450\text{ nm}}$ ) > standard 5.

### Please note

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 20. The cashew concentration can be read directly from the standard curve (see 4. \*) - the sample dilution factor of 20 is already taken into account.

For sample dilutions of more than 1:20, the further dilution factor must be considered for the calculation of the cashew concentration.

### In general

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like lipids for example.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery/cross reactivity.

The reduction in recovery depends strongly on the temperature and the duration of the heat treatment. If samples are heat treated at high temperature the recovery can be significantly reduced.

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.

## **Recommendation**

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- in case of extremely acid or alkaline samples, the pH should be adjusted to a neutral pH
- due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded.
- to carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- to perform SureFood<sup>®</sup> PCR for confirmation of the result
- For details using the ChemWell<sup>®</sup> or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

For further product information and application notes, please contact sales@r-biopharm.de.

**The product information folder with further information is available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.**

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

**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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)