

r-biopharm®



## RIDASCREEN® Walnut

**REF** R6601

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Walnuss bzw. Walnussprotein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of walnut or walnut protein

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C (36 - 46 °F)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

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

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

Auftragsannahme

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

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

Marketing & Vertrieb

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

R-Biopharm AG switchboard

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

Order department

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

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

Marketing & sales

E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Walnut (Art. Nr. R6601) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von roher und gerösteter Walnuss bzw. Walnussprotein in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

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

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 50 min
Standardmaterial:	Walnusspaste (Proteingehalt: $15,8 \pm 0,32$ g / 100 g)
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,12 mg/kg Walnuss (Mittelwert) (entspricht 0,019 mg/kg Walnussprotein) 0,00 - 0,30 mg/kg Walnuss (entspricht 0,00 - 0,047 mg/kg Walnussprotein)
Bestimmungsgrenze:	1 mg/kg Walnuss (entspricht 0,158 mg/kg Walnussprotein)
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch rohe und geröstete Walnussproteine. Es besteht eine leichte Kreuzreaktivität zu Pekannuss und Anis. Gegen weitere 97 getestete Lebensmittel wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt. 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. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Doterversuche erkannt werden.

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 und gespeichert werden.

## **Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Walnuss**

Bioavid Lateral Flow Walnut inkl. Hook Linie (Art. Nr. BLH707-15)

SureFood® ALLERGEN Walnut (Art. Nr. S3607)

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

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Walnut (Art. Nr. R6601) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von roher und gerösteter Walnuss bzw. Walnussprotein in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Produktkategorien im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Kekse, Eis, Schokolade und Frühstückscerealien. 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 Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

## 2. Allgemeines

Die Walnuss (*Juglans regia*) ist eine der beliebtesten Baumnüsse weltweit. Walnüsse sind sehr häufige Zutaten von Schokoladenprodukten und werden auch als Snacks und in Backwaren wie Kekse verzehrt. Des Weiteren werden sie als Zusatz für Eis, Dressings und Salate verwendet.

Die Walnuss ist eines der acht Lebensmittel, die die häufigste Ursache für Lebensmittelallergien sind. Der Verzehr von weniger als ein Milligramm Walnussprotein kann bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Die Hauptgefahr für sensibilisierte Personen ist die Kontamination von Walnüssen in Lebensmitteln (z. B. Walnuss Spuren in Schokolade, die keine Walnüsse enthalten sollte). Daher ist es wichtig, Lebensmittel, die während des Produktionsprozesses kontaminiert worden sein könnten, auf das Vorhandensein von unbeabsichtigten Walnuss Spuren zu testen.

Nach der **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Walnüsse 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 Walnussproteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden vorhandene Walnussproteine 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 Waschschrift entfernt. Eine Substrat/Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben und inkubiert. 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 Absorption der Lösung, die proportional zur Walnussproteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Walnuss oder Walnussprotein angegeben.

#### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 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 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 2*</b> Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	1 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 3*</b> Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	3 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 4*</b> Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	9 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 5*</b> Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	18 mg/kg	1,3 ml
<b>Wash buffer</b> Waschpuffer	Braun	<b>Konzentrat</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

\* Die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Walnuss-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  $\mu\text{m}$ )
- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200  $\mu\text{l}$  und 200 - 1000  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

### 5.2 Reagenzien

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

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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](http://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 Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Absorption kleiner 1,2 ( $A_{450\text{ nm}} < 1,2$ ) 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 reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.

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 (9 + 1) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Konzentrat). 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 werden folgende Abkürzungen verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer
- MMP: Magermilchpulver

## 9.1 Extraktion mit AEP und MMP

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe 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. im Falle von flüssigen Proben 19 ml) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9) versetzen.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) unter gelegentlichem Schütteln extrahieren.
- Probe abkühlen lassen (z. B. 3 - 5 min im Eisbad).
- 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 Messbereiches 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 (9 + 1) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Pufferkonzentrat). 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. Die 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 Absorption 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 Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat, CoA) entnommen werden, das über den QR Code auf dem Testkit erhältlich ist. Da die Extinktionswerte im Labor von den auf dem Zertifikat genannten abweichen können, wird empfohlen, die Verhältnisse der

Standards zueinander mit denen auf dem Zertifikat zu vergleichen. Hierfür werden die  $B/B_{\max}$ -Werte (das Verhältnis der Extinktionswerte der Standards zum höchsten Standard) miteinander verglichen. Diese sollten im aktuellen Testlauf ähnlich zu den Verhältnissen der Standards auf dem Zertifikat sein.

Beim Arbeiten nach der vorliegenden Gebrauchsanweisung werden die Proben bei der Extraktion 1:20 verdünnt. Der Probenverdünnungsfaktor von 20 ist bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe Kapitel 4\*). Die Konzentration an Walnuss in der Probe kann deshalb direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

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. 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 Ergebnis des Tests wird in mg Walnuss pro kg Lebensmittel angegeben. Da der Test gegen Walnusspaste mit einem Proteingehalt von 15,8 % kalibriert ist, muss das Ergebnis mit 0,158 multipliziert werden, um mg/kg Walnussprotein zu erhalten.

Ergebnisse zwischen LoD (Limit of Detection) und LoQ (Limit of Quantification) können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen und sollten in diesem Fall nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ "< LoQ" angegeben werden.

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

Proben mit Absorptionswerten ( $A_{450 \text{ nm}}$ ) > 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 pro 20 ml AEP).

Höhere Absorptionswerte ( $A_{450\text{ nm}}$ ) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten laut Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Walnusskontamination einzelner Kit Komponenten 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 Walnussorten unterschiedlich sein. Verschiedene Walnussorten können daher unterschiedliche Ergebnisse liefern, da die Kalibrierung des Tests gegen exemplarische, im Standardmaterial verwendete Walnussorten vorgenommen wurde.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse im Falle von Wiederholungsuntersuchungen 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  $\pm 1$  % 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 Test verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nah 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, 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 Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Walnussfreie und Walnuss-haltige (dotierte) Proben zu verwenden. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood<sup>®</sup>) durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt<sup>®</sup> / Bolt<sup>™</sup>) sich 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).

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2024-08-30	Freigabeversion, Ersterstellung

## Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

-  Gebrauchsanweisung beachten
-  Chargennummer
-  Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)
-  Lagertemperatur
-  Artikelnummer
-  Anzahl Testbestimmungen
-  Herstellungsdatum (YYYY-MM-DD)
-  Hersteller + Adresse

## Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellerseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.



# RIDASCREEN® Walnut

## Brief information

RIDASCREEN® Walnut (Art. No. R6601) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of raw and roasted walnut or walnut protein in food validated for the method (see chapter 1).

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.

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)... approx. 20 min test implementation (incubation time)..... 50 min
Standard material:	walnut paste (protein content: $15.8 \pm 0.32$ g / 100 g)
Limit of detection: (depending on matrix)	0.12 mg/kg (ppm) walnut (mean value) (corresponds to 0.019 mg/kg walnut protein) 0.00 - 0.30 mg/kg walnut (corresponds to 0.00 - 0.047 mg/kg walnut protein)
Limit of quantification:	1 mg/kg (ppm) walnut (corresponds to 0.158 mg/kg (ppm) walnut protein)
Specificity:	The antibodies specifically detect raw and roasted walnut proteins. There is a slight cross-reactivity to pecan and aniseed. No cross-reactivity was found against a further 97 tested foods. Further information is 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 spike 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 product and accessories for walnut determination**

Bioavid lateral flow Walnut incl. hook line (Art. No. BLH707-15)

SureFood® ALLERGEN Peanut (Art. No. S3603)

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

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Walnut (Art. No. R6601) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of raw and roasted walnut or walnut 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: cookies, chocolate, ice cream and breakfast cereals. 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

The walnut (*Juglans regia*) is one of the most popular tree nuts in the world. Walnuts are very common ingredients in chocolate products and are also consumed as snacks and in baked goods such as cookies. Furthermore, they are used as an additive for ice cream, dressings and salads.

Walnuts are one of the eight foods that are the most common cause of food allergies. Eating less than one milligram walnut protein can trigger allergic reactions in sensitized individuals. The main danger for sensitized individuals is the contamination of walnuts in food (e.g. traces of walnuts in chocolate, which should not contain walnuts). Therefore, it is important to test foods that may have been contaminated during the production process for the presence of unintentional walnut traces.

According to Regulation (EU) No. 1169/2011, walnuts and their products must be declared as an allergen on food labels. There are similar regulations in the USA, Canada, Australia and New Zealand, for example.

## 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 walnut proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, walnut proteins present 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 colorless chromogen into a blue end product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance of the solution which is proportional to the walnut protein concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg (ppm) walnut or walnut 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
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready to use		96 wells
<b>Allergen extraction buffer</b>	Green	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 mL
<b>Standard 1*</b>	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 2*</b>	Transparent	Ready to use	1 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 3*</b>	Transparent	Ready to use	3 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 4*</b>	Transparent	Ready to use	9 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 5*</b>	Transparent	Ready to use	18 mg/kg	1.3 mL
<b>Wash buffer</b>	Brown	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 mL
<b>Conjugate</b>	Red	Ready to use		11 mL
<b>Substrate/Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 mL
<b>Stop solution</b>	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 walnut 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 up to 50 g and precision of  $\pm 0.01$  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 / 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 cylinders
- 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
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

## 5.2 Reagents

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

## 6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. 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 (SDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate and pre-plate if necessary, see chapter 10.2). 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 (36 - 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 (36 - 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 (9 + 1) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer concentrate). The **diluted Allergen extraction buffer (AEB)** is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 12 weeks.

Make sure that the AEB is heated in time in the 60 °C (140 °F) water bath.

In the following chapter, the following abbreviations are used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer
- SMP: skim milk powder

## 9.1 Extraction with AEB and SMP

Homogenize a representative, adequately big amount of a solid sample (e.g. 50 g; grind it thoroughly to powder and mix well) or mix well a sample in case of liquid foods.

- 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 (e.g. 3 - 5 min in ice water).
- 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 concentrations above the measuring range, further dilutions should be made with the SMP-AEB (1 g SMP per 20 mL AEB).

## 10. Test procedure

### 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 (9 + 1) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer concentrate). 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 (36 - 46 °F) when no longer required.

## 10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work 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 stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 10 min after addition of stop solution.



## 11. Evaluation

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

It must be clarified that all quality criteria are met for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the quality assurance certificate (certificate of analysis, CoA), which is available via the QR code on the test kit. As the absorbance values in the laboratory may differ from those stated on the certificate, it is recommended to compare the ratios of the standards to each other with those on the certificate. For this purpose, the  $B/B_{\max}$  values (the ratio of the absorbance values of the standards to the highest standard) are compared with each other. In the current test run, these should be similar to the ratios of the standards on the certificate.

When working according to these instructions for use, the samples are diluted 1:20 during extraction. The sample dilution factor of 20 is already considered in the concentration data of the standards (see chapter 4\*). The concentration of walnut in the sample can therefore be read directly from the standard curve.

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. 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 walnut per kg food. Since the test is calibrated against walnut paste with a protein content of 15.8 %, the result must be multiplied by 0.158 to obtain mg/kg walnut protein.

Results between LoD (Limit of Detection) and LoQ (Limit of Quantification) indicate a low allergen concentration in the sample and 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 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 absorbance values ( $A_{450\text{ nm}}$ ) > standard 5. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be considered when calculating the walnut concentration. Further dilutions should be made with the SMP-AEB (1 g 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 walnut contamination of single kit components.

### **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 walnut varieties. Therefore, different walnut varieties may give different results, as the test was calibrated against exemplary walnut 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.  $\pm 1$  %.

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 interlaboratory 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

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. Walnut-free and walnut-containing (spiked) samples should be used. An example of a spiking experiment is given in the validation report.
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure.
- 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 PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- To contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

**For further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).**

## Version overview

Version number	Chapter and title
2024-08-30	Release version

## Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM-DD)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM-DD)



Manufacturer + address

## Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code (“BGB”) R-Biopharm AG provides a limited warranty (“Gewährleistung”) against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.  
ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm’s own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
  - a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
  - b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
  - c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
  - d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG’s liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG’s sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser’s expenses, losses, or damages from loss of good will, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements (“Gewährleistung”) implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpretation is not intended.

**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)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321