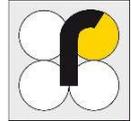


r-biopharm®



RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond

REF R6901

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Mandel

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of almond

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °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

Marketing & Vertrieb

E-Mail: 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

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond (Art. Nr. R6901) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Mandel bzw. Mandelproteinen in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Der Testkit ist ausreichend für maximal 48 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)..... 30 min

Standardmaterial: Mandelmus mit einem Proteingehalt von 23 %

Nachweisgrenze: 0,1 mg/kg Mandel*
(Matrix-abhängig) entspricht 0,023 mg/kg Mandelprotein*
0,0 - 0,23 mg/kg Mandel
*Mittelwert

Bestimmungsgrenze: 2,5 mg/kg Mandel
(entspricht 0,575 mg/kg Mandelprotein)

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Mandelproteinen. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Aprikosenkernen, Maulbeeren, Feigen und Steinweichsel (auch bei anderen Pflanzen der Gattung *Prunus* kann es zu Kreuzreaktivitäten kommen).

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der in diesem Test eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Doterversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13. Grenzen der Methode).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Mandel

Bioavid Lateral Flow Mandel/Almond (Art. Nr. BL601-10, BL601-25)

Bioavid Lateral Flow Mandel/Almond inkl. Hook-Line (Art. Nr. BLH701-20)

SureFood®ALLERGEN Almond (Art. Nr. S3604)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond (Art. Nr. R6901) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Mandel bzw. Mandelproteinen in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Produktkategorien im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Eis, Schokolade, Kekse, Rice Crispies (Puffreis, Zerealien) und verschiedene Gewürze. 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. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15. Weitere Applikationen) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Die Mandel (*Amygdalys communis* / *Prunus dulcis*) ist eine der beliebtesten Baumnüsse weltweit. Mandeln gehören zur Familie der *Prunidea* und sind eng mit Pflaumen, Kirschen, Aprikosen und Pfirsichen verwandt.

Mandeln werden als Snack verzehrt und sind gängige Bestandteile vieler Backwaren. Insbesondere bei Fertiggerichten und im Lifestyle-Bereich spielen Mandeln eine große Rolle. Marzipan ist ebenfalls ein Produkt aus Mandeln. Als

preiswertere Marzipanalternative werden häufig aber auch Aprikosenkerne zu Persipan verarbeitet.

Nüsse sind im Allgemeinen hochwirksame Allergene und können leichte Hautreaktionen und gastrointestinale Symptome auslösen. Bei einigen sehr empfindlichen allergischen Patienten kann ein anaphylaktischer Schock auftreten. Mandeln haben einen hohen Proteingehalt von ca. 25 %. Ca. 95 % der Mandelproteine sind wasserlöslich, was sie zu einer sehr gefährlichen Kreuzkontamination in Produktionslinien macht. Umso wichtiger ist es, Kreuzkontaminationen zu vermeiden, die zum versehentlichen Verzehr von Mandeln durch Allergiker führen können.

Nach der **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Mandeln auf den Lebensmitteletiketten deklariert werden, da sie allergische Reaktionen auslösen können. 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 Mandel-Proteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandene Mandel-Proteine 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 Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Lösung, die proportional zur Mandel-Proteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Mandel angegeben.

4. Packungsinhalt

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

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

* Die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung nach Kapitel 9.1. und 9.2. ergibt. So können die Mandel-Konzentrationen 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 μ m)
- Messpipetten
- Messzylinder

- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific, Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one, Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Gegebenenfalls (bei Extraktion von Gewürzen, Sorbet und Kakao) Magermilchpulver (MMP, Lebensmittelqualität)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

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

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

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

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

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

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 1,2 ($E_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 5

9. Probenvorbereitung

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere 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.

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

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

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

In den folgenden Abschnitten wird folgende Abkürzung verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer

9.1. Extraktion **ohne** Magermilchpulver (MMP)

Den AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

- Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) der Laborprobe um sicherzustellen, dass eine repräsentative Prüfmenge entnommen wird.
- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 20 ml (bzw. 19 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9.) versetzen und das Gefäß verschließen.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren.
- Probe abkühlen lassen (z. B. im Eisbad für 3 - 5 min).
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren.
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren).
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann bis zur Verwendung im Test in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 3 Tage).

9.2. Extraktion **mit** Magermilchpulver (MMP) für Gewürze, Sorbet und Kakao

Den AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

- Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) der Laborprobe um sicherzustellen, dass eine repräsentative Prüfmenge entnommen wird.
- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und 1 g MMP hinzugeben.
- Mit 20 ml (bzw. 19 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9.) versetzen und das Gefäß verschließen.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).

- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) unter gelegentlichem Schütteln extrahieren.
- Probe abkühlen lassen (z. B. im Eisbad für 3 - 5 min).
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren.
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren).
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann bis zur Verwendung im Test in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 3 Tage).

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1 + 9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 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 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. Probenvorbereitung extrahierten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1.) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
6. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Die Auswertung kann mittels 4-Parameter- oder Cubic-Spline-Funktion erfolgen. Eine einmal gewählte Auswertemethode sollte beibehalten und nicht zwischen den beiden Funktionen gewechselt werden. Aufgrund der verwendeten Mathematik kann mittels Cubic-Spline-Funktion keine Konzentration außerhalb des Messbereichs ($< \text{Standard } 2$ bzw. $> \text{Standard } 5$) berechnet werden. Die 4-Parameter-Funktion ermöglicht auch die Berechnung von Werten zwischen Standard 1 und Standard 2 (siehe auch das Kapitel 13. Grenzen der Methode).

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf die Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden und sollte dem aktuellen Testlauf möglichst entsprechen.

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen 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.

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift ist der Verdünnungsfaktor der Proben 20. Da ein Probenverdünnungsfaktor von 20 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4*), kann die Mandel-Konzentration direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

12. Interpretation der Ergebnisse

Das Ergebnis des Tests wird in mg Mandel pro kg Lebensmittel angegeben. Da der Test gegen rohes Mandelmus mit einem Proteingehalt von 23 % kalibriert ist, muss das Ergebnis mit 0,23 multipliziert werden, um mg/kg Mandelprotein zu erhalten.

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

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

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden. Weitere Verdünnungen sollten mit dem verdünnten AEP hergestellt werden.

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

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

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

Detaillierte Ergebnisse sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

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

Für den vorliegenden ELISA wurden aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen validiert. 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.

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

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

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des im Tests verwendeten 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.

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

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

15. Weitere Applikationen

- Sensitivere Analyse: verbesserter Quantifizierungsbereich (0,25 mg/kg)
- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing Methode für die qualitative Analyse von Allergenen in der Produktionslinie oder für Laborgeräte

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-04-25	Freigabeversion
2021-10-25	<p>Vorherige Version</p> <p>Vorgenommene Änderungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Generelle sprachliche Überarbeitung – Kreuzreaktivität zu Feige konnte durch neue Versuche nachgewiesen werden – Anpassungen in Kapitel 1. Verwendungszweck – Änderung der Entsorgungsklausel im Kapitel 6. – Kapitel 10.2. Testdurchführung: Zeitspanne nach Zufügen von Stopp-Lösung bis zum Messen von 10 min auf 30 min erhöht – Ergänzung im Kapitel 11. Auswertung (verschoben aus Kapitel Empfehlung) – Ausarbeitung und Erstellung der Kapitel 11. Auswertung, 12. Interpretation der Ergebnisse, 13. Grenzen der Methode, 14. Empfehlung und 15. Weitere Applikationen
2021-12-21	<p>Aktuelle Version</p> <p>Vorgenommene Änderungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fehler-Verbesserung in Kapitel 10. Testdurchführung: Verdünnung des Konjugat-Konzentrates mit destilliertem Wasser – Generelle sprachliche Überarbeitung

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

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

Haftungsausschluss

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

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

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

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

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond

Brief information

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond (Art. No. R6901) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of almond or almond proteins in food validated for the method (see chapter 1. Intended use).

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

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)... approx. 20 min test implementation (incubation time)..... 30 min
Standard material:	almond mush with a protein content of 23 %
Limit of detection: (depending on matrix)	0.1 mg/kg (ppm) almond* corresponds to 0.023 mg/kg (ppm) almond protein* 0.0 - 0.23 mg/kg (ppm) almond *mean value
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) almond (corresponds to 0.575 mg/kg (ppm) almond protein)
Specificity:	The antibodies used specifically detect proteins from almond. There is a cross reactivity to apricot stone, mulberries, figs and mahaleb cherry (cross reactions to other plants from genus <i>Prunus</i> are possible).

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 almond determination

Bioavid Lateral Flow Almond (Art. No. BL601-10, BL601-25)

Bioavid Lateral Flow Almond incl. hook line (Art. No. BLH701-20)

SureFood®ALLERGEN Almond (Art. No. S3604)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond (Art. No. R6901) is a sandwich enzyme immunoassay test developed for the quantitative analysis of almond or almond proteins 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: ice cream, chocolate, cookies, rice crispies (puffed rice, cereals) and various spices. 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. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we make available in our application notes (see chapter 15. Further application notes).

2. General information

Almond (*Amygdalys communis* / *Prunus dulcis*) is one of the most popular tree nuts in the world. Almonds belong to the *Prunidea* family and are closely related to plums, cherries, apricots and peaches.

Almonds are consumed as a snack and are common ingredients in many baked goods. Almonds play a particularly important role in convenience foods and in the lifestyle sector. Marzipan is also a product made from almonds. However, as a cheaper alternative to marzipan, apricot kernels are also frequently processed into persipan.

Nuts are generally high-potency allergens and can cause mild skin reactions and gastrointestinal symptoms. Anaphylactic shock may occur in some very sensitive allergic patients. Almonds have a high protein content of approximately 25 %. Approximately 95 % of almond proteins are water soluble, making them a very dangerous cross-contamination in production lines. It is therefore all the more important to avoid cross-contamination, which can lead to the accidental consumption of almonds by allergy sufferers.

According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, almond 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.

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

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	2.6 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	2.5 mg/kg	2.6 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	5.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	10.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	20.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml

* The concentration values of the standards already take into account the dilution factor 20, which results from the sample preparation according to chapter 9.1. and 9.2. Thus, the almond concentrations 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 ± 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 μ m)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 μ l and 200 - 1000 μ l micropipettes
- If necessary: a further microtiter plate (e.g. universal binding, breakable MTP from Thermo Fisher Scientific, Art. No. 95029390 or low binding Greiner bio-one, Art. No. 655901)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 μ l
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- If necessary (for extraction of spices, sorbet and cacao): skim milk powder (SMP, food quality)

6. Warnings and precautions for the users

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

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

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

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

7. Storage instructions

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

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

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

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

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Sample preparation

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

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

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

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

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

In the following chapters, the following abbreviation is used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer

9.1. Extraction **without** skim milk powder (SMP)

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

- Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) the laboratory sample to ensure that a representative test portion can be obtained.
- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 ml) of homogenized sample to a new vial and add 20 ml (or 19 ml in case of liquid samples) pre-heated AEB (see chapter 9.)
- Mix vigorously (e.g. vortexer).

- Extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down (e.g. in ice water for 3 - 5 min).
- Filter or centrifuge sample for 10 min at > 2,500 x g; if possible at 4 °C (39 °F).
(Alternatively: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x g) for 10 min in a microcentrifuge).
- Transfer the supernatant into a new vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until used in the test (shelf life approx. 3 days).

9.2. Extraction **with** skim milk powder (SMP) for spices, sorbet and cacao

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

- Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) the laboratory sample to ensure that a representative test portion can be obtained.
- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 ml) of homogenized sample to a new vial and add 1 g SMP.
- Add 20 ml (or 19 ml in case of liquid samples) pre-heated AEB (see chapter 9.)
- Mix vigorously (e.g. vortexer).
- Extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down (e.g. in ice water for 3 - 5 min).
- Filter or centrifuge sample for 10 min at > 2,500 x g; if possible at 4 °C (39 °F).
(Alternatively: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x g) for 10 min in a microcentrifuge).
- Transfer the supernatant into a new vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until used in the test (shelf life approx. 3 days).

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

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

The **wash buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1 + 9) with dist. water (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 (35 - 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 working steps.

Do not use more than three strips (24 wells) at a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then exactly 100 µl are quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 100 µl of each standard or sample (prepared according to chapter 9. Sample preparation) in duplicate to the wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times 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 two more times (a total of three wash cycles).
4. Add 100 µl of the diluted conjugate (see chapter 10.1) to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of four three cycles).
6. Add 100 µl of reddish substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Pipette 100 µl of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A special software, **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter or cubic spline function. Once an evaluation method has been selected, it should be retained and not be switched between the two functions. Due to its mathematical background, the cubic spline function cannot calculate concentrations outside the measuring range (< standard 2 and > standard 5). The 4-parameter function enables the calculation of values between standard 1 and standard 2 (refer to chapter 13. Limits of the method).

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

The assay can be also evaluated when running in single determinations. 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 determinations.

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

12. Result interpretation

The test result is calculated in mg almond per kg food. Since the test is calibrated against raw almond mush with a protein content of 23 %, the result must be multiplied by 0.23 to obtain mg/kg almond protein.

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

A result below the LOD does not exclude an almond 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 taken into account when calculating the almond concentration. Further dilutions should be prepared with the finally diluted 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 almond contamination.

13. Limits of the method

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

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

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

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

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

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

In processed 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.

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

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

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

15. Further application notes

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

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

Version overview

Version number	Chapter and title
2019-04-25	Release version
2021-10-25	Previous version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General linguistic revision– Adaptations in chapter 1. Intended use– Cross reactivity to fig could be proven by new investigations– Modification of the disposal clause in chapter 6.– Chapter 10.2. Test procedure: time span adding stop solution until measuring increased from 10 min to 30 min– Addition in chapter 11. Evaluation (moved from chapter Recommendation) Revision and introduction of chapter 11. Evaluation, 12. Result interpretation, 13. Limits of the method, 14. Recommendation and 15. Further application notes
2021-12-21	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– Correction of the error in chapter 10. Test procedure: dilution of the conjugate concentrate with distilled water– General linguistic revision

Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

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

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

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

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

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch,

Ute Salzbrenner, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321