

r-biopharm®



RIDASCREEN® FAST Peanut

Art. No. R6202

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of peanut



In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

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

E-Mail : info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®

sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG

Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

Der RIDASCREEN®FAST Peanut (R6202) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss und Erdnussbestandteilen in Lebensmitteln entwickelt wurde. Stellvertretend für die Warengruppen Backwaren und Süßspeisen wurden Zerealien, Gebäck, Eiscreme und Milkschokolade validiert. Der ELISA wurde durch das AOAC Research Institute überprüft und ist eine AOAC *Performance Tested Method*SM (PTM Zertifikat 030404). Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren. Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte unserer Broschüre *Product Information*. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren *Application Notes* zur Verfügung stellen.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min
Testdurchführung (Inkubationszeit) 30 min

Nachweisgrenze: 0,13 mg/kg (ppm) Erdnuss
0,03 mg/kg (ppm) Erdnussprotein

Bestimmungsgrenze: 2,5 mg/kg (ppm) Erdnuss
0,6 mg/kg (ppm) Erdnussprotein

Standardmaterial: Referenzmaterial NIST SRM 2387 Erdnussbutter

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper erkennen Erdnussproteine, u.a. das in allen Erdnüssen vorkommende Erdnuss-Allergen Ara h 1 und Ara h 2.

Es besteht eine Kreuzreaktivität zu grünen Erbsen, Linsen, Weizengrieß und zu Bockshornklee.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z.B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z.B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z.B. Polyphenole) können durch Spikeversuche erkannt werden. Bei der Testkitentwicklung werden mehr als 70 potentielle Kreuzreaktanten untersucht. Weitere Informationen sind im aktuellen Validierungsbericht enthalten.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Verwandte Produkte

- RIDASOFT® Win.NET (Z9996)
- bioavid Lateral Flow Erdnuss/Peanut (BL606-10 / BL606-25)
- SureFood® ALLERGEN Peanut (S3603)
- SureFood® ALLERGEN 4 Plex Peanut/Hazelnut/Walnut + IAC (S3402)

1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN®FAST Peanut (R6202) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss und Erdnussbestandteilen in Lebensmitteln entwickelt wurde. Stellvertretend für die Warengruppen Backwaren und Süßspeisen wurden Zerealien, Gebäck, Eiscreme und Milkschokolade validiert. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren. Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrixen entnehmen Sie bitte unserer Broschüre *Product Information*. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren *Application Notes* zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Erdnuss als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

RIDASCREEN®FAST Peanut wurde in einer unabhängigen Studie unter der Leitung des AOAC Research Instituts für Zerealien, Gebäck, Eiscreme und Milkschokolade in drei US-Laboratorien validiert. Jedes Labor untersuchte dazu von jeder Matrix 20 Nullproben und 20 Proben, die mit 5 mg/kg Erdnuss dotiert waren. Zwei von 240 Nullproben wurden positiv ($> 2,5$ mg/kg) gemessen. Dies ergab eine Spezifität von 99,2 % (238/240). Alle dotierten Proben (240/240) wurden positiv gefunden (Sensitivität = 100 %).

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Erdnuss beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandene Erdnuss an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidasegekoppelten Antikörpers. Das Konjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht

gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Erdnuss erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Erdnuss Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Erdnuss angegeben.

4. Packungsinhalt

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

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	gebrauchsfertig		6 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop Solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

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

***) Es handelt sich um den Erdnuss Waschpuffer, der nur im RIDASCREEN®FAST Peanut eingesetzt werden darf.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Schüttler
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Magermilchpulver (Lebensmittelqualität)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

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

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

Erdnuss Spuren aus früheren Analysen müssen unbedingt entfernt werden! Probenreaktionsgefäße und Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, müssen nach und vor jeder Probenextraktion gründlich gereinigt werden, um Erdnussreste zu entfernen.

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

9.1. Probenaufarbeitung für alle Proben, die nicht unter 9.2. fallen

- Mindestens 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und mit 20 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 x g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren).
- 100 µl Überstand oder Filtrat pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Probenaufarbeitung **mit** Magermilchpulver für tannin- oder polyphenolhaltige Proben (z.B. Gewürze, Pfeffer, Paprika schokoladenhaltigen Proben, Karamell und Eiscreme)

- Mindestens 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und 1 g Magermilchpulver hinzugeben
- mit 20 ml verdünntem Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben)

- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 x g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren).
- 100 µl Überstand oder Filtrat pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 5 Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrats evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C vollständig lösen und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20- 25 °C.

Es handelt sich um den Erdnuss Waschpuffer, der nur im RIDASCREEN®FAST Peanut eingesetzt werden darf.

10.2. Testdurchführung

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) 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 werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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

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

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels Cubic spline - Funktion erfolgen. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden. Im Dokument ‚Compliance Criteria‘ sind Kriterien zur Beurteilung von Standardkurven enthalten. Zur Qualitätskontrolle sollten Testkontrollen benutzt werden.

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

Bitte beachten:

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

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

Der Test ist kalibriert gegen das NIST Referenzmaterial 2387 (Erdnussbutter). Das Ergebnis wird als mg/kg Erdnuss ausgedrückt. Das Referenzmaterial 2387 enthält 22,2% +/- 1% Gesamtprotein. Wird das Ergebnis mit 0,22 multipliziert, erhält man mg/kg (ppm) Gesamtprotein.

Generell:

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

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

Allergene in hitzebehandelten Proben werden nicht vollständig von dem verwendeten Antikörper erfasst. Das Ergebnis der Wiederfindung hängt von der Art und Dauer der Hitzebehandlung ab, so dass bei hoch erhitzten Proben die Wiederfindung stark reduziert sein kann.

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

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können in verschiedenen Erdnussorten unterschiedlich sein. Verschiedene Sorten können unterschiedliche Ergebnisse liefern, da eine Kalibrierung des Tests gegen exemplarische Erdnussorten vorliegt.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, empfehlen wir:

- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren

- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood[®] durchzuführen
- bei der Analyse mittels Automaten (z.B. Thunder Bolt[®] / Bolt[®]) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

Weitere Applikationen:

- Sensitivere Analyse mit dem RIDASCREEN[®]FAST Peanut (Verdünnung der Standards bis zu 0,625 mg/kg Erdnuss)

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

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

RIDASCREEN®FAST Peanut

Brief information

The RIDASCREEN®FAST Peanut (Art. No.: R6202) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of peanut and parts of peanut in food. Exemplarily for the food groups pastries and sweets the following commodities have been tested during the assay's development: breakfast cereals, cookies, ice cream, and milk chocolate. The ELISA was approved by the AOAC *Performance Tested Methods*SM Program and was assigned PTM Certification No. 030404 by the AOAC Research Institute. The assay can be likely used for analysis of other food samples too; this has to be checked by the user. Limit of detection and limit of quantification depend on the tested food matrix, the level of food processing, and the extraction method. Detailed results and further validation information about other sample matrices can be found in the brochure *Product Information*. Additionally, results from proficiency tests and inter laboratory trials may exist for different food matrices. Further applications are frequently validated in our laboratory and provided in the *Application Notes*.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: homogenization, extraction, and centrifugation

Time requirement: sample preparation (for 10 samples) approx. 20 min
test implementation (incubation time) 30 min

Limit of detection: 0.13 mg/kg (ppm) peanut
0.03 mg/kg (ppm) peanut protein

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) peanut
0.6 mg/kg (ppm) peanut protein

Standard material: reference material NIST SRM 2387 peanut butter

Specificity: The antibodies specifically detect peanut proteins, including the peanut allergen Ara h 1 and Ara h 2.

There is a cross reactivity to green pea, lentils, wheat semolina and fenugreek.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments. During the development of the test kit more than 70 potential cross reactants are tested. Further information is described in the updated validation report.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under from the website <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Related products

- RIDASOFT® Win.NET (Z9996)
- Bioavid Lateral Flow Erdnuss/Peanut (BL606-10 / BL606-25)
- SureFood® ALLERGEN Peanut (S3603)
- SureFood® ALLERGEN 4 Plex Peanut/Hazelnut/Walnut + IAC (S3402)

1. Intended use

The RIDASCREEN®FAST Peanut (Art. No.: R6202) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of peanut and parts of peanut in food. Exemplarily for different food groups, breakfast cereals, cookies, ice cream, and milk chocolate have been approved. The assay can be likely used for analysis of other food samples too; this has to be checked by the user. Limit of detection and limit of quantification depend on the tested food matrix, the level of food processing, and the extraction method. Detailed results and further validation information about other sample matrices can be found in the brochure *Product Information*. Additionally, results from proficiency tests and inter laboratory trials may exist for different food matrices. Further applications are frequently validated in our laboratory and provided in the *Application Notes*.

2. General

The allergen can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked products. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, peanut and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

RIDASCREEN®FAST Peanut was validated with breakfast cereals, cookies, ice cream, and milk chocolate in an independent study by three independent US laboratories under the supervision of the AOAC Research Institute. Each laboratory analyzed 20 blank samples and 20 samples spiked at 5 mg/kg peanut of each matrix. In total, two of 240 blank samples were measured positive (> 2.5 mg/kg peanut) corresponding to a specificity of 99.2 % (238/240). All of the spiked samples (240/240) were found positive (sensitivity = 100 %).

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to peanut. By adding standards and samples to the wells, peanut present will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The detection of peanut takes place by adding substrate/chromogen. The enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color

change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the peanut concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg peanut.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Allergen extraction buffer	Green	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	Ready to use		6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

- *) The dilution factor 20 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the peanut concentration of a sample can directly be read from the standard curve.
- ***) The peanut washing buffer has to be used in the RIDASCREEN®FAST Peanut only.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials
- shaker
- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax, or homogenisator
- graduated pipettes
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- skim milk powder

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. 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 (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

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

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.

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}}$) for standard 5

9. Preparation of Samples

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

The **Allergen Extraction buffer** is provided as a **10fold concentrate**. 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 distilled water** before use (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted buffer is either stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for four weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

9.1. Sample preparation for all samples not mentioned in 9.2.

- grind 5 g of the sample carefully and mix thoroughly
- weigh 1 g of sample and add 20 ml diluted extraction buffer (the extraction buffer should have already been heated to approx. 60 °C (140 °F))
- mix intensively and extract for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking casually
- centrifuge: 10 min, 2500 x *g*, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged for 10 minutes at high speed in reaction caps by using a micro centrifuge)
- use 100 µl of the supernatant or filtrate per well in the assay

9.2. Sample preparation **with** skim milk powder for tannin or polyphenol containing samples (e.g. spices, pepper, paprika, chocolate, caramel, and ice cream)

- 5 g of the sample should be ground well and thoroughly mixed
- Take hereof 1 g sample and add 1 g skim milk powder; mix properly
- add 20 ml diluted extraction buffer (the extraction buffer should have already been heated to approx. 60 °C (140 °F))
- mix intensively and extract for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking casually
- centrifuge: 10 min, 2500 x *g*, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged for 10 minutes at high speed in reaction caps by using a micro centrifuge)

- use 100 µl of the supernatant or filtrate per well in the assay

Remark:

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 5 days. The extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for several months.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. 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 distilled water before use (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted wash buffer is stable at room temperature for approx. four weeks. The peanut washing buffer has to be used in the RIDASCREEN®FAST Peanut only.

10.2. Test procedure

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

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) should be used 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 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. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample to separate wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.

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

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win.NET (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a cubic spline function. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit. The document *Compliance Criteria* provides criteria for evaluating standard curves.

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

Please note:

When working according to the test kit instructions, the dilution factor is 20. The allergen concentration can be directly read from the standard curve (see 4. *) - the sample dilution factor of 20 is already taken into account).

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

The test is calibrated against NIST Reference Material 2387 (peanut butter). The result is expressed as mg/kg peanut. The reference material 2387 contains 22.2 % +/- 1% total protein. If the result is multiplied by 0.22, then the result can be expressed as mg/kg (ppm) total protein.

In general:

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

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

Allergen containing samples that have been heat treated show a reduced recovery because the proteins denature and are no longer recognized by the antibody. The reduction in recovery depends strongly on the temperature and the duration of the heat treatment. If samples are heat treated at high temperature the recovery can be significantly reduced.

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

The protein content and the protein composition may vary considerably between different peanut species. Therefore, different varieties may produce different results, since exemplary varieties were used for calibration.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Adjust the pH to a neutral value for extremely acidic or alkaline samples
- Use allergen-free and allergen containing (spiked) samples as test controls
- Carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- Analyze each sample material in duplicates
- Perform SureFood[®] PCR to confirm results
- Contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt[®] / Bolt[®]) are used

Further application notes:

- More sensitive analysis with RIDASCREEN®FAST Peanut (dilution of standards down to 0.625 mg/kg peanut)

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

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

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Christian Dreher, Dr. Hans Frickel,

Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321