

RIDASCREEN[®] FAST Hazelnut

Art. No. R6802

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Hazelnut

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

RIDASCREEN®FAST Hazelnut (Art. Nr.: R6802) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss (bzw. Haselnussanteilen) in Zerealien, Backwaren, Eis und Schokolade.

Der ELISA ist für feinherbe Schokolade durch das BVL validiert (§64 Methode LFGB).

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:	0,19 mg/kg (ppm) Haselnuss; zwischen 0,17 – 0,22 mg/kg (ppm) abhängig von der Matrix
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Haselnuss
Spezifität:	Die spezifischen Antikörper erkennen Haselnussproteine

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. 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 <http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Verwandte Produkte

bioavid Lateral Flow Haselnuss / Hazelnut (Art. Nr. BL604-10/-25)

SureFood® PCR ALLERGEN Hazelnut

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Hazelnut ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss bzw. Haselnussanteilen in Zerealien, Backwaren, Eis und Schokolade.

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 Haselnuss 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.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Haselnuss-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Haselnuss-Protein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Haselnuss-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Haselnuss-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Haselnuss 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	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	2,5 mg/kg	1,3 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 berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So können die Haselnuss-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

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

Spuren von Haselnuss aus früheren Analysen müssen unbedingt entfernt werden! Die Aufarbeitung der Proben sollte daher in gut gespülten oder neuen Gefäßen vorgenommen werden.

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, müssen ebenfalls nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Haselnussreste 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 Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C.

Im Laufe der Extraktion muss der Probe Magermilchpulver (MMP) zugesetzt werden. Entweder wird das MMP dem verdünnten Extraktionspuffer zugesetzt **oder** der eingewogenen Probe.

Dem verdünnten Extraktionspuffer werden z. B. 5 g Magermilchpulver (MMP) auf 100 ml zugesetzt werden. Es sollte immer nur so viel MMP-Puffer hergestellt werden wie benötigt wird. Der MMP-Puffer sollte nur einmalig auf 60°C erwärmt und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

9.1. Probenaufarbeitung für alle Proben

- 5-50 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen (Schokoladenproben schmelzen und mischen)
- 1 g Probe abnehmen und 1 g Magermilchpulver (siehe 5.2.) 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: mind. 10 min / 2500 g / möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl des filtrierten Überstands pro Kavität im Test einsetzen

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 1 Tag haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einen Monat aufbewahrt werden.

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. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

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.

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 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 vorbereiteten Proben als Duplikate in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.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 Allergen-Kontamination hinweisen.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Probenvorbereitung 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.*)).

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 aktuellen Validierungsbericht beschrieben.

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können in verschiedenen Haselnusssorten unterschiedlich sein. Verschiedene Sorten können unterschiedliche Ergebnisse liefern, da eine Kalibrierung des Tests gegen exemplarische Haselnusssorten vorliegt. Der Proteingehalt des Standardmaterials ist im Validierungsbericht angegeben und kann zur Umrechnung auf Protein genutzt werden.

Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, wird empfohlen:

- bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert auf neutral einzustellen
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen
- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- 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.

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®] FAST Hazelnut

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Hazelnut (Art. No.: R6802) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of hazelnut in cereals, bakery products, ice cream and chocolate.

The ELISA has been validated for dark chocolate by the German BVL (§64 method LFGB).

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: 0.19 mg/kg (ppm) hazelnut; between 0.17 – 0.22 mg/kg (ppm) depending on the matrix
- Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) hazelnut
- Specificity: The antibody specifically detects proteins from hazelnut.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. corn bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments. 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 from the website <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Related products

bioavid Lateral Flow Haselnuss / Hazelnut (Art. No. BL604-10/-25)

SureFood® PCR ALLERGEN Hazelnut

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Hazelnut is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of hazelnut (e.g. traces of hazelnut) in cereals, bakery products, ice cream and chocolate.

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**, hazelnut and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to hazelnut proteins. By adding standards and samples to the wells, hazelnut protein present will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The detection of hazelnut protein takes place by adding Substrate/Chromogen. The enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the hazelnut protein concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg hazelnut.

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	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	2.5 mg/kg	1.3 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
Stop solution	Yellow	Ready to use	-	14 ml

- *) The dilution factor **20** for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the hazelnut concentrations of samples can directly be read from the standard curve.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment

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

5.2. Reagents

- distilled or deionized water
- skim milk powder (food quality)

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 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

Hazelnut residues of previous analyses have to be removed completely! Therefore, samples should be prepared in new or well cleaned vials.

Tools such as mincers have to be cleaned thoroughly after use, in order to avoid spreading of traces of hazelnut.

The **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 extraction buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks.

In the course of the extraction skim milk powder (SMP) has to be added. Either the SMP is added to the diluted extraction buffer **or** to the weighed in sample.

Add e.g. 5 g skim milk powder (SMP) per 100 ml diluted Allergen Extraction buffer. Prepare only the quantity of SMP-buffer that is actually needed. The SMP-buffer should only be heated once to 60°C (140 °F) and it should be used within 24 hours.

9.1. Sample preparation for all samples

- grind 5-50 g of the sample accurately and mix thoroughly (chocolate samples have to be melted and mixed)
- weigh in 1 g of the sample and add 1 g of skim milk powder (see 5.2.)
- 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 occasionally
- centrifuge: at least 10 min / 2500 g / if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter (alternatively: 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl of the filtered supernatant per well in the assay

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 1 day. The extracts can be stored at -20 °C (- 4 °F) for one month.

10. Test implementation

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 an 11fold concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before diluting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in distilled water (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml distilled water, sufficient for 2 microtiter strips).

The wash buffer is provided as a 10fold concentrate. Before 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 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. four weeks.

10.2. Test procedure

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

Do not use more than 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 in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample as duplicates 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 plate 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 diluted conjugate (see 10.1.) 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 plate 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 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 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win.NET(Art. Nr. 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. For quality assurance assay controls should be used.

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

Please note:

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

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

In general:

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

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

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 analysed matrices are described in the updated validation report.

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

the standard material is described in the validation report and can be used for the calculation to protein.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance it is recommended to:

- 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 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, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321