

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Macadamia nut ELISA

REF

DEMACE01



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. GENERAL INFORMATION	3
2. PRINCIPLE OF THE TEST	3
3. PRECAUTIONS	3
4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS.....	3
5. REAGENTS	4
6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED).....	4
7. SAMPLE PREPARATION	5
8. PROCEDURE.....	5
9. CALCULATION OF RESULTS.....	6
10. TYPICAL STANDARD VALUES.....	6
11. PERFORMANCE.....	7
1. ALLGEMEINES	9
2. TESTPRINZIP	9
3. VORSICHTSMAßNAHMEN	9
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN.....	10
5. REAGENZIEN	10
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN	10
7. PROBENVORBEREITUNG.....	11
8. TESTDURCHFÜHRUNG	11
9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
10. TYPISCHE STANDARDKURVE	12
11. TECHNISCHE DATEN	12
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

Sensitivity (Macadamia nut)	0.1 ppm
Recovery	83-106%
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

The Macadamia tree (*Macadamia integrifolia*, *Macadamia tetraphylla*) belongs to the family of Proteaceae. With about 7.9% the fraction of proteins in macadamia nut is relatively low compared to other nuts. Some of these proteins are known for being allergenic. Compared to other nuts these proteins are still slightly characterized. Macadamia nut allergies are relatively seldom, but can be very distinct in particular cases.

For macadamia nut allergic persons hidden macadamia nut allergens in food are a critical problem. Already very low amounts of macadamia nut can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, macadamia nut-allergic persons should strictly avoid the consumption of macadamia nut containing food. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process, is often noticed. This explains why in many cases the existence of macadamia nut residues in food cannot be excluded. For this reason sensitive detection systems for macadamia nut residues in foodstuff are required.

The **Macadamia nut ELISA** represents a highly sensitive detection system for macadamia nut and is particularly capable of the quantification of residues in cookies, cereals, ice-cream, chocolate and sausage.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Macadamia nut** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against macadamia nut proteins is bound on the surface of a microtiter plate. Macadamia nut containing samples or standards are given into the wells of the microtiter plate. After 20 minutes incubation at room temperature the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugated second antibody directed against macadamia nut proteins is given into the wells and after 20 minutes of incubation the plate is washed again. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is terminated by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of macadamia nut is directly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micro-pipets, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are printed on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-macadamia antibodies.
2. **CAL 1 – 5** Macadamia nut Standards (0, 1, 4, 10, 40 ppm of macadamia nut): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-macadamia nut-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (1 N acidic solution): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 10x** Extraction and sample dilution buffer (TRIS): 2 x 120 mL as 10x concentrate, dyed red. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least one week. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
7. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least 4 weeks. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 100 - 1000 µL micropipets
- Volumetric flask
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)
- Plastic bag to store unused microtiter strips.

Reagents

- double distilled water
- Extraction additive for polyphenol containing samples (DEEXSCH2)

7. SAMPLE PREPARATION

Due to high risk of cross-contamination all applied instruments like applicator, mortar, glass vials etc. have to be **cleaned thoroughly** before and after each sample. Macadamia nut proteins could adhere to different surfaces. To identify possible cross-contamination caused by previous extractions it is strongly recommended to note the sequence of the extractions.

The following sample preparation should be applied for all solid samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample drawing, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill, etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 20 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at 2000 g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. 100 µL of particle-free solution are applied per well. If the results of a sample are out of the measuring range, further dilution with the **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer is necessary. The additional dilution has to be considered when calculating the concentration.

The following sample preparation should be applied for liquid samples:

1 mL of liquid sample is diluted in 19 mL of **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

8. PROCEDURE

The washing solution is supplied as 10x concentrate and has to be **diluted** 1+9 with double distilled water before use.

In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and once after the samples. For final interpretation the arithmetic mean is used for calculation.

In consideration of GLP and quality control requirements a duplicate measurement of samples is recommended.

The procedure is according to the following scheme:

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL **ready-to-use** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbances.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-macadamia nut-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (1 N acidic solution) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

The ready-to-use standards are prepared for a direct determination of sample concentrations. **The dilution of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered.** Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ppm on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density (OD) value for each sample, determine the corresponding concentration of macadamia nut in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer software, other methods of data reduction may be employed.

10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The OD% is calculated as percent of the absorption of the 40 ppm standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Macadamia nut (ppm)	OD% of 40 ppm
40	100
10	52
4	29
1	10
0	4

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Macadamia nut test** is 0.1 ppm for the standard curve. Validation experiments with common matrices resulted in the following LODs [ppm].

Cookies	0.2
Cornflakes	0.1
Ice-cream	0.2
Chocolate	0.4
Sausage	0.1

The limit of quantification (LOQ) of the **Macadamia nut test** is 1 ppm.

As matrices can have variable influence on the LOD in specific cases, and the range of matrices that was tested is of course limited, the end user if needed may evaluate its own LOD values depending on the matrices to be analyzed.

Alternatively, any results below LOQ should be just reported quantitatively as "< LOQ".

Precision

Intra-assay Precision	7 %
Inter-assay Precision	3-6%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (cookies, cereals, ice-cream, chocolate and sausage) resulted in a dilution linearity of 102 - 112%.

Cross-reactivity

For the following foods no cross-reactivity could be detected:

Adzuki bean	Crab, cooked	Paprika
Almond	Crab, raw	Pea
Apricot	Cumin	Peach
Barley	Dill	Peanut
Bean, white	Duck	Pecan
Beef, cooked	Egg	Pepper, black
Beef, raw	Eggwhite powder	Pine seed
Bovine gelatin	Ewe's milk	Pistachio
Brazil nut	Fennel	Plum
Buckwheat	Fenugreek	Poppy seed
Cabbage, white	Fish gelatin	Pork
Caraway seeds	Garden cress	Potato
Cardamom	Garlic, fresh	Prawn cooked
Carob gum	Garlic, granulated	Prawn, raw
Carrot	Ginger, ground	Pumpkin seed
Cashew	Ginger, fresh	Radish
Cayenne	Gliadin	Rapeseed
Celery	Goat's milk	Rice
Cherry	Guar gum	Rye
Chervil	Gum arabic	Saccharose
Chestnut	Horseradish	Sesame
Chia	Isinglass	Shrimps
Chicken	Kidney bean	Soy flour
Chickpea	Kiwi	Soy lecithin
Chili	Lamb	Split pea
Cinnamon	Leek	Sunflower seed
Clove	Lentil	Thyme
Cocoa	Lupin	Tofu
Coconut	Mustard, yellow	Tomato
Cod	Nutmeg	Turkey
Corn	Oats	Turmeric
Cow's milk	Onion	Wheat

For the following commodities of the table above the results were between 0.5*LOQ and LOQ of the kit. So, it cannot be completely excluded that these matrices may provide values above the LOQ in specific cases:

Chia	Chili
------	-------

The following cross reactions were determined:

Flaxseed	0.0002%
Hazelnut	0.0001%
Walnut	0.0005%

Recovery

Mean recovery was determined by spiking samples with different amounts of macadamia nut:

Cookies	106%
Cornflakes	104%
Ice-cream	92%
Chocolate	83%
Sausage	101%

Empfindlichkeit (Macadamianuss)	0,1 ppm
Wiederfindung	83-106%
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Der Macadamiabaum (*Macadamia integrifolia*, *Macadamia tetraphylla*) gehört zur Familie der Proteaceae. Die Macadamianuss hat im Vergleich zu anderen Nüssen mit 7,9% einen relativ geringen Proteinanteil. Einige dieser Proteine sind als Allergie-auslösend bekannt, im Vergleich zu anderen Nüssen sind diese jedoch bisher nur geringfügig charakterisiert. Macadamianuss-Allergien sind relativ selten, können aber in Einzelfällen sehr ausgeprägt sein.

Für Macadamianuss-Allergiker sind versteckte Macadamianuss-Proteine in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von Macadamianuss können allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen. Daher müssen Macadamianuss-Allergiker auf den Konsum von Macadamianüssen oder Macadamianuss-haltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Aufgrund von Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln, kann bei einigen Lebensmitteln das Vorhandensein von Macadamianuss-Rückständen nicht ausgeschlossen werden. Um diese detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Macadamianuss Test** stellt ein hoch sensibles Nachweissystem für Macadamianuss dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Rückständen in Keksen, Zerealien, Eis, Schokolade und Wurst geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Macadamianuss Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Macadamianuss-Protein gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Macadamianuss enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Macadamianuss-Protein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Macadamianuss-Protein gerichteter zweiter Antikörper wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Macadamianuss-Konzentration ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Macadamianuss-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Macadamianuss Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 1, 4, 10, 40 ppm Macadamianuss), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Macadamianuss-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL 10x** Extraktions- und Proben-Verdünnungspuffer (TRIS), 2 x 120 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. **WASH SOLN 10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens 4 Wochen haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 100 - 1000 µL Mikropipetten
- Messkolben
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.

Reagenzien

- bidestilliertes Wasser
- Extraktionsadditiv für Polyphenol-haltige Proben (DEEXSCH2)

7. PROBENVORBEREITUNG

Aufgrund der hohen Gefahr von Kreuzkontaminationen müssen alle verwendeten Arbeitsgeräte wie Spatel, Mörser, Glasgefäße, etc. vor und nach jeder Probe **gründlich gereinigt** werden. Macadamianuss-Proteine könnten an den Oberflächen haften. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vorextrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle Arten von festen Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, einer Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchgemischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 20 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wird die Suspension 15 min in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.
3. Die Proben werden bei mindestens 2000 g für 10 min zentrifugiert. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Für den Test werden pro Kavität 100 µL partikelfreie Lösung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für flüssige Proben angewandt werden:

1 mL flüssige Probe wird in 19 mL **verdünntem** Extraktionspuffer verdünnt. Anschließend wird die Suspension für 15 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wird mit Punkt 3 der Feststoff-Extraktion fortgefahren.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bidestilliertem Wasser **verdünnt** werden.

Die **gebrauchsfertigen** Standards sollten in jedem Fall im Doppelansatz bestimmt werden. Bei größeren Mengen von Proben sollten die Standards einmal vor und einmal nach den Proben pipettiert und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen werden.

Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen.

Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Macadamianuss-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ppm (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppm für Macadamianuss abgelesen. **Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Macadamianuss-Gehalt der Probe, die Probenverdünnung ist bereits berücksichtigt.** Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Macadamianuss-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Macadamianuss (ppm)	OD % von 40 ppm
40	100
10	52
4	29
1	10
0	4

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze (LOD) des **Macadamianuss Tests** beträgt 0,1 ppm bezogen auf die Standardkurve. Validierungsexperimente mit gebräuchlichen Matrices resultierten in folgenden unteren Nachweisgrenzen [ppm].

Keks	0,2
Cornflakes	0,1
Eiscreme	0,2
Schokolade	0,4
Wurst	0,1

Die untere Bestimmungsgrenze (LOQ) des **Macadamianuss Tests** beträgt 1 ppm.

Da jede Matrix einen unterschiedlichen Einfluss auf die LOD haben kann und die Bandbreite der getesteten Matrices begrenzt ist, sollte im Bedarfsfall für jede zu untersuchende Matrix eine spezifische LOD ermittelt werden.

Alternativ können alle Ergebnisse unterhalb der LOQ als quantitativ „< LOQ“ angegeben werden.

Präzision

Intra-Assay Präzision	7%
Inter-Assay Präzision	3-6%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Keks, Cornflakes, Eis, Schokolade, Wurst) ergab Verdünnungslinearitäten von 102-112%.

Spezifität

Für die folgenden Nahrungsmittel wurde ein negatives Ergebnis und damit keine Kreuzreaktivität festgestellt:

Adzuki Bohne	Kakao	Pinienkern
Aprikose	Kardamom	Pistazie
Bockshornklee	Karotte	Porree
Bohne, weiß	Kartoffel	Pute
Buchweizen	Kerbel	Raps
Cashew	Kichererbse	Reis
Cayenne	Kidneybohne	Rettich
Chia	Kirsche	Rindergelatine
Chili	Kiwi	Rindfleisch, gekocht
Cumin	Knoblauch, frisch	Rindfleisch, roh
Curcuma	Knoblauch, granuliert	Roggen
Dill	Kokosnuss	Saccharose
Dorsch	Krabbe, gekocht	Schafsmilch
Eiweißpulver	Krabbe, roh	Schälerbse
Ente	Kümmel	Schweinefleisch
Erbse	Kürbiskern	Sellerie
Erdnuss	Lamm	Senf
Fenchel	Linse	Sesam
Fischgelatine	Lupine	Shrimps
Garnele	Maismehl	Soja-Lecithin
Garnele, gekocht	Mandel	Sojamehl
Gartenkresse	Marone	Sonnenblumenkern
Gerste	Meerrettich	Thymian
Gliadin	Mohn	Tofu
Guarkernmehl	Muskatnuss	Tomate
Gummi arabicum	Nelke	Vollei
Hafer	Paprika	Vollmilch
Hausenblase	Paranuss	Weißkohl
Huhn	Pecannuss	Weizen
Ingwer, frisch	Pfeffer, schwarz	Ziegenmilch
Ingwer, gemahlen	Pfirsich	Zimt
Johannisbrotkernmehl	Pflaume	Zwiebel

Für die folgenden Nahrungsmittel der obenstehenden Tabelle waren die Ergebnisse zwischen 0,5xLOQ und LOQ des Test-Kits. Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass diese Matrices in Einzelfällen zu Ergebnissen oberhalb der LOQ führen:

Chia	Chili
------	-------

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:










Flaxseed	0.0002%
Hazelnut	0.0001%
Walnut	0.0005%

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Keks	106%
Cornflakes	104%
Eiscreme	92%
Schokolade	83%
Wurst	101%

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore