

RIDASCREEN[®] FAST Crustacean (2nd generation)

Art. No. R7312

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Crustaceen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
crustacean

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 Crustacean (Art. Nr. R7312) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Crustaceen in Lebensmitteln. 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:	2,0 mg/kg (ppm) Crustaceen
Bestimmungsgrenze:	20 mg/kg (ppm) Crustaceen
Standardsubstanz:	Crustaceen
Spezifität:	Der eingesetzte Antikörper reagiert spezifisch mit Crustaceen-Proteinen (hauptsächlich Tropomyosin). Geringe Kreuzreaktionen zu Senf, Curcuma, Bohnen, Muscheln und Arthropoden.

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.

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.

Produktangebot

Bioavid Crustaceen/Crustacean (Art. Nr. BL616-10 und 25)

SureFood® ALLERGEN ID Crustaceans (Art. Nr. S3112)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Crustacean (Art. Nr. R7312) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Crustaceen, welche als Zutat oder Kontamination in rohen oder gekochten Lebensmitteln vorkommen können.

2. Allgemeines

Crustaceen können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Crustaceen 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.

Als Krustentiere (Crustaceen) gelten Garnele, Krabbe, Shrimp, Krill, Hummer, Languste, Fluss- und Taschenkrebs. Besonders das Muskelprotein Tropomyosin aus Krustentieren kann allergische Reaktionen auslösen, wobei hochgradige Sensibilisierungen nicht selten sind. Allergien gegen Krustentiere treten vermehrt im Erwachsenenalter auf und bleiben oft lebenslang bestehen.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Crustaceen-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Crustaceen-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 Crustaceen-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 Crustaceen Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Crustaceen 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	0,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	20,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	40,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	80,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	160,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		7,0 ml
Substrate/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 können die Crustaceen-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzgläser
- Schüttler
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten

–variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

–destilliertes oder deionisiertes Wasser

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 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 5

9. Probenvorbereitung

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, Glasgefäße oder Spatel müssen vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Allergenreste zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen lösen (Wasserbad 37 °C) und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der 1:10 verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

9.1. Probenaufarbeitung feste Proben

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g einer repräsentativen Probe abnehmen und 20 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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 Probe pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Probenaufarbeitung flüssige Proben

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 ml) homogenisieren
- 1 ml einer repräsentativen Probe abnehmen und 19 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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 Probe pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Das Konzentrat muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 2 - 8°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) verwendet werden, um eine Verzögerung und damit unterschiedliche Inkubationszeiten über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben (mind. 150 µl pro Kavität) werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert und 100 µl werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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 Standard 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 verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat zu allen Kavitäten geben, 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 verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal 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 / 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.

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.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

Bitte beachten

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

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

Generell

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

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. In prozessierten Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden, dies kann die Wiederfindung beeinträchtigen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet, andere Proben können verschiedene Ergebnisse liefern. Alle

Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrizes sind im Validierungsbericht beschrieben.

Der Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung kann zwischen verschiedenen Crustaceen-Spezies variieren. Zusätzlich schwankt die Affinität des eingesetzten Antikörpers leicht von Spezies zu Spezies. Aus diesem Grund können verschiedene Spezies unterschiedliche Ergebnisse liefern, da exemplarische Spezies für die Kalibrierung genutzt worden sind.

Das VITAL Konzept wurde vom Australischen Allergen Bureau als Hilfestellung für die Lebensmittelindustrie bei der Allergenkennzeichnung entwickelt und basiert auf entsprechenden klinischen Studien. Anhand einer Reference Dose wird entschieden, ob ein Lebensmittel entsprechend gekennzeichnet werden sollte. Für Crustaceen wurde eine Reference Dose von 10 mg Crustaceen-Protein festgelegt. Bei einem angenommenen durchschnittlichen Proteingehalt bei Crustaceen von 20 % entspricht dieses einer Reference Dose von 50 mg Crustaceen. Der vorliegende Test ist daher sensitiv genug um eine entsprechende Lebensmittelkennzeichnung nach dem VITAL-Konzept zu ermöglichen.

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
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood[®] durchzuführen
- bei einer Analyse mittels dem ChemWell[®] oder GEMINI Automaten, sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de zu wenden

Für weitere Produktinformationen kontaktieren Sie bitte sales@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 Crustacean

Brief information

RIDASCREEN®FAST Crustacean (Art. No. R7312) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of crustaceans in food.

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:	2.0 mg/kg (ppm) crustacean
Limit of quantification:	20 mg/kg (ppm) crustacean
Standard material:	crustaceans
Specificity:	The antibody specifically detects crustacean-proteins (mainly tropomyosin). Minor cross-reaction was detected with mustard, curcuma, beans, mussels and arthropods.

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.

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 the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

Bioavid Crustaceen/Crustacean (Art. No. BL616-10 und 25)

SureFood® ALLERGEN ID Crustaceans (Art. No. S3112)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Crustacean (Art. No. R7312) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of crustaceans which can be present as ingredient or contamination in raw or cooked food.

2. General

Crustaceans can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed products. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, crustaceans must be declared on food labels as they can induce allergic reactions. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Shrimp, crab, prawns, krill, lobster, langouste and crayfish are described as crustaceans. Especially, the muscle protein tropomyosin can cause allergic reactions, severe sensitizations are not rare. Allergies to crustaceans occur more frequently in adult people and remain there for life.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to crustacean proteins. By adding standards and samples to the wells, crustacean proteins 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 crustacean 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 crustacean concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg crustacean.

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	0.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	20.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	40.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	80.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	160.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Ready to use		7.0 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 crustacean concentrations of samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal glass vials
- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- graduated cylinder
- paper filter
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- if possible multichannel pipette and/or multistep pipette

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water

6. Warnings and precautions

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

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (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).

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 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) 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 allergens and to avoid contamination.

The **Allergen extraction buffer** is provided as a **10fold concentrate**. Before dilution, dissolve possibly formed crystals by heating (water bath 37 °C / 98.6 °F) and mix well. Dilute the heated concentrate 1:10 (1+9) with distilled water (e.g. 100 ml concentrate + 900 ml dist. water). The diluted Allergen Extraction Buffer can be used for approx. 12 weeks at 2 - 8 °C (35.6 – 46.4 °F).

9.1. Sample preparation solid samples

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of a representative sample and add 20 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

9.2. Sample preparation liquid samples

- take 1 ml of a representative sample and add 19 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 2500 g if possible at 4 °C (39 °F) and / or filter the extract (alternatively, 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl extract per well in the assay

Remark:

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days. Extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for several months.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The **Wash Buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °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 three strips (24 wells) at the same time. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one, Cat.-No. 655101) should be used to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples (at least 150 µl for every well) are pipetted into the uncoated plate and then 100 µl are quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate 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). Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the 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 three more times.
6. Add 100 µl 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 / 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.

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.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5.

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 (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 allergen 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, proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery.

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 crustacean species. Furthermore, the affinity of the used antibody varies from species to species. Therefore, different species may produce different results, since exemplary species were used for calibration.

The VITAL concept was developed by the Australian Allergen Bureau as support for the food industry and their allergen labeling based on clinical studies.

The labeling of food is decided on the basis of a reference dose. For crustaceans a reference dose of 10 mg crustacean-protein was determined. Supposing an average protein content for crustacean of 20 %, the reference dose correlates to 50 mg crustacean. Therefore, the available test is sensitive enough for the food labeling according to the VITAL concept.

Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material should in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. To ensure an accurate result spike experiments are recommended
- to perform SureFood[®] PCR for confirmation of the result
- For details using the ChemWell[®] or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

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

The product information folder with further information is available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

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