

r-biopharm®



RIDASCREEN® Egg

Art. No. R6411

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Ei

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of egg

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

In vitro test

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® Egg (R6411) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Hühnerei in Lebensmitteln entwickelt wurde. Stellvertretend für die Warengruppen Backwaren, Süßspeisen, Soßen und Getränke wurden im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Eis, Nudeln, Salatdressing, Wein, Schokolade und Kekse. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays – inklusive Standardlösungen – sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung mit AEP (für 10 Proben) ca. 20 min Probenvorbereitung mit A-AEP für prozessierte Proben (für 10 Proben).....ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit) 50 min
Standardmaterial:	Volleipulver von NIST Referenzmaterial 8445
Nachweisgrenze:	0,13 (0,04 - 0,20) mg/kg (ppm) Volleipulver * * <i>abhängig von der untersuchten Matrix</i>
Bestimmungsgrenze:	0,25 mg/kg (ppm) Volleipulver (entspricht 0,12 mg/kg Gesamteiprotein)
Spezifität:	die spezifischen Antikörper erfassen die Eiklar-Proteine Ovalbumin und Ovomukoid aus Hühnerei. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Gänseei, Wachtelei und Straußenei.

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.

Weitere Produkte für den Nachweis von Ei

RIDASCREEN®FAST Egg (R6402)

RIDASCREEN®FAST Lysozym (R6452)

bioavid Lateral Flow Ei/Egg (BL608-10 und BL608-25)

1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN® Egg (R6411) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay, der zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Hühnerei in Lebensmitteln entwickelt wurde. Stellvertretend für die Warengruppen Backwaren, Süßspeisen, Soßen und Getränke wurden im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Eis, Nudeln, Salatdressing, Wein, Schokolade und Kekse. 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 *Validierungsbericht*. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen.

2. Allgemeines

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

Eiklar enthält etwa 10 - 11 % Protein. Allergologisch von Bedeutung sind vier Hauptallergene, die 80 % des Eiklar-Proteingehaltes ausmachen. Zu den Hauptallergenen zählen Ovomukoid (11 %), Ovalbumin (54 %), Ovotransferrin (12 %) und Lysozym (3,5 %). Die Proteine im Eidotter weisen hingegen nur mäßige Allergenität auf.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Ovalbumin und Ovomuroid beschichtet. Nach Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Ovalbumin und Ovomuroid an die spezifischen Antikörper. Das Ergebnis ist ein Antikörper-Antigen-Komplex. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (Konjugat). Diese binden an die Antikörper-Antigen-Komplexe. Es entstehen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe (Sandwich). Nicht gebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Das

an die Antikörper gebundene Enzym wandelt das Substrat/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 Protein-Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Volleipulver angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Konzentration	Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte		Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	Grün	Konzentrat	10x	100 ml
Extractor 4 Extraktor 4	Blau	Gebrauchsfertig		100 ml
Additive 1 Additiv 1	Blau			2 g
Additive ECO Additiv ECO	Grün			2,5 g
Standard 1 Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg*	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	0,25 mg/kg*	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	0,5 mg/kg*	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	1 mg/kg*	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	2 mg/kg*	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
Stop solution Stopp Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

* Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor **20**, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So kann die Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Waage
- Laborhandschuhe
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. Brand 10742512)
- Wasserbad (60 °C)
- Faltenfilter (Porengröße 8 – 12 µm)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Messzylinder
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. low binding Greiner bio-one Kat. Nr. 655101)
- gegebenenfalls: 8 Kanalpipette 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- pH Meter
- Schüttler
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 5 M Salzsäure (HCl)
- 1 M Natronlauge (NaOH)
- Magermilchpulver (SMP; Lebensmittelqualität; Ei frei)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

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

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

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

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

Die Extraktionspuffer sind ausreichend für die Bestimmung von insgesamt 43 Proben in Doppelbestimmungen.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenextraktion

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich zu reinigen,
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchzuführen.

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. Das Konzentrat 1:10 (1+9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte **Allergen Extraktionspuffer (AEP)** hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C oder 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Der **Extraktor 4** ist final verdünnt und liegt bei 2 - 8° C als Feststoff vor. Vor dem Einsatz muss der Extraktor 4 durch Erwärmen im Wasserbad bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) oder 37° C vollständig in Lösung gebracht werden.

Der **Extraktor Ei** muss am Tag der Extraktion frisch hergestellt werden. Dazu wird 0,5 g **Additive ECO** mit 25 ml **Extraktor 4** versetzt und solange über Kopf geschüttelt bis sich alle Kristalle gelöst haben. Damit sich das Additive ECO besser im Extraktor 4 löst kann die Mischung im Wasserbad bei 37°C erwärmt werden. 25 ml Extraktor Ei genügen zur Extraktion von ca. 25 Proben.

Um den finalen **Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz von Additive 1 (A-AEP)** herzustellen, müssen 1,35 g **Additive 1** in ein Becherglas eingewogen und mit 15 ml 1 M NaOH gelöst werden. Rühren bis sich das Additive 1 gelöst hat. Dann 700 ml verdünnten Allergen Extraktionspuffer (AEP; s.o.) in einen Messzylinder geben. Unter konstantem Rühren die 15 ml Additive 1-Lösung dazugeben, eventuell vorhandene Reste der Additive 1-Lösung mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) aufnehmen und in den Messzylinder überführen. Den mit Additive 1 versetzten Allergen Extraktionspuffer (A-AEP) mit 5 M HCl (ca. 1 ml) auf pH 9 einstellen und mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) auf 750 ml auffüllen.

750 ml A-AEP reichen für ca. 39 Proben. Der Puffer ist ca. drei Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Den A-AEP nicht im Kühlschrank aufbewahren. Den Puffer verwerfen, sobald Kristalle ausfallen. Bei der Herstellung sind saubere Flaschen zu benutzen. Stäube dienen als Kristallisationskeim und sind zu vermeiden.

9.1. Probenextraktion mit Allergen Extraktionspuffer (AEP) für **unprozessierte/unerhitzte** Lebensmittel (z. B. Eis, Wein, Schokolade, Salatdressing)

- AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen

- eine repräsentative Menge der Probe (5 – 50 g) homogenisieren (Schokolade schmelzen oder raspeln) und gut mischen
- 1 g hiervon abnehmen, 0,5 g SMP (Magermilchpulver) hinzugeben und mit 20 ml verdünntem, vorgewärmten Allergen Extraktionspuffer (AEP) versetzen

*Im Falle von **flüssigen Proben** 1 ml Probe mit 0,5 g SMP versetzen und mit 19 ml vorgewärmten AEP mischen.*

- intensiv mischen bis die Probe vollständig suspendiert ist und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren
- abkühlen (z. B. im Eisbad)
- zentrifugieren: 10 min / 2500 x g / möglichst bei 4 °C und / oder filtrieren
- 100 µl des partikelfreien Überstands oder Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

Falls mit dem beschriebenen Zentrifugationsschritt kein partikelfreier Überstand erhalten wird, ist es notwendig, den Überstand noch zu filtrieren; alternativ können auch 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführt und in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden (10 min, 10000 x g).

Alternativ zur Einwaage mit der Probe kann das SMP dem AEP zugefügt werden (0,5 g pro 20 ml AEP). Die Haltbarkeit des SMP-haltigen Puffers beträgt einen Tag.

Die AEP Extrakte sind einen Tag bei 2 - 8 °C oder drei Monate bei – 20 °C haltbar. Falls weitere Verdünnungen notwendig sind werden diese im Allergen-Extraktionspuffer (AEP) mit SMP vorgenommen (0,5 g auf 20 ml AEP).

9.2. Probenextraktion mit Extraktor Ei und Allergen Extraktionspuffer mit Additiv 1 (A-AEP) für **prozessierte/erhitzte** Proben (z. B. Nudeln und Kekse)

- A-AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen
- eine repräsentative Menge der Probe (5 – 50 g) homogenisieren (Schokolade schmelzen oder raspeln) und gut mischen
- 1 g der Probe abnehmen, 0,5 g SMP (Magermilchpulver) hinzugeben und mit 1 ml Extraktor Ei und 19 ml verdünnten, vorgewärmten Allergen Extraktionspuffer mit Additiv 1 (A-AEP; s.o.) versetzen,

*Im Falle von **flüssigen Proben** 1 ml Probe mit 0,5 g SMP versetzen und mit 1 ml Extraktor Ei und 18 ml vorgewärmten A-AEP mischen.*

- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren
- abkühlen (z. B. im Eisbad)
- zentrifugieren: 10 min / 2500 x g / möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren
- 100 µl des partikelfreien Überstands oder Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

Falls mit dem beschriebenen Zentrifugationsschritt kein partikelfreier Überstand erhalten wird, ist es notwendig, den Überstand noch zu filtrieren; alternativ können auch 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführt und in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden (10 min, 10000 x g).

Alternativ zur Einwaage mit der Probe kann das SMP dem A-AEP zugefügt werden (0,5 g auf 19 ml A-AEP). Die Haltbarkeit des SMP-haltigen Puffers beträgt einen Tag.

Die Probenextrakte, aufgearbeitet mit dem A-AEP sind vier Wochen bei 2 - 8 °C oder drei Monate bei -20 °C haltbar. Falls weitere Verdünnungen notwendig sind werden diese mit einer Mischung aus 1 ml Extractor Ei und 19 ml Allergen-Extraktionspuffer (A-AEP) inklusive 0,5 g SMP vorgenommen.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der Waschpuffer liegt als 10fach Konzentrat vor und 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 vier Wochen bei 20 - 25 °C.

10.2. Testdurchführung

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) bearbeitet werden. Dies verhindert einen zeitlichen Verzug durch das Pipettieren und gewährleistet so gleichmäßige Inkubationszeiten. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite, unbeschichtete Platte (siehe 5.1.) als Vorplatte verwendet werden. Alle Standards und Proben werden zunächst in die unbeschichtete Platte

pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert (genau 100 µl).

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

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist 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 in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 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 weitere viermal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und weitere 20 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 weitere viermal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 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 RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden. Zur Qualitätskontrolle sollten Testkontrollen benutzt werden.

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

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{nm}}$) > Standard 5 sollten weiterverdünnt und nochmals bestimmt werden. Falls weitere Verdünnungen notwendig sind werden diese im entsprechenden Allergen-Extraktionspuffer vorgenommen (siehe 9.1 und 9.2).

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Probenvorbereitung gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Allergenkonzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4. Packungsinhalt).

Der Test ist kalibriert gegen das NIST Referenzmaterial 8445 (Volleipulver). Das Ergebnis wird als mg/kg Volleipulver ausgedrückt. Das Referenzmaterial 8445 enthält 49 % +/- 1 % Gesamtprotein. Um das Ergebnis in mg/kg Gesamtprotein umzurechnen wird mit dem Faktor 0,49 multipliziert; für das Ergebnis in mg/kg Eiklar-Protein wird mit dem Faktor 0,263 multipliziert.

Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Allergenkonzentration berücksichtigt werden.

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 aus Ei in einer Probe enthalten sein können.

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

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

Empfehlungen zur Gewährleistung einer hohen analytischen Sicherheit:

Wir empfehlen jeden Probenextrakt in Doppelbestimmung zu analysieren.

Allergenfreie und allergenhaltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen.

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung
Dotierungsversuche durchführen.

Stark saure oder stark alkalische Proben müssen vorab neutralisiert werden.

**Für Informationen zur Durchführung der Analyse mittels Automaten sowie
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.

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

Brief information

RIDASCREEN[®] Egg (R6411) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of native and processed hen's egg in foods. The following foods were examined as representatives of the group of products including baked goods, sweets, sauces, and beverages: ice cream, noodles, salad dressing, wine, chocolate, and cookies. It is expected that this test will also be suited for the analysis of other foods; this needs to be checked by the user.

All reagents for the implementation of the enzyme immunoassay - including standard solutions - are provided in the test kit.

A test kit is sufficient for 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Preparation of samples:	homogenize and extraction
Time requirement:	sample preparation with AEP (for 10 samples).....approx. 20 min sample preparation with A-AEP for processed samples (for 10 samples).....approx. 30 min test implementation (incubation time).....50 min
Standard material:	whole egg powder NIST reference material 8445
Detection limit:	0.13 (0.04 – 0.20) mg/kg (ppm) whole egg powder * * <i>depending on the matrix</i>
Limit of quantification:	0.25 mg/kg (ppm) whole egg powder (equivalent to 0.12 mg/kg whole egg protein)
Specificity:	the used antibodies specifically detect the egg white proteins ovalbumin and ovomucoid from hen's egg. Cross reactivity is given to egg from geese, quails and ostrich.

The cross-reactivities of the antibodies used were determined for pure food (e.g. cornmeal). These cross-reactivities may be different in compound / processed foods (e.g. cornbread). Spiking experiments can be used to detect potentially interfering substances (e.g. polyphenols).

We refer also to the current version of our ELISA manual to increase testing quality in the ELISA method. The manual lists minimum standards for the basic conditions that need to be present when R-Biopharm AG test systems are being

used and ELISA analyses are being done using these test systems. The manual can be found on and printed and saved from our website: <https://food.r-biopharm.com/analytes/food-allergens/>

Related products for the detection of egg

RIDASCREEN®FAST Egg (R6402)

RIDASCREEN®FAST Lysozym (R6452)

bioavid Lateral Flow Ei/Egg (BL608-10 and BL608-25)

1. Intended use

RIDASCREEN® Egg (R6411) is a sandwich enzyme immunoassay developed for the quantitative analysis of native and processed hen's egg in foods. The following foods were examined as representatives of the group of products including baked goods, sweets, sauces, and beverages: ice cream, noodles, salad dressing, wine, chocolate, and cookies. It is expected that this test will also be suited for the analysis of other foods; this needs to be checked by the user. The detection limit and the limit of quantification depend on the respective sample matrix, the extent of processing, and the extraction method. Detailed results on these limits and other information on validation data for other food matrices can be found in our *Validation Report* brochure. In addition, data from interlaboratory comparisons and proficiency tests may be available for some foods.

2. General information

Egg protein can either be present as an ingredient or as contamination in raw or heated foods. Regulation (EU) No. 1169/2011 prescribes that egg must be listed on food labels as a cause of food allergies. Comparable legal regulations are in place in the U.S.A., Canada, Australia, China, New Zealand, and many other countries.

Egg white contains approx. 10% to 11% protein. Allergologically of importance are four main allergens that make up 80% of egg white protein content. The main allergens include ovomucoid (11%), ovalbumin (54%), ovotransferrin (12%), and lysozyme (3.5%). In contrast, the proteins in the egg yolk have only moderate allergenicity.

3. Test principle

The wells in the microtiter strips are coated with specific antibodies against ovalbumin and ovomucoid. After the standard or sample is added, present ovalbumin and ovomucoid binds to the specific antibodies. The result is an antibody-antigen complex. Unbound substances are removed in a washing step. Next peroxidase-coupled antibodies (conjugate) are added. They bind to the antibody-antigen complexes, creating antibody-antigen-antibody (sandwich) complexes. Another washing step removes the unbound conjugate. Detection is done by adding substrate and chromogen. The enzyme bound to the antibody converts the substrate/chromogen into a blue end product. Adding the stop solution causes the color to change from blue to yellow. A spectrophotometric

measurement is taken at 450 nm. Extinction is proportional to the protein concentration in the sample. The result is shown in mg/kg whole egg powder.

4. Reagents provided

The reagents in the kit are sufficient for 96 determinations (including standard analyses).

Component	Lid color	Format	Concentration	Contents
Microtiter plate Mikrotiterplatte		Ready for use		96 wells
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Extractor 4 Extraktor 4	Blue	Ready for use		100 ml
Additive 1 Additiv 1	Blue			2 g
Additive ECO Additiv ECO	Green			2.5 g
Standard 1 Standard 1	Transparent	Ready for use	0 mg/kg*	1.3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Ready for use	0.25 mg/kg*	1.3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Ready for use	0.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Ready for use	1 mg/kg*	1.3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Ready for use	2 mg/kg*	1.3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Red	Ready for use		11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready for use		13 ml
Stop solution Stopp Lösung	Yellow	Ready for use		14 ml

* The concentration data takes into account the dilution factor of **20** resulting from the normal sample preparation. In this way, the sample concentration can be read directly from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- scale
- gloves
- centrifuge, centrifuge reagent tubes (e.g. Brand 10742512)
- water bath (60 °C)
- fluted filter (pore size 8 – 12 µm)
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, ultra-turrax or homogenizer
- graduated pipettes
- graduated cylinder
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- if necessary: a further microtiter plate (e. g. low binding from Greiner bio-one Cat. No. 655101)
- if necessary: 8-channel pipette for 100 µl
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- pH meter
- shaker
- optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- 5 M hydrochloric acid (HCl)
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- skim milk powder (food-grade; egg-free)

6. Warnings and precautions for the users

This test must be carried out only by trained laboratory personnel. Always adhere strictly to the user instructions for carrying out this test.

This kit may contain harmful substances. Please refer to the component safety information in the safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.de.

7. Storage instructions

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

Wait until the film pouch has reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before opening it and removing the microtiter strips to prevent condensation from forming in the wells.

Properly seal unused wells along with the desiccant bag in the film pouch and continue to store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The red-colored substrate/chromogen is photosensitive, so avoid direct exposure to light.

After the expiration date (see expiration on outer label of test kit), the quality guarantee is no longer valid.

Extraction buffers are sufficient for the determination of in total 43 samples in duplicates.

The exchange of individual reagents between kits with different lot numbers is not permitted.

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

Before starting and during the assay wear gloves. Airborne allergens and dirty laboratory equipment may lead to contamination of the assay. Hence it is recommended to take the following precautionary measures:

- clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation,
- carry out the sample preparation on a room isolated from the ELISA procedure

The allergen extraction buffer is a 10fold concentrate. Before dilution of the concentrate, dissolve any crystals that may have formed by heating the

concentrate in a water bath at 37 °C (99 °F) and mixing well. After that dilute the buffer concentrate 1:10 (1+9) with distilled or deionized water (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted **allergen extraction buffer (AEP)** has a shelf life of about 4 weeks at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) or 12 weeks at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Extractor 4 is ready to use and solid at 2 – 8° C (35 - 46 °F). Before use, the extractor 4 must be completely dissolved at room temperature (20 - 25 °C (68 - 77 °F)) or by heating it in a water bath at 37°C (99°F).

The **extractor egg** must be made fresh on the day of the extraction. Mix 0.5 g **additive ECO** with 25 ml **extractor 4** and shake upside down until all crystals have dissolved. In order to dissolve the additive ECO better in the extractor 4, the mixture can be heated in a water bath at 37 °C (99 °F). A volume of 25 ml extractor egg will be enough for the extraction of about 25 samples.

To prepare the final **allergen extraction buffer with the addition of additive 1 (A-AEP)**, 1.35 g **additive 1** need to be weighed in a beaker and dissolved with 15 ml 1M NaOH. Stir until additive 1 is dissolved and add 700 ml diluted allergen extraction buffer (AEP; see above) to a graduated cylinder. Under constant stirring, add the 15 ml of the additive 1 solution, mix any remaining additive 1 solution with diluted AEP, and transfer to the graduated cylinder. Adjust the allergen extraction buffer (A-AEP) containing additive 1 with 5 M HCl (approx. 1 ml) to pH 9 and fill to 750 ml with allergen extraction buffer (AEP).

A volume of 750 ml **A-AEP** is needed for approximately 39 samples and has a shelf life of about three weeks at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) (do **not** store in the refrigerator; the buffer has to be discarded if it crystallizes). Clean bottles should be used during production because dust could be a crystallization source and should be avoided.

9.1. Sample extraction using allergen extraction buffer (AEP) for **unprocessed / unheated** foods (e.g. ice cream, wine, chocolate, salad dressing).

- heat AEP to 60 °C before sample extraction
- homogenize a representative quantity of sample (5 - 50 g) (melt or grate chocolate) and mix well.
- weigh 1 g of sample, add 0.5 g SMP (skimmed milk powder), and mix with 20 ml diluted, preheated allergen extraction buffer (AEP).

*For **liquid samples**, mix 1 ml sample with 0.5 g SMP and add 19 ml preheated AEP.*

- mix thoroughly until the sample is completely suspended and incubate for 10 minutes at 60 °C (140 °F), shaking occasionally.
- cool (e.g. in a water bath with ice).
- centrifuge: 10 min / 2500 x g / preferably at 4 °C (39 °F) and / or filter
- use 100 µl of the particle-free supernatant or filtrate for each well in the test.

If this centrifuge step does not produce particle-free supernatant, the supernatant will need to be filtered; an alternative is to transfer 2 ml extract to a reaction vial and centrifuge in a microcentrifuge (10 minutes, 10000 x g).

As an alternative to weighing the SMP to the sample, the SMP can be added to the AEP (0.5 g per 20 ml AEP). The shelf life of the buffer with SMP is one day.

The AEP extracts can be stored for one day at 2 - 8 °C (35 – 46 °F) or for three months at -20 °C (-4 °F). If additional dilutions are necessary, they will be done in the allergen extraction buffer (AEP) with SMP (0.5 g per 20 ml AEP).

9.2. Sample extraction with extractor egg and allergen extraction buffer with additive 1 (A-AEP) for **processed / heated** samples (e.g. noodles and cookies).

- heat A-AEP to 60 °C before sample extraction
- homogenize a representative quantity of sample (5 - 50 g) (melt or grate chocolate) and mix well
- weigh 1 g sample, add 0.5 g SMP (skimmed milk powder), and mix with 1 ml extractor egg and 19 ml diluted, preheated allergen extraction buffer with additive 1 (A-AEP; see above).

*For **liquid samples**, mix 1 ml sample with 0.5 g SMP, and add 1 ml extractor egg and 18 ml preheated A-AEP.*

- mix thoroughly and incubate for 10 minutes at 60 °C (140°F), shaking occasionally.
- cool (e.g. in a water bath with ice).
- centrifuge: 10 min / 2500 x g / preferably at 4 °C (39 °F) and/or filter
- use 100 µl of the particle-free supernatant or filtrate for each well in the test.

If this centrifuge step does not produce particle-free supernatant, the supernatant will need to be filtered; an alternative is to transfer 2 ml extract to a reaction vial and centrifuge in a microcentrifuge (10 minutes, 10000 x g).

As an alternative to weighing the SMP to the sample, the SMP can be added to the A-AEP (0.5 g per 19 ml A-AEP). The shelf life of the A-AEP with SMP is one day.

The sample extracts prepared with A-AEP can be stored for four weeks at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) or for three months at -20 °C (-4 °F). If additional dilutions are necessary, they will be done in a mixture of 1 ml extractor egg and 19 ml A-AEP including 0.5 g SMP.

10. Test procedure

10.1. Test preparation

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

The wash buffer is a tenfold concentrate and must be diluted 1:10 (1+9) with distilled water prior to use (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). Prior to dilution, make sure that any crystals that may have formed are completely dissolved by heating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer has a shelf life of four weeks at 20 - 25 °C (68 - 77 °F).

10.2. Test procedure

No more than three microtiter strips (24 wells) should be processed for each assay. This prevents a time delay due to pipetting and ensures equal incubation times. If more than three strips are used, a second, uncoated plate (see 5.1.) should be used as a preplate. Next pipette all standards and samples into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and transfer quickly to the coated plate using an 8-channel pipette (exactly 100 µl).

It is recommended to use a multi-channel or multi-stepper pipette for pipetting the conjugate, the substrate/chromogen, and the stop solution to prevent a time delay over the plate.

Carefully follow the recommended washing procedure. Prevent the wells from drying out between the steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Write down the positions of the standards and samples.
2. Pipette 100 µl of the standard and 100 µl of the prepared sample into the respective wells in duplicate, and incubate for 20 minutes 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) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Wash each well using 250 µl diluted wash buffer (see 10.1). Repeat this process another four times.
4. Pipette 100 µl conjugate each into the respective wells, and incubate for another 20 minutes 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) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Wash each well using 250 µl diluted wash buffer (see 10.1). Repeat this process another four times.
6. Pipette 100 µl substrate/chromogen into the wells, and incubate in the dark for 10 minutes at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
7. Pipette 100 µl stop solution into each well and mix carefully by hand. Measure the extinction at 450 nm within 10 minutes after adding the stop solution.

11. Evaluation

For the evaluation, R-Biopharm offers specially developed software for the RIDASCREEN® enzyme immunoassays: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996). The evaluation should be done using 4-parameter function. The course of the standard curve can be taken from the enclosed certificate of analysis. Test control samples should be used for quality control.

Higher absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve than the data on the certificate, especially for the zero standard, can indicate inadequate washing or contamination.

Samples with absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) higher than Standard 5 should be further diluted and redetermined. If further dilutions are necessary, they will be done in the respective allergen extraction buffer (see 9.1 and 9.2).

Please note:

For work after the said preparation of samples, the dilution factor is 20. The allergen concentration can be taken directly from the standard curve (the sample dilution factor 20 was already factored into the concentration data of the standards; see 4. Reagents provided).

The test is calibrated against the NIST reference material 8445 (whole egg powder). The result is expressed as mg/kg whole egg powder. Reference material 8445 contains 49 % +/- 1 % total protein. Multiply by a factor of 0.49 to convert the result into mg/kg total protein; multiply by a factor of 0.263 for the result in mg/kg egg white protein.

If further dilution is needed, the additional dilution factor must be factored into the calculation of the allergen concentration.

General notes:

A negative result does not rule out allergen contamination below the detection limit of this test or that a sample may contain other allergen components, e.g. egg lipids.

Given the large variety of foods, matrix effects cannot be ruled out. Processed foods can contain modified and / or fragmented proteins (e.g. from heating or drying); the presence of these proteins can affect recovery / cross-reactivity. Spiking experiments are recommended.

An exemplary sample was used to determine cross-reactivity in each case; other samples may produce different results. All cross-reactivities and exemplarily analyzed matrices are described in the *Validation Report* document.

Recommendations for ensuring high analytical reliability:

We recommend analyzing every sample extract in duplicate.

Use allergen-free and allergen-containing (spiked) samples as test control samples.

Carry out spiking experiments to make sure the determination was performed correctly and without errors.

Highly acidic and highly alkaline samples must be neutralized in advance.

For information on how to carry out the analysis using automated systems and for additional product information, contact us at info@r-biopharme.de.

The data corresponds to our present state of knowledge and provides information on our products and their uses. It should therefore not be construed as guaranteeing specific properties of the products described or their suitability for a particular application. R-Biopharm makes no warranty of any kind, except that the reagents are of standard quality. Defective products will be replaced. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly from the use of the products.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Mailing Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

Email: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com