

r-biopharm®



RIDASCREEN® Total Gluten

Art. No. R7041

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gluten

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gluten

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® Total Gluten (R7041) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von intaktem (nicht hydrolysiertem) Gluten aus glutenhaltigem Getreide (Weizen, Roggen und Gerste) in Hafer und Haferprodukten.

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 Cocktail (patented) (für 10 Proben) ca. 2 h Testdurchführung (Inkubationszeit) 50 min
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist ein Gesamtglutenextrakt aus vier Weizensorten. Die Ergebnisse mit diesem Standardmaterial sind rückführbar auf die Haferproben beschrieben in AOAC SMPR® 2017.021.
Nachweisgrenze:	4 mg/kg (ppm) Gluten in Abhängigkeit von der untersuchten Matrix
Bestimmungsgrenze:	5 mg/kg (ppm) Gluten
Spezifität:	Die eingesetzten monoklonalen Antikörper erkennen Gliadine aus Weizen und vergleichbare Prolamine aus Roggen und Gerste, High-Molecular-Weight (HMW) Glutenin-Subunits (GS) aus Weizen und HMW-Secaline aus Roggen sowie Low-Molecular-Weight (LMW)-GS aus Weizen (siehe auch 2.). Es sind keine Kreuzreaktivitäten bekannt.

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 Gliadin/Gluten

RIDASCREEN® Gliadin (R7001)

RIDASCREEN® FAST Gliadin (R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)

RIDASCREEN® FAST Gliadin Sensitive (R7051)

Cocktail (patented) (R7006/R7016)

Cocktail ECO (R7080)

RIDA® Extraction Solution (colorless) (R7098)

Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (R7012)

RIDA® QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)

SureFood® Allergen Gluten (S3606)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Total Gluten ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von intaktem (nicht hydrolysiertem) Gluten aus glutenhaltigem Getreide (Weizen, Roggen und Gerste) in Hafer und Haferprodukten.

2. Allgemeines

Traditionell werden die Getreideproteine entsprechend ihrer Löslichkeit unterteilt (Osborne Fraktionierung):

Löslich in	Fraktion
Wasser	Albumine (keine Glutenproteine)
0,5 M NaCl	Globuline (keine Glutenproteine)
60% Ethanol	Prolamine (Glutenproteine)
Unlöslich in 60% Ethanol	Gluteline (Glutenproteine)

Leider ist jedoch eine Unterteilung entsprechend der Löslichkeit kein genaues Kriterium, da es immer zu Co-Löslichkeit und Co-Präzipitation kommt. Weiterhin spielen Faktoren wie die Temperatur eine große Rolle. Insbesondere die Unterteilung der Prolamine und Gluteline, die zusammen als Glutenproteine bezeichnet werden, ist anhand der Löslichkeit nur schwer möglich. Daher ist die moderne Unterteilung der Glutenproteine in verschiedene Proteinfamilien entsprechend der elektrophoretischen Mobilität und der Aminosäuresequenzen wesentlich genauer.

Durch große Sequenzhomologien zwischen den Glutenproteinen sowohl innerhalb einer Getreidespezies als auch zwischen den Getreidespezies und durch die Kombination von vier verschiedenen monoklonalen Antikörpern ist mit dem RIDASCREEN® Total Gluten die Detektion fast aller Glutenproteine möglich:

Weizen			
Proteinfamilie	Fraktion	Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein*	Primär reagierend mit
α/β-Gliadine	Vorwiegend Prolamine	33%	R5 Antikörper
γ-Gliadine	Vorwiegend Prolamine	27%	R5 Antikörper
ω1,2-Gliadine	Vorwiegend Prolamine	4%	R5 Antikörper
ω5-Gliadine	Vorwiegend Prolamine	3%	R5 Antikörper (schwach)
LMW-Glutenin-Subunits	Vorwiegend Gluteline	22%	LMW 1 & 2 Antikörper
HMW-Glutenin-Subunits	Vorwiegend Gluteline	11%	HMW Antikörper

Roggen			
Proteinfamilie	Fraktion	Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein*	Primär reagierend mit
ω-Secaline	Vorwiegend Prolamine	18%	R5 Antikörper
γ-40k-Secaline	Prolamine und Gluteline	25%	R5 Antikörper
γ-75k-Secaline	Prolamine und Gluteline	48%	R5 Antikörper
HMW Secaline	Vorwiegend Gluteline	9%	HMW Antikörper

Gerste			
Proteinfamilie	Fraktion	Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein*	Primär reagierend mit
B-Hordeine	Vorwiegend Prolamine	27%	R5 Antikörper
C-Hordeine	Vorwiegend Prolamine	36%	R5 Antikörper
γ-Hordeine	Vorwiegend Prolamine	32%	R5 Antikörper
D-Hordeine	Vorwiegend Gluteline	5%	Keine Detektion

* Deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung in unterschiedlichen Sorten des jeweiligen Getreides sowie der Erntejahren möglich. Angaben aus Wieser et al. Celiac Disease and Gluten (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, Seite 107

Weizenmehl und Gluten werden häufig wegen ihrer Hitzestabilität und aufgrund ihrer nützlichen Eigenschaften bezüglich Konsistenz, Feuchtigkeitsspeicherung und Geschmack bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979) gibt es zwei "Stufen" für die Bezeichnung von Lebensmitteln hinsichtlich ihres Glutengehaltes:

- 1) "Glutenfrei" sind Lebensmittelprodukte, die den Grenzwert von 20 mg/kg Gluten einhalten.
- 2) Produkte gekennzeichnet mit "sehr geringer Glutengehalt" dürfen mehr als 20 und höchstens 100 mg Gluten pro kg enthalten.

Der Grenzwert von 20 mg/kg Gluten wurde in viele nationale Gesetzgebungen übertragen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Glutenproteine beschichtet. Nach Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Gluten 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 Gluten-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Konzentration	Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte		Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	Transparent	Gebrauchsfertig		110 ml
Standard 1 Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg Gluten*	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	5 mg/kg Gluten*	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	10 mg/kg Gluten*	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	20 mg/kg Gluten*	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	40 mg/kg Gluten*	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Transparent	Gebrauchsfertig	80 mg/kg Gluten*	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 1000, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So kann die Glutenkonzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. Brand 10742512)
- Schüttler
- Wasserbad (50 °C)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Laborhandschuhe
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagenzien:

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Gluten-freies Magermilchpulver (Lebensmittelqualität)
- Cocktail (patented); Art. Nr.: R7006 (105 ml) bzw. R7016 (1000 ml)
- Ethanollösung (80 %): d.h. 120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml destilliertem Wasser gut mischen

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.

Für den Umgang mit Ethanol wird auf die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers verwiesen.

Da der Cocktail (patented) β -Mercaptoethanol enthält, wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten.

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.

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 6

9. Probenextraktion

Luftgetragene Getreidestäube und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Glutenkontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die im Folgenden genannten Vorkehrung zu treffen. Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen.

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40-60 % Ethanol oder 40-60 % 2-Propanol reinigen
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA[®]QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005) auf Gliadin-/Glutenkontamination überprüfen
- Es wird empfohlen **unter einem Abzug** zu arbeiten, da der Cocktail (patented) β -Mercaptoethanol enthält
- β -Mercaptoethanol kann im ELISA stören; deshalb die Proben mindestens 1:1000 verdünnen
- Bei Proben, die während der Aufarbeitung gelatinieren, versuchen, diese mit einem sauberen Spatel zu homogenisieren

9.1. Allgemeine Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016) für Hafer und Haferprodukte

- Die Glutenverteilung in Haferproben kann sehr inhomogen sein; zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren; deshalb mindestens 200 g Probe zerkleinern und gut homogenisieren
- 1 g Probe hiervon in ein geeignetes Gefäß überführen (z. B. zentrifugierbares Reagenzröhrchen mit Deckel) und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen; dabei auf eine einheitliche Suspendierung der Probe achten

- 30 ml 80 % Ethanol (siehe 5.2.) zugeben, Gefäß verschließen und gut mischen; dabei auf eine einheitlich Suspendierung der Probe achten
- Bei sehr inhomogenen Proben kann die Probeneinwaage erhöht werden (> 1 g). In diesem Fall müssen die Volumina an Cocktail (patented) und 80% Ethanol entsprechend erhöht werden. Auf die Auswahl eines entsprechend großen Gefäßes achten (z. B. Nalgene Flasche 250 ml).*
- 40 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren
 - 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen
 - Zentrifugieren des Extraktes : 10 min, mind. 2500 g, bei Raumtemperatur (20 - 25 °C); alternativ kann der Extrakt auch filtriert werden
 - Den partikelfreien Überstand in ein verschließbares Röhrchen überführen
- 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 g).*
- Für die Testung im ELISA den Extrakt 1:25 (40 µl + 960 µl) mit Puffer weiter verdünnen: der finale Verdünnungsfaktor ist 1000
 - Innerhalb von 30 min 100 µl des verdünnten Extrakts pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016) für tannin- und polyphenolhaltige Haferprodukte (z. B. mit hohem Anteil an Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Teffmehl, Buchweizen, Hirse oder Gewürzen)

- Die Glutenverteilung in Haferproben kann sehr inhomogen sein; zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren; deshalb mindestens 200 g Probe zerkleinern und gut homogenisieren
 - 1 g Probe hiervon in ein geeignetes Gefäß überführen (z. B. zentrifugierbares Reagenzröhrchen mit Deckel), 1 g Magermilchpulver zugeben und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen; dabei auf eine einheitlich Suspendierung der Probe achten
 - 30 ml 80 % Ethanol (siehe 5.2.) zugeben, Gefäß verschließen und gut mischen; dabei auf eine einheitlich Suspendierung der Probe achten
- Bei sehr inhomogenen Proben kann die Probeneinwaage erhöht werden (> 1 g). In diesem Fall müssen die Volumina an Cocktail (patented) und 80% Ethanol sowie die Menge Magermilchpulver entsprechend erhöht werden. Auf*

die Auswahl eines entsprechend großen Gefäßes achten (z. B. Nalgene Flasche 250 ml).

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren
 - Danach 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen
 - Zentrifugieren des Extraktes : 10 min, mind. 2500 g, bei Raumtemperatur (20 - 25 °C); alternativ kann der Extrakt auch filtriert werden
 - Den partikelfreien Überstand in ein verschließbares Röhrchen überführen
- 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 g).*
- Für die Testung im ELISA den Extrakt 1:25 (40 µl + 960 µl) mit Puffer weiter verdünnen: der finale Verdünnungsfaktor ist 1000
 - 100 µl des verdünnten Extrakts pro Kavität innerhalb von 30 min im Test einsetzen

Anmerkung zu 9.1. und 9.2.:

Nach der Zentrifugation ist der Überstand bzw. das Filtrat unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln haltbar.

Falls Proben eine höhere Extinktion als Standard 6 zeigen, sollten die Proben stärker verdünnt und erneut im ELISA eingesetzt werden. Hierzu den Extrakt wie unter 9.1 und 9.2 beschrieben nochmals frisch 1:25 mit Puffer verdünnen.

Anschließend den so verdünnten Probenextrakt mit der folgenden Mischung weiter verdünnen:

- 1% Cocktail (patented)
- 3% einer 80%igen Ethanollösung
- 96% Puffer

Dies entspricht z. B. 50 µl Cocktail (patented), 150 µl 80% Ethanol und 4800 µl Puffer.

Bei Verwendung dieser Mischung bleibt die Zusammensetzung des Probenmediums entsprechend der Extraktion nach 9.1 oder 9.2 erhalten.

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

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

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 (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) 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.

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.

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 zweimal 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 zweimal 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 30 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. Im Dokument „Compliance Criteria“, welches auf Anfrage erhältlich ist, sind Kriterien zur Beurteilung der Standardkurve enthalten. 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 Gluten-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 6 sollten weiterverdünnt und nochmals bestimmt werden. Hierzu unbedingt den Puffer für die Probenweiterverdünnung herstellen (siehe Anmerkung zu 9.1. und 9.2.).

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Probenvorbereitung gilt der Verdünnungsfaktor 1000. Die Glutenkonzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (der Probenverdünnungsfaktor 1000 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4. Packungsinhalt).

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

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Glutenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Komponenten, wie z. B. Stärke, 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. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten 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 Validierungsbericht beschrieben.

Empfehlungen zur Gewährleistung einer hohen analytischen Sicherheit:

Bei der Durchführung des Tests ist die angegebene Temperatur von 20 - 25 °C einzuhalten. Abweichungen hiervon können die Wiederfindung des Analyten beeinflussen.

Jeden Probenextrakt in Doppelbestimmung analysieren.

Glutenfreie und glutenhaltige (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.

Ergebnisse mittels PCR (z. B. SureFood® Allergen Gluten, Art. Nr. S3606) bestätigen.

Bei der Herstellung von Lebensmitteln wie z. B. Bier und Sauerteig werden Proteine fragmentiert. Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für fragmentierte Proteine vermindert. Daher müssen diese Proben mit einem kompetitiven ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021), analysiert werden.

Weitere Applikationen:

Keine

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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®] Total Gluten

Brief information

RIDASCREEN[®] Total Gluten (R7041) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of intact (non-hydrolyzed) gluten from gluten containing cereals (wheat, rye and barley) in oat and oat products.

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

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

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation with Cocktail (patented) for 10 samples..... approx. 2 h test implementation (incubation time)50 min
Standard material:	The RIDASCREEN [®] standard material is a total gluten extract from four wheat varieties. The results with this standard material are traceable to the oat samples described in the AOAC SMPR [®] 2017.021.
Limit of detection:	4 mg/kg (ppm) gluten depending on the tested sample matrix
Limit of quantification:	5 mg/kg (ppm) gluten
Specificity:	The used monoclonal antibodies detect gliadins from wheat and corresponding prolamins from rye and barley, high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits (GS) from wheat and HMW-secalins from rye as well as low-molecular-weight (LMW)-GS from wheat (see also 2.).

There are not any known cross reactivities.

Cross reactivities of the antibodies used have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

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 for gliadin/gluten determination

RIDASCREEN® Gliadin (R7001)
RIDASCREEN® FAST Gliadin (R7002)
RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)
RIDASCREEN® FAST Gliadin Sensitive (R7051)
Cocktail (patented) (R7006 or R7016)
Cocktail ECO (R7080)
RIDA® Extraction Solution (colorless) (R7098)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (R7012)
RIDA® QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)
SureFood® Allergen Gluten (S3606)

1. Intended use

RIDASCREEN® Total Gluten is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of intact (non-hydrolyzed) gluten from gluten containing cereals (wheat, rye and barley) in oat and oat products.

2. General

Traditionally, cereal proteins are subdivided according to their solubility (Osborne fractionation):

Soluble in	Fraction
Water	Albumins (non gluten proteins)
0.5 M NaCl	Globulins (non gluten proteins)
60% Ethanol	Prolamins (gluten proteins)
Insoluble in 60% Ethanol	Glutelins (gluten proteins)

Unfortunately, the subdivision according to solubility is not an accurate criterion, since co-solubilization and co-precipitation occur frequently. Furthermore, additional factors such as temperature can have a high influence on the result. Especially the subdivision into prolamins and glutelins (which form together the gluten proteins) according to their solubility is very difficult. Therefore, the modern subdivision of the gluten proteins into protein families according to their electrophoretic mobility and their amino acid sequences is much more accurate.

Due to high sequence homologies between gluten proteins within one cereal species and between different species and due to the combination of four different monoclonal antibodies, the RIDASCREEN® Total Gluten enables the detection of almost all gluten proteins:

Wheat			
Protein family	Fraction	Mean content of gluten protein*	Primarily reactive with
α/β-gliadins	Mainly prolamins	33%	R5 antibody
γ-gliadins	Mainly prolamins	27%	R5 antibody
ω1,2-gliadins	Mainly prolamins	4%	R5 antibody
ω5-gliadins	Mainly prolamins	3%	R5 antibody (weak)
LMW-glutenin-subunits	Mainly glutelins	22%	LMW 1 & 2 antibody
HMW-glutenin-subunits	Mainly glutelins	11%	HMW antibody

Rye			
Protein family	Fraction	Mean content of gluten protein*	Primarily reactive with
ω-secalins	Mainly prolamins	18%	R5 antibody
γ40k-secalins	Prolamins and glutelins	25%	R5 antibody
γ75k-secalins	Prolamins and glutelins	48%	R5 antibody
HMW secalins	Mainly glutelins	9%	HMW antibody

Barley			
Protein family	Fraction	Mean content of gluten protein*	Primarily reactive with
B-hordeins	Mainly prolamins	27%	R5 antibody
C-hordeins	Mainly prolamins	36%	R5 antibody
γ-hordeins	Mainly prolamins	32%	R5 antibody
D-hordeins	Mainly glutelins	5%	No detection

* Significant differences between different cultivars of the respective cereal and harvest years possible. Data from Wieser et al. Celiac Disease and Gluten (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, page 107

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common because of their heat stability and useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavor. Coeliac disease is a permanent intolerance to gluten that results in damage to the small intestine and is reversible when gluten is avoided by diet.

According to the Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979), two categories for labeling of food according to the gluten content exist:

- 1) Food products which contain less than 20 mg/kg gluten can be labeled as "gluten-free".
- 2) Food products labeled as "very low gluten" can have a gluten content above 20 and up to 100 mg/kg gluten.

The threshold of 20 mg/kg gluten has been adopted by national legislations in many countries.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against gluten proteins. After adding the standard solutions or samples to the wells, present gluten will bind to the specific antibodies. The result is an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are removed in a washing step. Then, antibodies conjugated to peroxidase are added. These conjugates are bound to the antibody-antigen-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugates are then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. The bound conjugate converts the substrate/chromogen into a blue product. Addition of 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 gluten concentration of the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Concentration	Volume
Microtiter plate		Ready to use		96 wells
Buffer	Transparent	Ready to use		110 ml
Standard 1	Transparent	Ready to use	0 mg/kg gluten*	1.3 ml
Standard 2	Transparent	Ready to use	5 mg/kg gluten*	1.3 ml
Standard 3	Transparent	Ready to use	10 mg/kg gluten*	1.3 ml
Standard 4	Transparent	Ready to use	20 mg/kg gluten*	1.3 ml
Standard 5	Transparent	Ready to use	40 mg/kg gluten*	1.3 ml
Standard 6	Transparent	Ready to use	80 mg/kg gluten*	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Ready to use		11 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 ml
Stop Solution	Yellow	Ready to use		14 ml

* The dilution factor 1000 from the sample preparation has already been considered when labeling the standards. Therefore, the gluten concentration 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 vials (e.g. Brand 10742512)
- Shaker
- Water bath (50 °C / 122 °F)
- Laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Graduated pipettes
- Variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- Gloves
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagents:

- Distilled or deionized water
- Gluten-free skim milk powder (food quality)
- Cocktail (patented); Art. No.: R7006 (105 ml) or R7016 (1000ml)
- Ethanol solution (80 %): i.e. add 120 ml ethanol p.a. to 30 ml distilled water and shake well

6. Warnings and precautions for the users

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

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Regarding the handling of ethanol, please refer to the safety instructions of the respective manufacturer.

The Cocktail (patented) contains β-mercaptoethanol. It is recommended to work under a chemical hood

7. Storage instructions

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

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Any bluish coloration of the reddish substrate/chromogen before pipetting into microplate wells
- A value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 6

9. Preparation of samples

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

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment with 40 - 60 % ethanol or 40 - 60 % 2-propanol
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure
- Check for gliadin / gluten contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA[®]QUICK Gliadin (R7003, R7004, or R7005)
- It is recommended to **work under a chemical hood**, because of β-mercaptoethanol in the Cocktail (patented)
- β-mercaptoethanol can disturb the ELISA; therefore, dilute the samples at least 1:1000
- Try to homogenize with a clean spatula if samples gelatinizing during preparation

9.1. General extraction with the Cocktail (patented) (R7006 / R7016) for oat and oat products

- The gluten distribution in oat samples can be very inhomogeneous; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, grind and homogenize well at least 200 g
- Weigh in 1 g hereof to a sufficient vial (e.g. centrifugal vials with lid) and add 10 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well; pay attention to obtain a homogeneous suspension
- Add 30 ml 80 % ethanol (see 5.2.), close the vial, and mix well; pay attention to obtain a homogeneous suspension

The weighted sample can be further increased (>1 g) in case of very inhomogeneous samples. The volume of Cocktail (patented) and 80% ethanol must be increased accordingly. Choose a properly sized vial (e.g. Nalgene bottle 250 ml).

- Incubate for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Centrifugation of the extract: 10 min, at least 2500 g, at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F); alternatively, the extract can be filtered
- Put the particle-free supernatant into a screw top vial for further processing or storage (see remark below)

If it is not possible to achieve a particle-free supernatant with the described centrifugation, it will be necessary to filter the supernatant additionally; alternatively, 2 ml of the extract can be transferred into a reaction tube and centrifuged by using a microcentrifuge (10 min, 10000 g).

- Dilute the sample 1:25 (40 µl + 960 µl) for ELISA testing with the buffer from the test kit: the final dilution factor is 1000
- Use 100 µl per well of the diluted extract within 30 min for ELISA testing

9.2. Extraction with the Cocktail (patented) (R7006 / R7016) for tannin- and polyphenol-containing oat products (e.g. oat products with high content of chocolate, coffee, cocoa, chestnut flour, teff flour, buckwheat, millet or spices)

- The gluten distribution in oat samples can be very inhomogeneous; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, grind and homogenize well at least 200 g

- Weigh in 1 g thereof to a sufficient vial (e.g. centrifugal vials with lid), add 1 g skim milk powder and additionally 10 ml of the Cocktail (patented); close the vial and mix well; pay attention to obtain a homogeneous suspension
- Add 30 ml 80 % ethanol (see 5.2.), close the vial and mix well. Please pay attention to obtain a homogeneous suspension

The weighted sample can be further increased (>1 g) in case of very inhomogeneous samples. The volume of Cocktail (patented) and 80% ethanol as well as the amount of skim milk powder must be increased accordingly. Choose a properly sized vial (e.g. Nalgene bottle 250 ml).

- Incubate for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- Centrifugation of the extract: 10 min, at least 2500 g, at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F); alternatively, the extract can be filtered
- Put the particle-free supernatant into a screw top vial for further processing or storage (see remark below)

If it is not possible to achieve a particle-free supernatant with the described centrifugation, it will be necessary to filter the supernatant additionally; alternatively, 2 ml of the extract can be transferred into a reaction tube and centrifuged by using a microcentrifuge (10 min, 10000 g).

- Dilute the sample 1:25 (40 µl + 960 µl) for ELISA testing with the buffer from the test kit: the final dilution factor is 1000
- Use 100 µl per well of the diluted extract within 30 min for ELISA testing

Remark for 9.1. and 9.2.:

The undiluted supernatant obtained after centrifugation or the filtrate can be stored in a tightly closed vial in the dark at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) for up to two weeks.

If samples have a higher absorbance than standard 6, they should be further diluted and retested in the ELISA. For this, dilute the extract again 1:25 with buffer as described in 9.1 and 9.2. Then perform the additional dilution of the diluted sample extract with the following buffer:

- 1% Cocktail (patented)
- 3% of an 80% ethanol solution
- 96% buffer

This equals to e.g. 50 µl Cocktail (patented), 150 µl 80% ethanol and 4800 µl buffer.

Using this buffer, the composition of the sample medium is identical to that used for extraction as described in 9.1 or 9.2.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The washing 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 any crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for four weeks.

10.2. Test procedure

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

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. This avoids a shift by pipetting and guarantees consistent incubation times. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) should be used as a pre-plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate first (at least 150 µl per well) and then quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or sample to separate duplicate wells and incubate for 20 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) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two additional times.

4. Add 100 µl of the conjugate to each well and incubate for 20 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 diluted wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two additional times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well 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 30 min after addition of stop solution.

11. Results

Special software RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996) is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a 4-parameter function. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit. The document 'Compliance Criteria' which is available upon request provides criteria for evaluation of standard curves. For quality assurance, assay controls should be used.

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

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6. Please use the buffer mentioned for further sample dilution (see remark for 9.1. and 9.2.).

Please note:

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 1000. The gluten concentration can directly be read from the standard curve (the sample dilution factor of 1000 is already taken into account (see 4. Reagents provided).

For sample dilutions of more than 1:1000, the additional dilution factor must be considered for calculation of the gluten concentration.

In General:

Samples tested negative may still contain a gluten contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other components such as starch for example.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery/cross reactivity. When analyzing a non-validated matrix (see validation report), it is recommended to verify the results by spiking experiments.

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.

Recommendations for guarantee of high analytical performance:

Adhere to the specified temperature of 20 - 25 °C (68 - 77 °F) when running the assay. Deviations hereof may influence the analyte recovery.

Each sample extract should be analyzed in duplicate.

Use also gluten free and gluten containing (spiked) samples as test controls.

To ensure an accurate result, spike experiments are recommended.

Strong acidic or alkaline samples have to be neutralized prior to analysis.

Confirm results with PCR (e.g. SureFood[®] Allergen Gluten, Art. No. S3606).

In the production of foods such as beer or sourdough, proteins are fragmented. In sandwich ELISAs protein fragments lead to a reduced recovery. Such samples must be analyzed with a competitive ELISA test systems like the RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021).

Further applications:

–None

Details about automated assay procedures and further product information are available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

The data correspond to our present state of technology and provide 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