



RIDASCREEN®FAST Milk

REF R4652

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Milchprotein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of milk protein



In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard

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

Auftragsannahme

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA®, RIDASCREEN® und RIDASOFT®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA®, RIDASCREEN® and RIDASOFT®
are registered trademarks of R-Biopharm AG.
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Das Testkit ist ausreichend für maximal 48 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben).....ca. 45 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf das Referenzmaterial NIST RM 1549a Vollmilchpulver kalibriert
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,7 mg/kg Milchprotein
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg Milchprotein entspricht 7,1 mg/kg Magermilchpulver
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Casein und β -Lactoglobulin aus der Kuhmilch. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch. Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der in diesem Test eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. 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 <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Milchprotein

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612)

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912)

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. Nr. 4901)

Bioavid Lateral Flow Milch / Milk (Art. Nr. BL623-15)

Bioavid Lateral Flow Casein incl. Hook Line (Art. No. BLH714-15)

RIDA® Extraktor 2 (Art. Nr. R4613)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein in Lebensmitteln, die Milch oder Milchpulver enthalten können. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Produktkategorien im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Kekse, Babynahrung, Schokolade, Eis und Wurst.

Generell sollte das Testkit innerhalb der methodischen Grenzen (siehe Kapitel 13) auch für die Analyse weiterer Lebensmittel verwendbar sein. Die Eignung ist im Einzelfall vom Anwender und vor Verwendung des Testkits durch entsprechende Experimente zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse zu den untersuchten Lebensmitteln, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrixen entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Eine Nahrungsmittelallergie ist definiert als eine nachteilige immunologische Reaktion auf ein Nahrungsprotein wie Erdnuss oder Ei. Allergien sind IgE-vermittelte Fehlfunktionen des Immunsystems. Im Gegensatz dazu wird eine Nahrungsmittelunverträglichkeit, wie die Laktoseintoleranz, durch den Mangel an bestimmten Enzymen verursacht (= Stoffwechselerkrankung). Antikörper sind an der Entstehung der Krankheit nicht beteiligt. Die Milchallergie ist von der Laktoseintoleranz zu unterscheiden: Bei der Intoleranz werden die Symptome durch eine bestimmte Zuckerart (Milchzucker, Laktose) ausgelöst, bei der Allergie jedoch durch bestimmte Proteine in der Milch verursacht. Die Milchallergie ist eine Allergie im klassischen Sinne, d.h. das Immunsystem bekämpft eine für den Körper eigentlich harmlose Substanz und es treten allergische Symptome auf. Milch wird direkt, als Getränk oder als verarbeitetes Produkt wie Sahne, Butter, Joghurt oder Käse verzehrt. Kuhmilchpulver wird häufig in Backwaren, Soßen und Desserts verwendet.

Kuhmilch enthält 3,2 % Proteine, die zu etwa 10 % aus β -Lactoglobulin (Leitprotein der Molke) und zu 80 % aus Caseinen bestehen. Casein ist hitzestabil, während β -Lactoglobulin hitzeempfindlich ist. Die meisten Milchallergiker sind gegen beide Proteinfractionen in der Milch allergisch. Das wichtigste Allergen für Kinder ist β -Lactoglobulin, während die Caseine später bei Erwachsenen dominant werden. Das Allergen kann als Zutat oder als Kontamination in rohen und gekochten / prozessierten Produkten vorhanden sein. Nach der **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Milch und Milchprodukte auf Lebensmitteletiketten deklariert werden. Ähnliche Regelungen gibt es z. B. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Milch enthält ca. 3,2 % Milcheiweiß. Eine Probe, die 1 mg/kg Milcheiweiß enthält, entspricht somit einem Milchgehalt von ca. 31 mg/kg Milch.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Casein-Proteine und β -Lactoglobulin-Proteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandene Milch-Proteine an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidase-gekoppelten Casein- und β -Lactoglobulin Antikörper in einer Konjugat-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-

Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Eine Substrat/Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben und inkubiert. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung, die proportional zur Milchprotein-Proteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Milch-Protein angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		48 Kavitäten
3 x Extractor 2 3 x Extraktor 2	Blau	Konzentrat	2x	30 ml
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	Grün	Konzentrat	10x	100 ml
Additive 1 Additiv 1	Blau			2 g
Standard 1* Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	2,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	7,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	22,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	67,5 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Conjugate buffer Konjugat-Puffer	Schwarz	Gebrauchsfertig		7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

* Die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 100, der sich aus der Probenvorbereitung nach Kapitel 9 ergibt. So können die Milchprotein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (60 °C und 100 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 μ m)
- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200 μ l und 200 - 1000 μ l Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 μ l
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2. Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- 1 M Natronlauge (NaOH)
- 1 M Salzsäure (HCl)
- Gegebenenfalls: Bovines Serum Albumin (BSA, z. B. Serva, Fraction V, Protease frei, Art. Nr. 11926)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, sowie gegebenenfalls zusätzliche Platte zum Vorpipettieren, siehe Kapitel 10.2) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Der Extraktor 2 enthält β -Mercaptoethanol. Es wird empfohlen, **unter einem Abzug** zu arbeiten. Hautkontakt ist zu vermeiden (Handschuhe tragen!).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoff-verordnung etc.).

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) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten.
- Absorption kleiner 1,2 ($A_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 5.

9. Probenvorbereitung

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 durchführen.

Die Proben bis zur Aufarbeitung kühl und lichtgeschützt lagern.

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

Der Allergen Extraktionspuffer liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vor der Verdünnung durch Erwärmen (Wasserbad 37 °C) zu lösen. Anschließend das Konzentrat gut mischen. Das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der **verdünnte Allergen Extraktionspuffer (AEP)** hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C. Aktuelle Daten zeigen, dass der AEP alternativ bis zu vier Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden kann (nicht Bestandteil des AOAC *Performance Tested Methods*SM (PTM) Approvals).

Der AEP wird für die Verdünnung der gewonnenen Extrakte benötigt. Für die Extraktverdünnung von Matrices, die Pinien-, Sonnenblumen- oder Kürbiskerne enthalten, muss der verdünnte AEP zusätzlich mit BSA versetzt werden (finale Konzentration: 2,5 %; z. B. 10 ml verdünnter AEP + 0,25 g BSA (= **BSA-AEP**)).

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

750 ml A-AEP reichen für ca. 45 Proben aus. Der Puffer ist ca. 3 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar (**nicht** im Kühlschrank aufbewahren). Den Puffer verwerfen, sobald Kristalle ausfallen. Die Kristallbildung kann

bereits nach 10 Tagen einsetzen. Deshalb empfehlen wir, den Puffer wöchentlich frisch anzusetzen. Alternativ kann auch eine geringere Menge A-AEP von z.B. 375 ml hergestellt werden. Bei der Herstellung eines geringeren A-AEP Volumens ist die beschriebene Zusammensetzung entsprechend einzuhalten. Bei der Herstellung sind saubere Flaschen zu benutzen. Stäube dienen als Kristallisationskeime und sind zu vermeiden.

Stellen Sie sicher, dass der A-AEP rechtzeitig im 60 °C Wasserbad erhitzt wird (das 100 °C Wasserbad wird für die Extraktion der Proben verwendet).

Der **Extraktor 2** liegt als 2fach Konzentrat vor und muss 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 30 ml Extraktor 2 + 30 ml dest. Wasser). Der komplett verdünnte Extraktor 2 ist ausreichend für 15 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C). Weiterer Extraktor 2 kann bei R-Biopharm unter der Artikelnummer R4613 bestellt werden.

Im folgenden Abschnitt werden folgende Abkürzungen verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer
- A-AEP: AEP mit Zusatz von Additiv 1

9.1. Extraktion

Den A-AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen.

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 4 ml verdünntem Extraktor 2 (siehe Kapitel 9) versetzen, das Gefäß verschließen und gut mischen.
- Für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen (falls ein Klumpen entsteht, muss dieser in der noch warmen Flüssigkeit durch Schütteln des Gefäßes gelöst werden).
- Probe kurz auf der Laborbank abkühlen lassen (1 - 2 min).
- 16 ml (bzw. 15 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten A-AEP (siehe Kapitel 9) zu der gekochten Probe geben.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren.
- Probe im Eisbad kurz abkühlen lassen (3 - 5 min).
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren.

Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig $> 10.000 \times g$ zentrifugieren.

- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C für den Rest des Tages aufbewahrt werden. Nicht verwendete Extrakte können darüber hinaus unverdünnt einen Monat bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Die mit Extraktor 2 hergestellten Extrakte müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit AEP verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2). Die verdünnten Probenextrakte sind nur begrenzt haltbar und müssen innerhalb von 30 Minuten im Test eingesetzt werden.
- Falls nach einer ersten Testung höhere Verdünnungen der Extrakte notwendig werden (Proben mit Absorptionswerten ($A_{450 \text{ nm}}$) $>$ Standard 5), sollte hierfür folgender Puffer verwendet werden, um die Zusammensetzung des Extraktes gleich zu halten:

A-AEP	16 ml
Extraktor 2	2 ml
Dest. Wasser	2 ml

Anschließend erfolgt die normale Verdünnung mit AEP (siehe Kapitel 10.2).

Anmerkung

Die mittels Extraktor 2 und A-AEP erhaltenen Extrakte können auch im RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) und im RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612) eingesetzt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Konjugat-Puffer mischen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Konjugat-Puffer verdünnt werden (z. B. 2 ml Konjugat-Puffer + 200 μ l Konzentrat, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Pufferkonzentrat). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 20 - 25 °C. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2. Testdurchführung

Die mit Extraktor 2 und A-AEP hergestellten Extrakte müssen vor dem Einsatz im Test 1:5 (1+4) mit AEP (siehe Kapitel 9) verdünnt werden (z. B. 400 µl AEP + 100 µl Probe).

Einzelne Proben, die mit Extraktor 2 und A-AEP extrahiert wurden (z. B. Mais oder Maisprodukte, Pinien-, Sonnenblumen- oder Kürbiskerne), können im ELISA unspezifische Matrixeffekte hervorrufen. Um diese zu vermeiden, können solche Probenextrakte vor dem Einsatz im Test 1:5 mit BSA-AEP (siehe Kapitel 9) verdünnt werden (z. B. 400 µl BSA-AEP + 100 µl Probe). Hierfür wird der verdünnte AEP mit BSA (finale Konzentration: 2,5 %) versetzt: z. B. 10 ml verdünnter AEP + 0,25 g BSA.

Die verdünnten Probenextrakte sofort (innerhalb von 30 Minuten) im Assay verwenden. Ein längerer Zeitraum kann die Wiederfindung beeinflussen.

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 (siehe Kapitel 5.1) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und hiervon dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanalpipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

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 nach Kapitel 9 extrahierten und nach 10.2 verdünnten Proben als Doppelbestimmung 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
6. Je 100 µl rot gefärbtes 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 durch leichtes Schütteln der Platte mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 min¹ nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

¹ Aktuelle Daten zeigen, dass eine Messung bis zu 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung möglich ist (nicht Bestandteil des AOAC *Performance Tested Methods*SM (PTM) Approvals). Für das AOAC-PTM Approval war eine Messung innerhalb von 10 min vorgegeben.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung kann mittels 4-Parameter- oder Cubic-Spline-Funktion erfolgen. Eine einmal gewählte Auswertemethode sollte beibehalten und nicht zwischen den beiden Funktionen gewechselt werden. Aufgrund der verwendeten Mathematik kann mittels Cubic- Spline-Funktion keine Konzentration außerhalb des Messbereichs (< Standard 2 bzw. > Standard 5) berechnet werden. Die 4-

Parameter-Funktion ermöglicht auch die Berechnung von Werten zwischen Standard 1 und Standard 2 (siehe auch Kapitel 13). Die 4-Parameter Auswertung ist nicht Bestandteil des AOAC-PTM Approvals. Für das AOAC-PTM Approval wurde die Cubic-Spline-Funktion verwendet.

Das Ergebnis des Tests wird in mg Milchprotein pro kg Lebensmittel angegeben und gibt somit eine Proteinkonzentration an.

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift ist der Verdünnungsfaktor der Proben 100. Da ein Probenverdünnungsfaktor von 100 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4*), kann die Milchprotein-Konzentration direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Proben mit Absorptionswerten ($A_{450\text{nm}}$), die größer Standard 5 sind, sollten zur exakten Bestimmung der Kontamination zusätzlich verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat, CoA) entnommen werden, das über den QR-Code auf dem Testkit-Außenetikett erhältlich ist. Da die Absorptionswerte im Labor von den auf dem Zertifikat genannten abweichen können, wird empfohlen, die Verhältnisse der Standards zueinander mit denen auf dem Zertifikat zu vergleichen. Hierfür werden die B/B_{max} -Werte (das Verhältnis der Absorptionswerte der Standards zum höchsten Standard) miteinander verglichen. Diese sollten im aktuellen Testlauf ähnlich zu den Verhältnissen der Standards auf dem Zertifikat sein.

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird und auch nicht dem Vorgehen für das AOAC Approval entspricht. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist bei einer Durchführung in Einzelbestimmung mit einer höheren Ungenauigkeit und bei

Wiederholungstestungen mit einer höheren Schwankung der Ergebnisse zu rechnen.

12. Interpretation der Ergebnisse

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

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Je nach untersuchter Matrix können auch unterhalb des LoQ noch Werte mit ausreichender Präzision ($VK < 30\%$) ermittelt werden. Grundsätzlich sind Werte in diesem Bereich aber aufgrund der höheren Schwankungsbreite des Tests mit einer größeren Unsicherheit versehen. Sofern die Präzision des Tests mit einer bestimmten Probenmatrix nicht validiert wurde, sollten Ergebnisse unterhalb des Messbereichs deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ "< LoQ" angegeben werden. Weitere Informationen hierzu können Sie dem aktuellen Validierungsbericht entnehmen.

Ein Ergebnis unterhalb der LoD schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Allergenkomponenten, wie z. B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können. Die Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend formuliert werden.

13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse bemerkbar macht. Hierdurch können besonders Proben, die an den charakteristischen Grenzen der Methode (LOD, LOQ, obere Grenze des Messbereichs) liegen, zwischen den Bereichen der Kalibrationskurve wechseln.

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere

Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ± 1 % gegeben.

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven / erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Generell können bei immunologischen Testmethoden gegebenenfalls Matrixeffekte durch die Zugabe von Fremdprotein (abhängig vom Test z. B. BSA, Gelatine, Magermilchpulver) während der Extraktion unterdrückt werden. Der Einfluss der Zugabe auf die Wiederfindung sollte durch Dotierversuche überprüft werden.

Die unter Kapitel 10.2 genannte Empfehlung zum Einsatz von BSA ist in diesem Sinne nur dann anzuwenden, wenn ein Matrixeffekt tatsächlich vorliegt. Sie ist auch nicht auf die genannten Proben beschränkt, sondern als grundsätzliche Empfehlung für Proben mit Matrixeffekt zu verstehen.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und / oder fragmentiert werden. Dies kann die Wiederfindung und Testergebnisse beeinträchtigen.

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des im Tests verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln auch erst in Erscheinung treten oder aber verloren gehen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Lebensmittel wurde jeweils eine repräsentative Probe verwendet. Andere Proben der gleichen

Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle analysierten Kreuzreaktivitäten sind im Validierungsbericht beschrieben.

Detaillierte Ergebnisse sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen.

Anmerkungen:

Unterschiedliche Milchbestandteile wie Milchpulver, Molke (β -Lactoglobulin), Caseinate, etc. werden Lebensmittelprodukten zugesetzt. RIDASCREEN®FAST Milk ist auf Magermilchpulver kalibriert. Daher gilt, wenn das untersuchte Lebensmittel:

- Magermilchpulver, Vollmilchpulver oder Milch enthält, sind die ELISA Ergebnisse quantitativ.
- Molke (β -Lactoglobulin) enthält, können die ELISA Ergebnisse unterbewertet sein.
- Caseinate enthalten, können die ELISA Ergebnisse unterbewertet sein.

Wenn ein quantitatives Ergebnis für Casein und / oder β -Lactoglobulin erforderlich ist, dann sollten die Proben mit RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612) und / oder RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) untersucht werden.

Bei einem Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze, können im Lebensmittel noch weitere Milchbestandteile (z. B. Zucker wie Lactose) vorhanden sein.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, die in Normen wie EN 15633-1 und EN 15842 aufgeführt sind (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen) zu befolgen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Mitnahme von Testkontrollen zur Qualitätskontrolle und Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung. Hierfür sind Allergen-freie und Allergen-haltige (dotierte) Proben zu verwenden. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben kann es notwendig sein, den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für fragmentierte Proteine vermindert, daher sollten entsprechende Proben mit einem kompetitiven ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4901), analysiert werden.
- Für die Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu kontaktieren.

15. Weitere Applikationen

- Extraktion von stark flüssigkeitsabsorbierenden Matrices mit RIDA® Extraktor 2 (Art. Nr. R4613).
- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing Methode für die qualitative Analyse von Allergenen in der Produktionslinie oder für Laborgeräte.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2015-07-06	Freigabeversion
2021-07-01	Vorherige Version
2021-11-15	Vorherige Version
2025-10-20	Vorherige Version
2026-01-14	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: – Kapitel 11: Hinweis zur Auswertung mit 4-Parameter-Funktion

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM-DD)



Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellenseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDASCREEN®FAST Milk

Brief information

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of milk protein in food validated for the method (see chapter 1).

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 45 min test implementation (incubation time).....30 min
Standard material:	The RIDASCREEN® standard material is calibrated to the reference material NIST RM 1549a whole milk powder
Limit of detection: (matrix-dependent)	0.7 mg/kg (ppm) milk protein
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) milk protein corresponds to 7.1 mg/kg (ppm) skim milk powder
Specificity:	The antibodies used specifically detect caseins and β -lactoglobulin of cow's milk. There is cross-reactivity to sheep's, goat's and buffalo's milk. Further information are contained in the validation report.

Cross-reactivities of the used antibodies used for this test kit have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In composed / processed food (e.g. maize bread) cross-reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spiking experiments (see chapter 13).

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related products for milk protein determination

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912)

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. 4901)

Bioavid Lateral Flow Milch / Milk (Art. No. BL623-15)

Bioavid Lateral Flow Casein incl. Hook Line (Art. No. BLH714-15)

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) is a sandwich enzyme immunoassay test developed for the quantitative analysis of milk proteins in food, which may contain milk or milk powder. Due to the large number of different food products, the following samples were examined representative for different food product categories within the scope of the test development: cookies, infant formula, chocolate, ice cream and sausage.

The test kit should generally be able to provide usable results for other foods within the methodological limits (see chapter 13). In individual cases, the user must check the suitability of the test kit by carrying out appropriate experiments before use.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to our brochure validation report. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we make available in our application notes (see chapter 15).

2. General information

Food allergy is defined as an adverse immunologic response to a dietary protein like peanut or egg. Allergies are IgE-mediated dysfunctions of the immune system. In contrast, food intolerance like lactose intolerance is caused by lack of certain enzymes (= metabolic disease). Antibodies are not involved

in the disease's development. The allergy to milk is to be distinguished from the lactose intolerance: In the case of intolerance, the symptoms are caused by a certain type of sugar (milk sugar, lactose), in the case of allergy, however, by certain proteins in the milk. Milk allergy is an allergy in the classic sense, e.g. the immune system fights a substance that is actually harmless to the body and allergic symptoms arise. Milk is consumed directly, as a drink, or as a processed product such as cream, butter, yogurt or cheese. Cow's milk powder is widely used in baked goods, sauces and dessert.

Cow's milk contains 3.2 % proteins which consist of approx. 10 % β -lactoglobulin (leading protein of whey) and 80 % caseins. Casein is heat-stable, while β -lactoglobulin is heat-sensitive. Most milk allergy sufferers are allergic to both protein fractions in milk. The most important allergen for children is β -lactoglobulin while the caseins become to be dominant later in adults. The allergen can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked / processed products. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011** milk and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Milk contains approx. 3.2 % milk protein. Thus, a sample which contains 1 mg/kg milk protein corresponds to a milk content of approx. 31 mg/kg milk.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against casein-proteins and β -lactoglobulin-proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, milk proteins present in the sample will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Following the washing step, a solution containing casein- and β -lactoglobulin antibodies conjugated to peroxidase is added. This conjugate binds to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution which is proportional to the milk proteins concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg milk proteins.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for a maximum of 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
3 x Extractor 2	Blue	Concentrate	2x	30 mL
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 mL
Additive 1	Blue			2 g
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 mL
Standard 2*	Transparent	Ready to use	2.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 3*	Transparent	Ready to use	7.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 4*	Transparent	Ready to use	22.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 5*	Transparent	Ready to use	67.5 mg/kg	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 mL
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 mL
Conjugate buffer	Black	Ready to use		7 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

* The dilution factor 100, which results after sample preparation in chapter 9, has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the milk protein concentrations of the samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 μ m)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 μ L and 200 - 1000 μ L micropipettes

- If necessary: a further microtiter plate (e.g. universal binding, breakable MTP from Thermo Fisher Scientific Art. No. 95029390 or low binding Greiner bio-one Art. No. 655901)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2. Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- If necessary: bovine serum albumin (BSA, e.g. Serva, fraction V, protease free, Art. No. 11926)

6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. 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 (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate and pre-plate, if necessary, see chapter 10.2). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross-contamination.

The Extractor 2 is harmful to health. It contains mercaptoethanol. It should be worked **under a chemical hood** and skin contact should be avoided (use gloves!).

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

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.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation.
- Value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 5.

9. Preparation of Samples

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne allergens and dirty laboratory equipment may lead to contamination of the assay. Therefore, please notice the following recommendations:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.

The samples should be stored in a cool place and protected against light before extraction.

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

The Allergen extraction buffer is provided as a 10-fold concentrate and must be diluted prior use. Before dilution of the buffer concentrate, dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99 °F) completely and mix well. After that, dilute the heated buffer concentrate 1:10 (1+9) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer concentrate). The **diluted Allergen extraction buffer (AEB)** is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks. Current data show

that the AEB can alternatively be stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) for up to four weeks (not part of the AOAC *Performance Tested Methods*SM (PTM) approvals).

The AEB is required for the dilution of the extracts. For the dilution of matrices containing pine, sunflower or pumpkin seeds, the diluted AEB must be additionally mixed with BSA (final concentration: 2.5 %; e.g. 10 mL diluted AEB + 0.25 g BSA (= **BSA-AEB**)).

For the preparation of the final **Allergen extraction buffer containing Additive 1 (A-AEB)**, weigh 1.35 g of Additive 1 in a glass beaker and add 15 mL 1 M NaOH. Stir until the Additive 1 is solved. Then, fill 700 mL diluted AEB (see above) in a measuring cylinder. Add the 15 mL Additive 1 solution by stirring constantly. Transfer any residues of the Additive 1 solution into the measuring cylinder by rinsing with diluted AEB. Adjust the Additive 1 containing Allergen extraction buffer (A-AEB) to pH 9 with 1 M HCl and fill up to 750 mL with diluted AEB.

750 mL A-AEB are sufficient for 45 samples. The buffer can be used for approx. 3 weeks at room temperature 20 - 25 °C (68 - 77 °F) (do **not** store in the refrigerator!). Discard the buffer if crystals are present. Crystal formation may begin after 10 days. We therefore recommend preparing a fresh buffer solution every week. Alternatively, a reduced volume of the A-AEB of e.g. 375 mL can be prepared. When preparing a smaller volume of A-AEB, the composition described above must be adhered to accordingly. Use clean bottles when preparing the buffer. Particles of dust can initiate crystallization.

Make sure to heat the A-AEB in time in the 60 °C (140 °F) water bath (the 100 °C / 212 °F water bath is used for the extraction of the samples).

The **Extractor 2** is provided as 2fold concentrate and has to be diluted 1:2 (1+1) with dist. water (e.g. 30 mL Extractor 2 + 30 mL dist. water). The complete diluted Extractor 2 is sufficient for 15 samples and can be used for approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Additional Extractor 2 can be ordered at R-Biopharm with the article number R4613.

In the following section, the following abbreviations are used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer
- A-AEB: AEB with addition of Additive 1

9.1. Extraction

Heat the A-AEB to 60 °C (140 °F) before sample extraction.

Homogenize a representative, adequately big amount of a solid sample (e.g. 50 g; grind it thoroughly to powder and mix well) or mix well a sample in case of liquid foods.

- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 mL) of homogenized sample to a new vial, add 4 mL prepared Extractor 2 (see chapter 9), close the vial and mix well.
- Cook it for 10 min at 100 °C (212 °F) in a water bath (if a lump forms, it must be dissolved in the still warm liquid by shaking the vial).
- Let the sample cool down shortly on the lab bench (1 - 2 min).
- Add 16 mL (or 15 mL in case of liquid samples) pre-heated A-AEB (see chapter 9.1) to the cooked sample.
- Mix vigorously (e.g. vortexer).
- Extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down shortly in ice water (3 - 5 min).
- Filter sample or centrifuge for 10 min at $> 2,500 \times g$; if possible at 4 °C (39 °F).

Alternatively: transfer 2 mL of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed ($> 10,000 \times g$) for 10 min in a microcentrifuge.

- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at 2 - 8 °C until used in the test (on the same day). Unused extracts can also be stored undiluted at -20 °C (-4 °F) for one month.
- For use in the test, the extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) must be diluted with AEB (for dilution see chapter 10.2). The diluted sample extracts have a limited shelf life and must be used in the test within 30 minutes.
- If further dilutions are required (samples with absorbance values ($A_{450 \text{ nm}}$) $>$ Standard 5), these extract dilutions must be made before dilution with AEB or BSA-AEB for test use (see chapter 10.2).
- For these dilutions, the following buffer should be used to keep the composition of the extract constant:

A-AEB	16 mL
Extractor 2	2 mL
Dest. water	2 mL

This is followed by the normal dilution with AEB (see chapter 10.2).

Remark

Sample extracts with Extractor 2 and A-AEB can also be used both in the RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) and in the RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612) assays.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in conjugate buffer (e.g. 2 mL conjugate buffer + 200 μ L conjugate, sufficient for 2 microtiter strips).

The **wash buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer concentrate). 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 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for 4 weeks.

Kit components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2. Test procedure

The extracts prepared with Extractor 2 and A-AEB must be diluted 1:5 (1+4) with AEB (see chapter 9) before usage (e.g. 400 μ L AEB + 100 μ L sample).

Individual samples extracted with Extractor 2 and A-AEB (e.g. corn or corn products, pine, sunflower or pumpkin seeds) may produce non-specific matrix effects in the ELISA. To avoid these, such sample extracts can be diluted 1:5 with BSA-AEB (see chapter 9) before use in the test (e.g. 400 μ L BSA-AEB + 100 μ L sample). For this purpose, the diluted AEB is mixed with BSA (final concentration 2.5 %): e.g. 10 mL diluted AEB + 0.25 g BSA.

Use the diluted sample extracts immediately (within 30 minutes) in the assay. A longer time period may influence the recovery.

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 a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µL per well) and then exactly 100 µL are 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.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore, cover the microtiter plates.

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 extract (prepared according to chapter 9 and diluted according to chapter 10.2) in duplicate to the wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat three more times (a total of four wash cycles).
4. Add 100 µL of the diluted conjugate (see chapter 10.1) to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat three more times (a total of four wash cycles).
6. Add 100 µL of the reddish 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 10 min¹ after addition of stop solution.

¹ Current data show that measurement is possible up to 30 min after addition of the stop solution (not part of the AOAC *Performance Tested Methods*SM (PTM) approval). For the AOAC-PTM approval, a measurement within 10 min was specified.

11. Evaluation

A special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter or cubic spline function. Once an evaluation method has been selected, it should be retained and not be switched between the two functions. Due to its mathematical background, the cubic spline function cannot calculate concentrations outside the measuring range (< standard 2 and > standard 5). The 4-parameter function enables the calculation of values between standard 1 and standard 2 (refer to chapter 13). The 4-parameter evaluation is not part of the AOAC-PTM approval. For AOAC-PTM approval, the cubic spline function was used.

The test result is calculated in mg milk-protein per kg of food and thus indicates the protein concentration.

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 100. Hence, a dilution factor of 100 is already taken into account with the standard concentrations (see chapter 4*), the milk-protein concentration can directly be read from the standard curve.

A further sample dilution and new determination is recommended for samples with an absorption ($A_{450\text{nm}}$) > standard 5. In case of further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the result.

It must be clarified that all quality criteria are met for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the quality assurance certificate (certificate of analysis, CoA), which is available via the QR code on the test kit label. As the absorbance values in the laboratory may differ from those stated on the certificate, it is recommended to compare the ratios of the standards to each other with those on the certificate. For this purpose, the B/B_{max} values (the ratio of the absorbance values of the standards to the highest standard) are compared with each other. In the current test run, these should be comparable to the ratios of the standards on the certificate.

The assay can be also evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not

consistent with standards like EN 15633-1 and EN 15842 and also does not correspond to the procedure for the AOAC Approval. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, when performed as a single determination, a higher degree of inaccuracy can be expected, and when performing repeated tests, a higher degree of variation in the results can be expected.

12. Result interpretation

Higher absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) of the calibration curve, especially for the zero standard, as mentioned on the certificate may be a result of insufficient washing or a hazelnut contamination of reagents.

Results between LoD and LoQ indicate a low allergen concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision ($\text{CV} < 30\%$). However, values in this range are generally subject to greater uncertainty due to the higher fluctuation range of the test. If the precision of the test has not been validated with a specific sample matrix, results below the measuring range should therefore not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the validation report.

A result below the LoD does not exclude an allergen contamination below the detection limit of the assay, or that other allergen components, such as lipids, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range resulting in higher variation. This may cause a switch of results between the different areas of the calibration curve especially at the test characteristic boundaries (LOD, LOQ, upper limit of measurement range).

An incorrect weight of the sample to be analyzed will have a 1:1 effect on the measurement result (e.g. a 10 % higher concentration is measured with a weigh in of +10 %). A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max $\pm 1\%$.

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product categories could be validated due to the large number of foods. When analyzing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results obtained by means of spike experiments. If necessary, a validation of the sample matrix of interest will need to be performed.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive / increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments.

In general, matrix effects in immunological test methods can be suppressed by adding foreign protein (depending on the test, e.g., BSA, gelatin, skim milk powder) during extraction. The influence of the addition on recovery should be checked by spiking experiments.

The recommendation for the use of BSA mentioned under chapter 10.2 should only be applied if a matrix effect is actually present. It is also not limited to the samples mentioned, but is to be understood as a basic recommendation for samples with matrix effect.

In processed foods (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented and this may have an impact on the recovery and assay results.

Cross-reactivities are side reactions of the antibody used for preparing the test kit with antigen showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with antigens from closely related species. In contrast to matrix effects, it is a specific reaction of the antigen with the antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as the actual analyte. In single cases, cross-reactivities can be lost or only become apparent through the processing of foods.

For evaluation of the cross-reactivity only one representative sample was analyzed, other samples may show a different result. All analyzed cross-reactivities are described in the validation report.

For detailed results and further information for other food matrices, please refer to the current validation report. In addition, data on individual foods may be available from comparative laboratory tests and inter-laboratory comparisons.

Remarks:

Different milk components like milk powder, whey (β -lactoglobulin), caseinates, etc. are added to food products. RIDASCREEN®FAST Milk is calibrated to skim milk powder. Therefore, if the analyzed food contains:

- Skim milk powder, whole milk powder or milk, then the ELISA results are quantitative.
- Whey (β -lactoglobulin), then the ELISA results may be underestimated.
- Caseinates, then the ELISA results may be underestimated.

If a quantitative result for caseins and / or β -lactoglobulin is requested, the sample should be tested in the RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612) and / or the RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912).

If the result is below the detection limit, further milk constituents (e.g. sugars like lactose) may be present in the food sample.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance, we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in standards like EN 15633-1 and EN 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control and control and ensurance of an accurate and correct test procedure. Allergen-free and allergen-containing (spiked) samples should be used. An example of a spike experiment is given in the validation report.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjust the sample's pH value (pH 6.5 to 7.5) to neutral prior to extraction may be necessary.
- The recovery for fragmented proteins is reduced in sandwich ELISA, such samples should be analyzed with a competitive ELISA test systems like the RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. R4901).
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- Sample extraction for heavily liquid absorbing matrices using RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613).

- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing method for the qualitative analysis of allergens in the production line or for laboratory equipment.

Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2015-07-06	Release version
2021-07-01	Previous version
2021-11-15	Previous version
2025-10-20	Previous version
2026-01-14	Current version Changes made: – Chapter 11: Note regarding evaluation with 4-parameter function

Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM-DD)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM-DD)



Manufacturer + address

Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code ("BGB") R-Biopharm AG provides a limited warranty ("Gewährleistung") against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.
ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm's own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
 - a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
 - b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
 - c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
 - d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG's liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG's sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser's expenses, losses, or damages from loss of goodwill, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements ("Gewährleistung") implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpretation is not intended.

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:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321