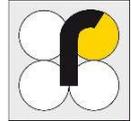


r-biopharm®



RIDASCREEN® β -Lactoglobulin

REF R4901

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von β -Lactoglobulin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of β -lactoglobulin

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® β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von intaktem und fragmentiertem β -Lactoglobulin in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

Für den Nachweis von nativem und thermisch prozessiertem β -Lactoglobulin wird empfohlen, den RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) bzw. den RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) anzuwenden.

Für den Nachweis von Casein oder Caseinaten in Lebensmitteln werden der RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612) bzw. der RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) empfohlen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Das Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 2 h 45 min
Standardmaterial:	β -Lactoglobulin von SIGMA Aldrich (Art. Nr. L8005)
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	1,4 mg/kg β -Lactoglobulin* 0,9 - 2,1 mg/kg β -Lactoglobulin *Mittelwert
Bestimmungsgrenze:	5 mg/kg β -Lactoglobulin
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch β -Lactoglobulin der Kuhmilch. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch.

Kreuzreaktivitäten bestehen zu folgenden Substanzen:

β -Lactoglobulin	100 %
α -, β -, κ -Casein	< 1 %
α -Lactalbumin	< 1 %
Rinderserumalbumin.....	< 1 %

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

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. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Doterversuche erkannt werden.

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 und Zubehör für den Nachweis von Milchprotein

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612)

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

RIDA® Extractor 2 (Art. Nr. R4613)

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

Bioavid Lateral Flow Casein inkl. Hook-Linie (Art. Nr. BLH714-15)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (R4901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β -Lactoglobulin in hydrolisierten Milchprodukten, einschließlich hypoallergener Babynahrung. Durch seinen kompetitiven Aufbau ist er besonders für den Nachweis von Proteinfragmenten (Peptiden) geeignet.

Der Test ist kalibriert auf hydrolisierte β -Lactoglobulin Kontrollproben. Die Standards bestehen aus nativem β -Lactoglobulin. Der Test detektiert sowohl

native und thermisch prozessierte Proteine (während des Erhitzens von Milch wird natives β -Lactoglobulin teilweise denaturiert) als auch deren Fragmente.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes 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

Bestimmte Proteine in der Milch verursachen Allergien. 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.

Als Allergen ist β -Lactoglobulin vor allem für Kinder von größter Bedeutung, während beim Erwachsenen eher Casein als Allergen zu dominieren scheint. Etwa 2 - 3 % aller Babys reagieren allergisch auf Milcheiweiß. Hypoallergene Babynahrung (HA-Nahrung) ist eine spezielle Säuglingsnahrung, die bei einem potentiell erhöhten Allergierisiko gefüttert wird. Bei den HA-Nahrungen ist deshalb das Kuhmilcheiweiß durch Hydrolyse in kleine Peptide gespalten, auf die das Immunsystem des Säuglings nicht mehr reagiert. Das Hydrolysat wird zusätzlich gefiltert, um die Freiheit von größeren Bruchstücken sicherzustellen. Nur ein kompetitiver ELISA kann die kleinen Peptide nach einer Hydrolyse detektieren. Daher muss diese Art von Lebensmittel nicht mit einem Sandwich ELISA, sondern einem kompetitiven ELISA getestet werden.

Nach der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 müssen Milch und deren Produkte auf Lebensmitteletiketten deklariert werden. Ähnliche Regelungen gibt es z. B. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit β -Lactoglobulin (BLG) beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Proben und anti-BLG-Antikörper. Freies und immobilisiertes BLG konkurrieren um die BLG-Antikörper-Bindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift werden Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Konjugat) zugegeben, die an die gebundenen anti-BLG-Antikörper binden. Nicht gebundener Enzym-markierter Antikörper wird anschließend in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe und Inkubation der Substrat- und Chromogen-Lösung in den

Vertiefungen der Mikrotiterstreifen. Das gebundene Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung, die umgekehrt proportional zur BLG-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als ng/ml β -Lactoglobulin angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Standard 1 Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 ng/ml	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	10,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	30,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	90,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	270,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Transparent	Gebrauchsfertig	810,0 ng/ml	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		12 ml
Antibody Antikörper	Weiß	Konzentrat	11x	0,7 ml
Substrate Substrat	Grün	Gebrauchsfertig		7 ml
Chromogen Chromogen	Blau	Gebrauchsfertig		7 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

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
- Reagenzröhrchen
- Schüttler/Rotator
- 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 50 - 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

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 Mikrotiterplatte zum Vorpipettieren (siehe Kapitel 10.2) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jeden Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

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 farblose 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 farblosen Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Absorption kleiner 1,2 ($A_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 1

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.

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

Der **Waschpuffer** für Proben- und Antikörperverdünnung sowie Waschen 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). Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 20 - 25 °C.

9.1 Extraktion

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.

- 2 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 2 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen (bzw. 48 ml dest. Wasser hinzufügen).
- Das Gefäß verschließen und gut mischen (z. B. vortexen).
- Das Reagenzröhrchen 10 min kopfüber bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) drehen.
- Die Probenextrakte können bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C (Haltbarkeit ca. 1 Tag) aufbewahrt werden.
- Die hergestellten Extrakte müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit verdünntem Waschpuffer verdünnt werden (siehe Kapitel 9 und 10.2). Die verdünnten Probenextrakte sind nur begrenzt haltbar und müssen innerhalb von 30 min im Test eingesetzt werden.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der **Antikörper** liegt als 11fach Konzentrat vor (Flasche mit weißem Verschluss). Da die rekonstituierte Lösung nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Antikörper mit Waschpuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Den Antikörper sorgfältig mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss der Antikörper 1:11 (1+10) mit verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 9) verdünnt werden (z. B. 2 ml verdünnter Waschpuffer + 200 µl Antikörper, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2 Testdurchführung

Die hergestellten Extrakte müssen vor dem Einsatz im Test 1:20 (1+19) mit verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 9) verdünnt werden (z. B. 950 µl verdünnter Waschpuffer + 50 µl Probe). Die finale Verdünnung ist somit 1:500.

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

Es wird empfohlen den Antikörper, das Konjugat, Substrat, Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-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 50 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9 extrahierten und nach 10.2 verdünnten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl der verdünnten anti-β-Lactoglobulin-Antikörperlösung (siehe Kapitel 10.1) in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 2 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. 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 9) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
5. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
6. 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 9) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
7. Je 50 µl Substrat und 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. 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 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

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 sollte mittels Cubic spline-Funktion erfolgen.

Proben mit Absorptionswerten ($A_{450\text{ nm}}$) < Standard 6 können weiter 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 Extinktionswerte 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 Extinktionswerte 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 Food&Feed 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 den Standards EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

12. Interpretation der Ergebnisse

Das Ergebnis des Tests wird in ng/ml β -Lactoglobulin angegeben (ppb). Die Konzentration muss noch mit dem Verdünnungsfaktor 500 multipliziert werden und in mg/kg (ppm) umgerechnet werden. Umrechnung: 1000 ng/ml (ppb) entsprechen 1 mg/kg (ppm).

Rechenbeispiel: Aus der Standardkurve werden 150 ng/ml β -Lactoglobulin abgelesen. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 500, erhält man 75.000 ng/ml (entspricht 75 mg/kg) β -Lactoglobulin.

Durch den kompetitiven Aufbau reagiert der Test mit Fragmenten von β -Lactoglobulin, die in einem Sandwich-Format nicht reagieren würden. Deshalb ist er für die Untersuchung von hydrolysierten und fermentierten Lebensmitteln geeignet. Durch die Hydrolyse von Proteinen können neue, reaktive Epitope entstehen. Dem wird durch die Kalibrierung auf hydrolysierte Proben Rechnung getragen.

Intaktes β -Lactoglobulin wird ebenfalls detektiert. Allerdings ist ein kompetitiver Test für die Detektion von großen Proteinen weniger gut geeignet. Nicht hydrolysiertes β -Lactoglobulin wird im Test deshalb unterbestimmt. Aus diesem Grund wird empfohlen, den Test nur für die Untersuchung hydrolysierter Proben zu verwenden.

In Abhängigkeit vom Hydrolysegrad des untersuchten Lebensmittels kann das Testergebnis aus den zuvor genannten Gründen einer Mischung aus intaktem und hydrolysiertem β -Lactoglobulin entsprechen. Dies ist bei der Interpretation des Ergebnisses zu berücksichtigen.

Ergebnisse zwischen LoD (Limit of Detection) und LoQ (Limit of Quantification) 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. Wenn 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 des 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. Dies macht sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse im Falle von Wiederholungsuntersuchungen bemerkbar. 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.

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

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Warengruppen 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 (ausgelöst z. B. durch Polyphenole) sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nah 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 exemplarische Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrizes sind im Validierungsbericht beschrieben.

Sehr kleine Peptide können von dem Test nicht mehr detektiert werden. Peptide mit weniger als fünf Aminosäuren sind in jedem Fall nicht mehr detektierbar, bei größeren Peptiden hängt die Detektion davon ab, ob das Fragment ein Epitop für die verwendeten Antikörper enthält.

Für den Nachweis sowohl von nativem als auch thermisch prozessiertem β -Lactoglobulin wird empfohlen, den RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) oder den RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) anzuwenden.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, wie sie in den Normen EN 15633-1 und 15842 aufgeführt werden (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen), zu befolgen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind β -Lactoglobulin-freie und β -Lactoglobulin-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierversuche durchzuführen. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Im kompetitiven ELISA ist die Wiederfindung für native, intakte β -Lactoglobulin-Proteine vermindert, daher sollten entsprechende Proben mit einem Sandwich ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (R4912) oder RIDASCREEN®FAST Milk (R4652), analysiert werden.

- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

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

15. Weitere Applikationen

- Analyse von Gluten oder β -Lactoglobulin in ergänzenden Enzymen

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2016-11-29	Freigabeversion
2025-01-15	<p>Aktuelle Version</p> <p>Vorgenommene Änderungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Generelle sprachliche Überarbeitung – Kurzinformation: <ul style="list-style-type: none"> ○ Angabe des verwendeten Standardmaterials ○ Nachweisgrenze von 2,1 mg/kg auf 1,4 mg/kg korrigiert (entsprechend Validierungsbericht) und Angabe des Mittelwertes – Anpassung der Artikelnummer vom RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (im ganzen Dokument) – Verweis auf RIDASCREEN®FAST Milk (im ganzen Dokument) – Aktualisierung der Liste weiterer Produkte für den Nachweis von Milchprotein – Kapitel 5: Vervollständigung/Aktualisierung zusätzlich benötigter Reagenzien und Zubehör – Kapitel 6: Änderung der Entsorgungsklausel – Kapitel 8: Extinktion < 1,2 (vorher < 0,8) für Standard 5 – Notwendige Verdünnung der Extrakte zur Verwendung im Test von Kapitel 9.1 nach Kapitel 10.2 verschoben – Kapitel 10.2: Korrektur des Kapitelverweises zur Verdünnung des Waschpuffers – Ergänzung und/oder Ausarbeitung Kapitel 11, 12, 13, 14 Und 15 – Ergänzung der Kapitel „Versionsübersicht“ und „Symbolerklärung“ – Aktualisierung des Haftungsausschlusses

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 herstellerseits 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® β -Lactoglobulin

Brief information

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. R4901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of intact and fragmented β -lactoglobulin in foods validated for the method (see chapter 1).

For the detection of native and thermally processed β -lactoglobulin, the use of the sandwich enzyme immunoassay RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) or RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) is recommended.

For the detection of caseins or caseinates in food, the use of RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612) or RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) is recommended.

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standards, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for a maximum of 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 30 min test implementation (incubation time)..... 2 h 45 min
Standard material:	β -Lactoglobulin von SIGMA Aldrich (Art. Nr. L8005)
Limit of detection: (matrix-dependent)	1.4 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin* 0.9 - 2.1 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin *mean value
Limit of quantification:	5 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin

Specificity: The used antibodies specifically detect β -lactoglobulin of cow's milk. There is a cross reactivity to sheep's, goat's, and buffalo's milk.
Cross reactivity for the following substances:

β -Lactoglobulin	100 %
α -, β -, κ -Casein.....	< 1 %
α -Lactalbumin.....	< 1 %
Rinderserumalbumin	< 1 %

Further information is contained in the validation report.

Cross reactivities of the used antibodies 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 spike experiments.

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 and accessories for milk determination

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612)

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

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

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

Bioavid Lateral Flow Casein inkl. Hook-Linie (Art. No. BLH714-15)

1. Intended use

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (R4901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of β -lactoglobulin in hydrolyzed milk products including hypoallergenic baby food. Its competitive structure makes it suitable for the detection of protein fragments (peptides).

The assay is calibrated to hydrolyzed β -lactoglobulin control samples. The standards consist of native β -lactoglobulin. The assay detects both native and

thermally processed proteins as well as the fragments of thereof (during the heating of milk, the native β -lactoglobulin is partially denatured).

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

2. General information

Certain proteins in the milk cause allergies. Milk allergy is an allergy in the classic sense, i.e. the immune system fights a substance that is actually harmless to the body and allergic symptoms arise.

As an allergen, β -lactoglobulin is particularly important for children, while casein seems to dominate as an allergen in adults. Around 2 - 3 % of all infant are allergic to milk protein. Hypoallergenic infant formula (HA formula) is a special infant formula that is fed to a baby with a potentially increased allergy risk. In HA formulas, the cow's milk protein is therefore broken down by hydrolysis into small peptides to which the infant's immune system no longer reacts. The hydrolysate is additionally filtered to ensure that it is free of larger fragments. For this reason, this type of food must not be tested with a sandwich ELISA, but with a competitive ELISA. Only a competitive ELISA can detect the small peptides after hydrolysis.

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.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with β -lactoglobulin (BLG). Standards or sample solutions and anti-BLG antibodies are added. Free and immobilized BLG compete for the BLG-antibody binding sites. After washing, secondary antibodies labeled with peroxidase (enzyme conjugate) are added. These bind to the antibody-BLG-complexes. Any unbound conjugate is then removed by a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. Addition of the stop solution causes a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the β -lactoglobulin concentration in the sample. The result is expressed in ng/mL (ppb) β -lactoglobulin.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Standard 1	Transparent	Ready to use	0 ng/mL	1.3 mL
Standard 2	Transparent	Ready to use	10.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 3	Transparent	Ready to use	30.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 4	Transparent	Ready to use	90.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 5	Transparent	Ready to use	270.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 6	Transparent	Ready to use	810.0 ng/mL	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 mL
Conjugate	Red	Ready to use		12 mL
Antibody	White	Concentrate	11x	0.7 mL
Substrate	Green	Ready to use		7 mL
Chromogen	Blue	Ready to use		7 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

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
- Vials
- Shaker/rotator
- 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 50 - 100 μ L
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2. Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water

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.

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 (36 - 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 (36 - 46 °F).

The colorless 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 colorless chromogen prior to addition in the wells
- Value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 1

9. Sample preparation

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne allergens and dirty laboratory equipment 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.

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

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

9.1. Extraction

Homogenize well a sufficient amount (at least 5 g or 5 mL) of sample (grind it thoroughly to powder and mix well or mix well the solution respectively).

- Transfer 2 g (or in case of liquid samples 2 mL) of homogenized sample to a new vial and add dist. water up to a final volume of 50 mL (or add 48 mL of dist. water).
- Close the vial and mix vigorously (e.g. vortexer).
- Rotate the vial for 10 min (head over end) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- The extract can be stored undiluted up to one day in a well-closed container at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).
- For use in the test, the extracts must be diluted with diluted wash buffer (see chapter 9 and 10.2). The diluted sample extracts have a limited shelf life and must be used in the test within 30 min.

10. Test procedure

10.1. Test preparation

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

The **antibody** (bottle with white cap) is provided as a 11-fold concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the antibody solution should be shaken carefully. For reconstitution, the antibody concentrate is

diluted 1:11 (1+10) in diluted wash buffer (see chapter 9) (e.g. 2 mL diluted wash buffer + 200 µL concentrate, sufficient for 4 microtiter strips).

Components should be stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) when no longer required.

10.2. Test procedure

The extracts must be diluted 1:20 (1+19) with diluted wash buffer (see chapter 9) before usage (e.g. 950 µL diluted wash buffer + 50 µL sample). The final dilution therefore is 1:500.

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

It is recommended to pipette the antibody, conjugate, 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 50 µL of each standard or sample (prepared according to chapter 9 and diluted according to chapter 10.2) in duplicate to the wells.
3. Add 50 µL of the diluted antibody (see chapter 10.1) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 2 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. 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 9) and pour out the liquid again. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
5. Add 100 µL of the conjugate to each well and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
6. 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 9) and pour out the liquid again. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
7. Add 50 µL of substrate and 50 µL of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

8. 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 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done by use of the cubic spline function.

A further dilution and new detection of samples is recommended for absorbance ($A_{450 \text{ nm}}$) < standard 6. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the allergen concentration.

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 similar to the ratios of the standards on the certificate.

The assay can also be 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 Food & Feed 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 the standards EN 15633-1 and EN 15842. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

12. Result interpretation

The test result is calculated in ng/mL (ppb) β -lactoglobulin. This concentration must be further multiplied by the dilution factor 500. The concentration of β -lactoglobulin actually contained in a sample is then converted into mg/kg (ppm). Conversion: 1000 ng/mL corresponds to 1 mg/kg (ppm).

Calculation example: 150 ng/mL β -lactoglobulin is read from the calibration curve. After multiplication with the dilution factor 500, the resulting concentration is 75,000 ng/mL (corresponds to 75 mg/kg) β -lactoglobulin.

Due to the competitive assay design, the test reacts with fragments of β -lactoglobulin that would not react in a sandwich format. It is therefore suitable for testing hydrolyzed and fermented foods. The hydrolysis of proteins can lead to the formation of new, reactive epitopes. This is taken into account by calibrating to hydrolyzed samples.

Intact β -lactoglobulin is also detected. However, a competitive test is less suitable for the detection of large proteins. Non-hydrolyzed β -lactoglobulin is therefore underdetermined in the test. For this reason, it is recommended to use the test only for the analysis of hydrolyzed samples.

Depending on the degree of hydrolysis of the tested food, the test result may correspond to a mixture of intact and hydrolyzed β -lactoglobulin for the reasons mentioned above. This must be taken into account when interpreting the result.

Results between LoD (limit of detection) and LoQ (limit of quantification) indicate a low allergen concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision (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, therefore, results below the measuring range should not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the current 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. Higher result variation appears typically with repeated testing. 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 weigh in 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 ± 1 %.

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

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product groups 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 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.

Cross reactivities are side reactions of the used antibody 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. Therefore, cross reactivities may also appear after food processing in single case or are lost.

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.

Very small peptides can no longer be detected by the test. Peptides with less than five amino acids can no longer be detected in any case; in the case of larger peptides, detection depends on whether the fragment contains an epitope for the antibodies used.

For detection of native and thermally processed β -lactoglobulin, the RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) or RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) is recommended.

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 the standards EN 15633-1 and 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. Beta-lactoglobulin-free and β -lactoglobulin-containing (spiked) samples should be used.
- 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.
- The recovery for native and intact β -lactoglobulin proteins is reduced in a competitive ELISA, such samples should be analyzed with a sandwich ELISA test systems like the RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) or RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652).
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- Analysis of gluten or β -lactoglobulin in supplemental enzymes

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
2016-11-29	Release version
2025-01-15	<p>Current version</p> <p>Changes made:</p> <ul style="list-style-type: none"> – General linguistic revision – Brief information: <ul style="list-style-type: none"> ○ Information about the used standard material ○ Limit of detection corrected from 2.1 mg/kg to 1.4 mg/kg (according to validation report) and indication of the mean value – Adaptation of the article number of RIDASCREEN®FAST β-lactoglobulin (throughout the document) – Reference to RIDASCREEN®FAST Milk (throughout the document) – Updated list of related products for milk protein determination – Chapter 5: Completion/update of additionally required reagents and accessories – Chapter 6: modification of the disposal clause – Chapter 8: absorbance value < 1.2 (before < 0.8) for standard 5 – Necessary dilution of the extracts for use in the test moved from chapter 9.1 to chapter 10.2 – Chapter 10.2: Correction of the chapter reference to the dilution of the wash buffer – Addition and/or revision of chapter 11, 12, 13, 14 and 15 – Addition of “Version overview” and “Explanation of symbols” – Updated disclaimer

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 good will, 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