

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin

REF R4912

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



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 β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β -Lactoglobulin in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

Für den Nachweis von β -Lactoglobulin in hydrolysierten Milchprodukten, einschließlich hypoallergener Babynahrung, wird der kompetitive Enzymimmunoassay RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4901) empfohlen.

Für den Nachweis von Caseinen oder Caseinaten in Lebensmitteln wird 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. Der Testkit ist ausreichend für maximal 48 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (10 Proben)..... ca. 45 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Standardmaterial:	β -Lactoglobulin von SIGMA Aldrich (L8005)
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,042 mg/kg β -Lactoglobulin* 0,024 - 0,73 mg/kg β -Lactoglobulin *Mittelwert
Bestimmungsgrenze:	0,167 mg/kg β -Lactoglobulin
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit 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. Potentiell 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 oder gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Milchprotein

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612)

RIDASCREEN® β-Lactoglobulin (Art. Nr. R4901)

RIDA® Extractor 2 (Art. Nr. R4613)

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

Bioavid Lateral Flow Casein incl. Hook Line (Art. Nr. BLH714-15)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (Art. Nr. R4912) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von β-Lactoglobulin in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Reiswaffeln, 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

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. Milch wird direkt, als Getränk oder als verarbeitetes Produkt wie Sahne, Butter, Joghurt oder Käse verzehrt. Im Allgemeinen stammen etwa 82,4 % und 13,6 % der weltweit erzeugten Frischmilch von Kühen bzw. Büffeln.

Kuhmilch enthält ca. 3,2 % Proteine (2,6 % Caseine und 0,6 % Molkenproteine). Etwa die Hälfte der Molke Fraktion besteht aus β -Lactoglobulin. Das Allergen kann als Zutat oder als Verunreinigung in rohen und gekochten Produkten vorhanden sein. Molke wird häufig in Lebensmitteln (z. B. in Wurstwaren) zur Erhöhung des Proteingehalts oder als Verdickungsmittel zugesetzt. Als Allergen ist das β -Lactoglobulin vor allem für Kinder von größter Bedeutung, während beim Erwachsenen eher das Casein als Allergen zu dominieren scheint.

Molke oder Milchpulver wird häufig Lebensmitteln zugesetzt, daher wird empfohlen, β -Lactoglobulin in Lebensmitteln zu bestimmen. 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. Nach der Richtlinie 2006/141/EG der Kommission über Säuglingsanfangsnahrung muss das immunreaktive Protein weniger als 1 % betragen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen β -Lactoglobulin beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandenes β -Lactoglobulin 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 Antikörper-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 β -Lactoglobulin-Proteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg β -Lactoglobulin 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	0,167 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	0,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	1,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	4,5 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		6 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 β -Lactoglobulin-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 μm)
- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200 μl und 200 - 1000 μl 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 μl
- 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 (für die Aufarbeitung von Pinienkernen): Bovines Serum Albumin (BSA, z. B. Serva, Fraction V, Protease frei, Art. Nr. 11926.01)

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, Gefahrenstoffverordnung 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 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. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Konzentrat). Der **verdünnte Allergen Extraktionspuffer (AEP)** hat eine Haltbarkeit von ca. 4 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bzw. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Der AEP wird für die Verdünnung der gewonnenen Extrakte für die Verwendung im ELISA benötigt. Für die Extrakt-Verdünnung von Matrices, die Pinienkerne 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. 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 Additiv 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 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 45 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C). Weiterer Extraktor 2 kann bei R-Biopharm AG unter der Artikelnummer R4613 bestellt werden.

In den folgenden Abschnitten werden folgende Abkürzungen verwendet:

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

9.1. Extraktion mit Extraktor 2 und A-AEP

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 (z. B. 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 kurz abkühlen lassen (z. B. Im Eisbad für 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 x 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 Raumtemperatur (20 - 25 °C) aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 4 Stunden).

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 Casein (Art. Nr. R4612) und im RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652) eingesetzt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 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 Puffer 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. Proben mit Pinienkernen) 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 durch das Pipettieren 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 Multistep-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 zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).

4. Je 100 µl Konjugat 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 zweimal wiederholen (insgesamt drei 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 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 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 ($< \text{Standard } 2$ bzw. $> \text{Standard } 5$) berechnet werden. Die 4-Parameter-Funktion ermöglicht auch die Berechnung von Werten zwischen Standard 1 und Standard 2 (siehe auch im Kapitel 13).

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

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. 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.

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 β -Lactoglobulin-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.

Rechenbeispiel

Dem Lebensmittel wurde Kuhmilch zugesetzt (Angaben zum Proteingehalt von Kuhmilch, siehe Kapitel 2).

Aus der Standardkurve wird 0,5 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin abgelesen (eine Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ist nicht nötig). Dies entspricht einem Gesamtmilchproteingehalt von ca. 5 mg/kg (ppm) ($0,5 \text{ mg/kg} \times 3,2 \% / 0,3 \% = 5,33 \text{ mg/kg}$) und einem Gesamtmilchgehalt von ca. 156 mg/kg (ppm) ($100 \% \times 5 \text{ mg/kg} / 3,2 \%$).

β -Lactoglobulin entspricht ungefähr 10 % des gesamten Milchproteins. Damit entspricht eine β -Lactoglobulinprobe mit einem Gehalt von 0,2 mg/kg einem Milchproteingehalt von ca. 2 mg/kg.

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 $\pm 1\%$ 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.

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.
- Bei der Durchführung des Tests ist die angegebene Temperatur von 20 - 25 °C einzuhalten. Abweichungen hiervon können die Wiederfindung des Analyten beeinflussen.
- 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.
- Recommendation für β -Lactoglobulin in Weißwein und Rotwein.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-11-23	Freigabeversion
2023-11-29	Vorherige Version
2025-10-20	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: – Generell sprachliche und formelle Überarbeitung – Ergänzung der Zweckbestimmung in Kapitel 6 – Ergänzung in Kapitel 9 zur Kristallbildung und Herstellung des A-AEPs – Ergänzung eines Hinweises zu der Durchführung von Einzelbestimmungen in Kapitel 11 – Überarbeitung und Ergänzungen in Kapitel 12, 13 und 14 – Aktualisierter Haftungsausschluss

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®FAST β -Lactoglobulin

Brief information

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of β -lactoglobulin in food validated for the method (see chapter 1).

For the detection of β -lactoglobulin in hydrolyzed milk products, including hypoallergenic baby food, the use of the competitive enzyme immunoassay RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. R4901) 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 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (10 samples)... approx. 45 min test implementation (incubation time) 30 min
Standard material:	β -lactoglobulin from SIGMA Aldrich (L8005)
Limit of detection: (depending on matrix)	0.042 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin* 0.024 - 0.073 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin *mean value
Limit of quantification:	0.167 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin
Specificity:	The antibodies used specifically detect β -lactoglobulin of cow's milk. There is a cross-reactivity to sheep's, goat's and buffalo's milk. Further information regarding cross-reactivity is contained in the validation report.

Cross-reactivities of the 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 determination

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. R4901)

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

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

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

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4912) is a sandwich enzyme immunoassay test for the quantitative analysis of β -lactoglobulin in food. Due to the large number of different food products, the following samples were examined as representative for different food product categories within the scope of the test development: rice crispies, 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 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, meaning 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. Generally, about 82.4 % and 13.6 % of the world's fresh milk comes from cows and buffaloes, respectively.

Cow's milk contains approx. 3.2 % proteins (2.6 % caseins and 0.6 % whey proteins). Approx. half of the whey fraction consists of β -lactoglobulin. The allergen can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked products. Skim milk powder or whey are often added in food products (e.g. in sausages) to increase the protein content or as thickening agent. The most important allergen for children is β -lactoglobulin while the caseins become the dominant allergen later in adults.

Whey or milk powder is often added to food products, therefore it is recommended to determine β -lactoglobulin in food. 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. According to the Commission Directive 2006/141/EC on infant formulae, the immunoreactive protein shall be less than 1 %.

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 β -lactoglobulin. By adding the standard or sample solution to the wells, β -lactoglobulin 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 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 β -lactoglobulin concentration in the

sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg β -lactoglobulin.

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	0.167 mg/kg	1.3 mL
Standard 3*	Transparent	Ready to use	0.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 4*	Transparent	Ready to use	1.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 5*	Transparent	Ready to use	4.5 mg/kg	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 mL
Conjugate	Red	Ready to use		6 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

* The concentration values of the standards already take into account the dilution factor 100. Thus, the β -lactoglobulin 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 cylinders
- 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 (for the extraction of pine nuts): bovine serum albumin (BSA, e.g. Serva, fraction V, protease free, Art. No. 11926.01)

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. 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 Allergen extraction buffer (AEB) 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 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

The AEB is required for the dilution of the extracts for use in ELISA. For the dilution of matrices containing pine nuts, 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 2-fold 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 45 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 AG 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 with Extractor 2 and A-AEB

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.) 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 (e.g. in ice water for 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.
 - For use in the test the extracts (supernatant of 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.

The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) (shelf life approx. 4 hours).

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 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:

The extracts prepared with Extractor 2 and A-AEB can be also used with the RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612) and RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652) assays.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

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 (i.e. 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 use (e.g. 400 µL AEB + 100 µL sample).

Individual samples extracted with Extractor 2 and A-AEB (e.g. pine nuts) 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 µL BSA-AEB + 100 µL 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 due to pipetting. 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 two more times (a total of three wash cycles).
4. Add 100 µL of the conjugate 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 in a row) 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 two more times (a total of three wash cycles).
6. Add 100 µL of substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µL of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 min after addition of stop solution.

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 test result is calculated in mg β -lactoglobulin per kg food and thus indicates the protein 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 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. 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.

When working according 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 β -lactoglobulin 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.

Calculation example:

Cow's milk was added to the food sample (remarks to the protein content of cow's milk, see chapter 2).

0.5 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin is read from the calibration curve (a multiplication with the dilution factor is not necessary). This corresponds to approx. 5 mg/kg total milk protein ($0.5 \text{ mg/kg} \times 3.2 \% / 0.3 \% = 5.33 \text{ mg/kg}$) and a total milk content of approx. 156 mg/kg ($100 \% \times 5 \text{ mg/kg} / 3.2 \%$).

As β -lactoglobulin represents about 10 % of the total milk protein, a 0.2 mg/kg β -lactoglobulin containing sample corresponds to approx. 2 mg/kg milk protein.

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 %). 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.

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 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 - 7.5) to neutral prior to extraction may be necessary.
- When carrying out the test, the specified temperature of 20 - 25 °C (68 - 77 °F) must be observed. Deviations hereof may influence the recovery of the analyte.
- 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.
- Recommendation for β -lactoglobulin in white wine und red wine.

For 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
2017-11-23	Release version
2024-05-13	Previous version
2025-10-20	Current version Changes made: – General linguistic and formal revision – Addition of crystal formation and preparation of A-AEB in chapter 9 – Revision of handling single determinations in chapter 11 – Revision and additions in chapter 12, 13 and 14 – New 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 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