



RIDASCREEN® Egg

REF R6411

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Ei

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of egg

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

Der RIDASCREEN® Egg (Art. Nr. R6411) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Hühnerei in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

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

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung mit AEP (für 10 Proben) ca. 20 min Probenvorbereitung mit A-AEP für prozessierte Proben (für 10 Proben).....ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 50 min
Standardmaterial:	NIST Referenzmaterial 8445 (Volleipulver)
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,13 mg/kg (ppm) Volleipulver* 0,04 - 0,20 mg/kg (ppm) Volleipulver *Mittelwert
Bestimmungsgrenze:	0,25 mg/kg (ppm) Volleipulver entspricht 0,12 mg/kg Gesamteiprotein
Spezifität:	Die spezifischen Antikörper erfassen die Eiklar-Proteine Ovalbumin und Ovomukoid aus Hühnerei. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Gänseei, Wachtelei und Straußenei. 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. Potentiell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Doterversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Ei

RIDASCREEN®FAST Egg (Art. Nr. R6402)

RIDASCREEN®FAST Lysozym (Art. Nr. R6452)

bioavid Lateral Flow Egg incl. Hook Line (Art. Nr. BLH708-15)

1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN® Egg (Art. Nr. R6411) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Hühnerei in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Eis, Nudeln, Salatdressing, Wein, Schokolade und Kekse.

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 zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Eine Ei-Allergie ist bei Kindern sehr häufig, wobei diese oft in zunehmendem Alter verschwindet. Das Allergen kann als Zutat oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein.

Eiklar (Eiweiß) enthält etwa 10 - 11 % Protein. Allergologisch von Bedeutung sind vier Hauptallergene, die 80 % des Eiklar-Proteingehaltes ausmachen. Zu den Hauptallergenen zählen Ovomukoid (11 %), Ovalbumin (54 %), Ovotransferrin (12 %) und Lysozym (3,5 %). Die Proteine im Eidotter (Eigelb) weisen hingegen nur mäßige Allergenität auf. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Ei als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u.a. in den USA, Kanada, Australien, China, Neuseeland und in vielen weiteren Ländern.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Ovalbumin und Ovomukoid beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandenes Ei-Protein (Ovalbumin und Ovomukoid) 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 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 Ovalbumin- und Ovomukoid-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Volleipulver angegeben.

4. Packungsinhalt

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

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

* Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der normalen Probenvorbereitung nach Kapitel 9.1 und 9.2 ergibt. So kann die Volleipulver-Konzentration 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)
- pH Meter
- 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; 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 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
- 5 M Salzsäure (HCl)
- 1 M Natronlauge (NaOH)
- Magermilchpulver (MMP) (Lebensmittelqualität, Ei frei)

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 Platte 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.

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. Probenextraktion

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

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

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 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.

Für die Extraktion nach Kapitel 9.1 kann alternativ zur Einwaage mit der Probe das Magermilchpulver (MMP) dem AEP zugefügt werden (**MMP-AEP**). Dem verdünnten AEP muss 2,5 g Magermilchpulver auf 100 ml zugesetzt werden. Es sollte immer nur so viel MMP-AEP hergestellt werden, wie benötigt wird. Die Haltbarkeit des MMP-AEP beträgt einen Tag.

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

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

Um den finalen **Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz von Additiv 1 (A-AEP)** herzustellen, der für die Extraktion nach Kapitel 9.2 benötigt wird, 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 Additive 1 Lösung mit verdünntem AEP aufnehmen und in den Messzylinder überführen. Den mit Additiv 1 versetzten Allergen Extraktionspuffer (A-AEP) mit 1 M HCl auf pH 9 einstellen und mit verdünntem AEP auf 750 ml auffüllen.

750 ml A-AEP reichen für ca. 39 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.

Für die Extraktion nach Kapitel 9.2 kann alternativ zur Einwaage mit der Probe das Magermilchpulver (MMP) dem A-AEP zugefügt werden (**MMP-A-AEP**). 0.5 g MMP pro 19 ml A-AEP zugeben. Es sollte immer nur so viel MMP-A-AEP hergestellt werden, wie benötigt wird. Die Haltbarkeit des MMP-A-AEP beträgt einen Tag.

In den folgenden Abschnitten werden folgende Abkürzungen verwendet:

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

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

Den AEP (oder MMP-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. Schokolade schmelzen oder raspeln.

- 1 g hiervon (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, 0,5 g MMP hinzugeben und mit 20 ml (bzw. 19 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten AEP (siehe Kapitel 9) versetzen. Alternativ 20 ml (bzw. 19 ml bei flüssigen Proben) vorgewärmten MMP-AEP hinzugeben.
- Intensiv mischen bis die Probe vollständig suspendiert ist (z. B. Vortexer).
- 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren.
- Probe abkühlen lassen (z. B. im Eisbad).
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren.

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

- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann in einem gut verschlossenen Gefäß einen Tag bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Nicht verwendete Extrakte können darüber hinaus 3 Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Falls nach einer ersten Testung höhere Verdünnungen der Extrakte notwendig werden (Proben mit Absorptionswerten ($A_{450 \text{ nm}}$) $>$ Standard 5), sollte hierfür der MMP-AEP genutzt werden (siehe Kapitel 9).

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

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. Schokolade schmelzen oder raspeln.

- 1 g hiervon (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, 0,5 g MMP hinzugeben und mit 1 ml Extraktor Ei und 19 ml (bzw. 18 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten A-AEP (siehe Kapitel 9) versetzen.
- Intensiv mischen (z. B. Vortexer).
- 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren.
- Probe abkühlen lassen (z. B. im Eisbad).
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. $2.500 \times g$ (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren.

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

- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann bis zur Verwendung im Test in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C

aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 4 Wochen). Nicht verwendete Extrakte können darüber hinaus unverdünnt 3 Monate bei -20 °C aufbewahrt 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	19 ml
Extraktor Ei	1 ml
MMP	0,5 g

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.

10.2. Testdurchführung

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 Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9.1 oder 9.2 vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere viermal wiederholen (insgesamt fünf Waschzyklen).
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere viermal wiederholen (insgesamt fünf Waschzyklen).
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die 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 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 20. Da ein Probenverdünnungsfaktor von 20 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4*), kann die Volleikonzentration direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat

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

Proben mit Absorptionswerten ($A_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Weitere Verdünnungen sollten mit dem entsprechenden Allergen-Extraktionspuffer durchgeführt werden (siehe Kapitel 9.1 und 9.2). Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden.

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.

12. Interpretation der Ergebnisse

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

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 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 $\pm 1 \%$ gegeben.

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.

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.

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 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 exemplarische Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im Validierungsbericht beschrieben.

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

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.
- 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 den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Für die Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) info@r-biopharm.de zu kontaktieren.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-08-14	Vorherige Version
2024-05-13	Vorherige Version
2025-10-20	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: - Ergänzung der eingetragenen Marke RIDASOFT® - Generell sprachliche und formelle Überarbeitung - Ergänzung in Kapitel 9 zur Kristallbildung und Herstellung des A-AEPs - Verschiebung des Hinweises zu der Durchführung von Einzelbestimmungen nach 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

Patent-Hinweis:

Das Extraktionsmittel im vorliegenden Produkt enthält Sulfit. Verfahren zur Überprüfung eines Lebensmittels unter Nutzung eines sulfithaltigen Extraktionsmittels und/oder entsprechende Detektions-Kits sind Gegenstand der nachfolgend genannten Patente von MORINAGA & Co., Ltd.: European Patent EP 2 224 239 B1, Australian Patent AU 2008 330 507 B2, United States Patent US 8 859 212 B2, Japanese Patent JP 5 451 854 B2. Der Patentinhaber hat der R-Biopharm AG eine Lizenz zur Nutzung und zum Verkauf von Produkten, die die geschützte Technologie verwenden, in den genannten Regionen erteilt.

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® Egg

Brief information

RIDASCREEN® Egg (Art. No. R6411) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of native and processed hen's egg in food validated for the method (see chapter 1).

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

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation with AEP (for 10 samples)..... approx. 20 min sample preparation with A-AEP for processed samples (for 10 samples)..... approx. 30 min test implementation (incubation time) 50 min
Standard material:	NIST reference material 8445 (whole egg powder)
Limit of detection: (matrix-depended)	0.13 mg/kg (ppm) whole egg powder* 0.04 - 0.20 mg/kg (ppm) whole egg powder *mean value
Limit of quantification:	0.25 mg/kg (ppm) whole egg powder corresponds to 0.12 mg/kg whole egg protein
Specificity:	The used antibodies specifically detect the egg white proteins ovalbumin and ovomucoid from hen's egg. Cross-reactivity is given to egg from geese, quails and ostrich. Further information are contained in the validation report.

The cross-reactivities of the antibodies used were determined for 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 (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 the detection of egg

RIDASCREEN®FAST Egg (Art. No. R6402)

RIDASCREEN®FAST Lysozym (Art. No. R6452)

bioavid Lateral Flow Egg incl. Hook Line (Art. No. BLH708-15)

1. Intended use

RIDASCREEN® Egg (Art. No. R6411) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of native and processed hen's egg in foods. Due to the large number of different food products, the following samples were examined representatively for different product groups within the scope of the test development: ice cream, noodles, salad dressing, wine, chocolate, and cookies.

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.

2. General information

Egg allergy is very common in children, although it often disappears with age. Egg protein can be present as an ingredient or as contamination in raw or heated foods.

Egg white contains approx. 10 % - 11 % protein. Allergologically of importance are four main allergens that make up 80 % of egg white protein content. The main allergens include ovomucoid (11 %), ovalbumin (54 %), ovotransferrin (12 %), and lysozyme (3.5 %). In contrast, the proteins in the egg yolk have only moderate allergenicity. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, egg and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia, China and New Zealand.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with antibodies against ovalbumin and ovomucoid. By adding the standard or sample solution to the wells, egg protein (ovalbumin and ovomucoid) 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 antibody conjugated to peroxidase is added. This conjugate is bound 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 end product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance of the solution which is proportional to the ovalbumin and ovomucoid concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg whole egg powder.

4. Reagents provided

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

Component	Lid color	Format	Concentration	Contents
Microtiter plate		Ready for use		96 wells
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 mL
Extractor 4	Blue	Ready to use		100 mL
Additive 1	Blue			2 g
Additive ECO	Green			2.5 g
Standard 1	Transparent	Ready to use	0 mg/kg*	1.3 mL
Standard 2	Transparent	Ready to use	0.25 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 mg/kg*	1.3 mL
Standard 5	Transparent	Ready to use	2 mg/kg*	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 mL
Conjugate	Red	Ready to use		11 mL
Substrate/Chromogen	Brown	Ready to use		13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

* The concentration values of the standards already take into account the dilution factor 20, which results from the sample preparation according to chapter 9.1 and 9.2. Thus, the whole egg powder concentration 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)
- pH meter
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 μ m)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 μ L and 200 - 1000 μ L micropipettes

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

5.2. Reagents:

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- 5 M hydrochloric acid (HCl)
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- Skim milk powder (SMP) (food quality; egg-free)

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 plate (coated plate and pre-plate, if necessary, see chapter 10.2). Use separate pipet 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 reagents at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

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

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

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

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Preparation of samples

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

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

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

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

The Allergen extraction buffer is provided as a 10fold 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 either stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

For extraction according chapter 9.1, as an alternative to weighing the skim milk powder (SMP) to the sample, the SMP can be added to the AEB (**SMP-AEB**). Add 2.5 g of skim milk powder per 100 mL to the diluted AEB. Only

prepare as much SMP-AEB as needed. The shelf life of the SMP-AEB is one day.

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

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

For the preparation of the final **Allergen extraction buffer containing Additive 1 (A-AEB)**, which is required for the extraction according to chapter 9.2, weigh 1.35 g of Additive 1 in a 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 39 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.

For extraction according chapter 9.2, as an alternative to weighing the skim milk powder (SMP) to the sample, the SMP can be added to the A-AEB (**SMP-A-AEB**). Add 0.5 g of skim milk powder per 19 mL A-AEB. Only prepare as much SMP-A-AEB as needed. The shelf life of the SMP-A-AEB is one day.

In the following section, the following abbreviations are used:

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

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

Heat the AEB (or SMP-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. Melt or grate chocolate.

- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 mL) of homogenized sample to a new vial, add 0.5 g SMP and 20 mL (or 19 mL in case of liquid samples) pre-heated AEB (see chapter 9). Alternatively, add 20 mL (or 19 mL for liquid samples) of pre-heated SMP-AEB.
- Mix thoroughly until the sample is completely suspended (e.g. vortexer).
- Incubate for 10 minutes at 60 °C (140 °F), shaking occasionally.
- Let the sample cool down (e.g. in a water bath with ice).
- Filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 x 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 x g) for 10 min in a microcentrifuge.

- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored up to one day in a well-closed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Unused extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for three months.
- If further dilutions are required (samples with absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) > Standard 5), these extract dilutions must be done with SMP-AEB (see chapter 9).

9.2 Sample extraction with Extractor Egg and A-AEB for **processed / heated** samples (e.g. noodles and cookies)

Heat the A-AEB (or SMP-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. Melt or grate chocolate. Melt or grate chocolate.

- Transfer 1 g (or in case of liquid samples 1 mL) of homogenized sample to a new vial, add 0.5 g SMP and mix with 1 mL Extractor Egg and 19 mL (or

18 mL in case of liquid samples) pre-heated A-AEB (see chapter 9). Alternatively, add 19 mL (or 18 mL for liquid samples) of pre-heated SMP-A-AEB.

- Mix thoroughly (e.g. vortexer).
- Incubate for 10 minutes at 60 °C (140 °F), shaking occasionally.
- Let the sample cool down (e.g. in a water bath with ice).
- Filter sample or centrifuge for 10 min at $> 2,500 \times g$; if possible at 4 °C (39 °F).

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

- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored up to 4 weeks in a well-closed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Unused extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for three months.
- If further dilutions are required (samples with absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) $>$ Standard 5), these extract dilutions must be done in a mixture of 1 mL Extractor Egg and 19 mL SMP-A-AEB (see chapter 9).

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The **wash buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1 + 9) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer). 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.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps.

Do not use more than three strips (24 wells) at a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 μL per well) and then

exactly 100 µL are quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

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

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µL of each standard or sample (prepared according to chapter 9.1 or 9.2) in duplicate to the wells and incubate for 20 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 four more times (a total of five wash cycles).
4. Add 100 µL conjugate each into the respective wells and incubate for 20 minutes at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat four more times (a total of five wash cycles).
6. Add 100 µL substrate/chromogen into the wells, and incubate for 10 minutes at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µL of stop solution into 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 function.

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 20. Hence, a dilution factor of 20 is already taken into account with the standard concentrations (see chapter 4*), the egg concentration can directly be read from the standard curve.

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.

A further dilution and new detection of samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) > standard 5. Further dilutions should be made with the respective extraction buffer (see chapter 9.1 and 9.2). In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the egg concentration.

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.

12. Result interpretation

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

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 egg 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 ($CV < 30\%$). 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 egg contamination below the detection limit of the assay, or that other allergen components, such as lipids, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

13. Limits of the method

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

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

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

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

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

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive or 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.

In processed foods (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented and this may have an impact on 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 about 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 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 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.
- To perform PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

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
2019-08-14	Release version
2024-05-13	Previous version
2025-10-20	Current version Changes made: – Addition of the registered trademark RIDASOFT® – General linguistic revision – Addition of crystal formation and preparation of A-AEB in chapter 9 – Transfer of the note for single determinations to 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

Patent Marking:

The extraction means in this product contains sulfite. Food inspection methods using a sulfite-containing extractant as in this product and/or corresponding detection kits are subject to the following patents of MORINAGA & Co., Ltd.: European Patent EP 2 224 239 B1, Australian Patent AU 2008 330 507 B2, United States Patent US 8 859 212 B2, Japanese Patent JP 5 451 854 B2. The patent holder has granted R-Biopharm AG a license to use, and sell products that employ, said protected technology in the above-mentioned territories.

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