



RIDA®QUICK Gliadin

REF R7003

Immunchromatographischer Test zur qualitativen Bestimmung von Gluten auf Oberflächen, in Reinigungs-/Prozesswasser und in Lebensmitteln

Immunochemical test for the qualitative determination of gluten on surfaces, in cleansing/process water and in food

Geprüft als / approved as

AOAC *Official Methods*SM (2015.16)
for processed/non-processed corn products

AOAC *Performance Tested Methods*SM (101702)
for surfaces and cleansing waters



In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 46 °F)



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

RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003) ist ein R5-basierter immun-chromatographischer Test zur qualitativen Bestimmung von Gluten-Kontaminationen auf Oberflächen, in Reinigungs-/Prozesswasser (CIP-Wasser) und in Lebensmitteln.

Der Test ist AOAC Proficiency Tested Method (PTM 101702) für Oberflächen und Reinigungs-/Prozesswasser^[1] und Official Method of Analysis (OMA 2015.16) der AOAC für auf Mais basierende Lebensmittel nach Ethanol- bzw. Cocktail (patented)-Extraktion^[2].

Das Testkit enthält 25 Teststreifen für jeweils eine Bestimmung. Für die Durchführung des Wischtests sind alle Reagenzien im Testkit enthalten. Die Auswertung erfolgt visuell.

Zeitbedarf:	Probennahme Wischtest..... ca. 1 min
	Probenvorbereitung für:
	10 CIP-Wasser-Proben..... ca. 5 min
	10 Rohwaren ca. 15 min
	10 prozessierte Lebensmittel (R7006) ca. 120 min
	10 prozessierte Lebensmittel (R7080) ca. 35 min
	Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 5 min
	CIP = Clean-In-Place (Spülwasser aus Reinigungsprozess)

Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	Oberflächenca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
	Rohwarenca. 4,4 mg/kg Gluten*
	Prozessierte Lebensmittel..... ca. 6,3 mg/kg Gluten**
	CIP-Wasser (ohne Reiniger)ca. 10 ng/ml Gluten
	CIP-Wasser (mit Reiniger)ca. 50-100 ng/ml Gluten
	* mit ethanolische Extraktion ** mit Cocktail (patented)-Extraktion

In Abhängigkeit von der untersuchten Matrix und der gewählten Extraktionsmethode können Abweichungen von den hier genannten Werten auftreten.

Spezifität: Der eingesetzte **monoklonale Antikörper R5** erkennt die Gliadinfraktionen aus Weizen und verwandte Prolamine aus Roggen und Gerste. 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.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Gluten/Gliadin

RIDA®QUICK Gliadin (single packaged) (Art. Nr. R7004)
RIDA®QUICK Gliadin (ready to swab) (Art. Nr. R7005)
RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001)
RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)
RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021)
RIDASCREEN® Total Gluten (Art. Nr. R7041)
RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. Nr. R7051)
Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016)
Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)
RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. Nr. R7012)
SureFood® ALLERGEN Gluten (Art. Nr. S3606)
SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. Nr. S3301)
SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals (Art. Nr. S7006)

1. Verwendungszweck

RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003) ist ein R5-basierter immunchromatographischer Test im Teststreifenformat zur qualitativen Bestimmung von Gluten

- auf Oberflächen (Wischtest zur Hygienekontrolle in Produktion und Labor)
- in Reinigungs-/Prozesswasser (CIP-Wasser).
- in Lebensmitteln nach einer Extraktion mit Ethanol, Cocktail (patented) oder Cocktail ECO.

Der Test wurde zum Nachweis geringer Glutenkonzentrationen entwickelt und erkennt Kontaminationen auch unterhalb 10 mg/kg Gluten. Die Sensitivität des Nachweises hängt von der untersuchten Matrix und der Extraktionsmethode ab.

Im Rahmen der AOAC-RI Validierung des Tests für die Untersuchung von Oberflächen und Reinigungs-/Prozesswasser^[1] wurden rostfreier Stahl, Keramikfliesen, Plastik und Silikon bzw. Wasser ohne und mit kommerziellen Reinigungslösungen getestet.

Die Extraktion von maisbasierten Rohwaren mit Ethanol und von hitze-prozessierten, maisbasierten Lebensmitteln mit dem Cocktail (patented) sind Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis^[2].

Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits für das jeweilige Lebensmittel zu überprüfen. Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 13) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Weizenmehl und Gluten werden häufig aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als Kleber- und Streckungsmittel bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Als Gluten bezeichnet man das Eiweißgemisch aus Prolaminen und Glutelinen, welches in Weizen, Roggen und Gerste vorkommt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Die Codex Alimentarius Kommission hat den Grenzwert für glutenfreie Lebensmittel auf 20 mg/kg Gluten festgesetzt^[3]. Dieser Grenzwert wurde auch von vielen nationalen Gesetzgebungen übernommen. Der Prolamingehalt von Gluten (z.B. Gliadin in Weizen) wird darin auf 50 % festgelegt.

Die offizielle Typ I-Methode zur Glutenbestimmung des Codex Alimentarius^[4] ist ein ELISA unter Verwendung des R5-Antikörpers in Kombination mit einem speziellen Extraktionsmedium, dem Cocktail (patented) (Mendéz Methode)^[5]. Der RIDASCREEN® Gliadin ELISA (Art. Nr. R7001) erfüllt diese Anforderung und zeigte 2020 in einer weiteren internationalen Vergleichsstudie die umfassende Eignung zur Untersuchung von Lebensmitteln unterschiedlichster Produktgruppen und Prozessierungsgrade^[6, 7].

Der RIDA®QUICK Gliadin Teststreifen basiert auf dem gleichen R5-Antikörper und zeigt daher eine gute Übereinstimmung mit der offiziellen Methode, dem R5-ELISA RIDASCREEN® Gliadin. **Nur die R-Biopharm AG ist für die Verwendung des R5-Antikörpers in immunchromatografischen Tests autorisiert.**

3. Testprinzip

Das Prinzip des Tests im Streifenformat ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion und basiert auf dem monoklonalen R5-Antikörper, der die Gliadinfraktion aus Weizen sowie Prolamine aus Roggen und Gerste erkennt. Der Streifen enthält im unteren Bereich rote Latexpartikel-R5-Antikörper-Konjugate (Latex-Konjugate). Die Testbande enthält immobilisierten R5-Antikörper. Der Streifen wird senkrecht in einen Laufpuffer gestellt, der die aufgearbeitete Probe enthält. Nach dem Prinzip der Chromatographie läuft die Flüssigkeit (Laufpuffer und Probe) im Streifen nach oben. Die Latex-Konjugate werden durch die Flüssigkeit gelöst und passieren mit dieser die Testbande. Bei Anwesenheit des Analyten bildet sich ein Sandwich aus immobilisiertem R5-Antikörper, Gliadinen/Prolaminen und Latex-Konjugat, der die Testbande rot erscheinen lässt. Die Auswertung erfolgt visuell.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 25 Bestimmungen durchgeführt werden. Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Test strip Teststreifen		Gebrauchsfertig	25 Stück
Test tube Reaktionsröhrchen		Gebrauchsfertig	30 Stück
Disposable pipet Einmalpipetten			25 Stück
Buffer Puffer	Transparent	Gebrauchsfertig	60 ml
Evaluation card Auswertekarte			1 Stück

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 Zentrifugenröhrchen von Greiner Art. Nr. 227261)
- Optional: Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 μm)
- Schüttler

- Wasserbad (50 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Messpipetten
- Messzylinder

5.2 Reagenzien

Für die Analyse von Rohwaren und prozessierten Lebensmitteln werden unterschiedliche Reagenzien empfohlen (siehe Kapitel 9.5).

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser.
- Magermilchpulver (MMP) (Lebensmittelqualität) für soja-, tannin- oder polyphenolhaltige Lebensmittel
- 60 %ige Ethanollösung (150 ml Ethanol p.a. mit 100 ml dest. Wasser mischen)
- 80 %ige Ethanollösung (120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml dest. Wasser mischen)
- Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016)
- Alternativ: Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)

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.

Der Cocktail (patented) enthält Mercaptoethanol. Daher sollte unter dem Abzug gearbeitet werden und Hautkontakt vermieden werden (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

Den Test bei 2 - 8 °C lagern. Die Teststreifen und Komponenten des Testkits nicht einfrieren.

Sobald der Behälter mit den Teststreifen einmal geöffnet wurde, diesen gut verschlossen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) lagern.

Die Teststreifen sind feuchtigkeitsempfindlich und müssen unbedingt vor Feuchtigkeit geschützt werden. Feuchte Teststreifen können das Ergebnis negativ beeinflussen. Deshalb die Teststreifen erst unmittelbar vor dem Einsatz im Test und nach Erreichen der Raumtemperatur aus der Teststreifenverpackung nehmen.

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

- Fehlen der Kontrollbande oder unvollständige Test- bzw. Kontrollbande
- Trüber oder flockiger Puffer

9. Testdurchführung

- 9.1 Allgemeine Hinweise
- 9.2 Wischtest von Oberflächen
- 9.3 Analyse von CIP-Wasser ohne Reinigungsmittel
- 9.4 Analyse von CIP-Wasser mit Reinigungsmitteln
- 9.5 Extraktion von Lebensmitteln
 - 9.5.1. Extraktion mit Ethanol
 - 9.5.2. Extraktion mit Cocktail (patented)
 - 9.5.3. Extraktion mit Cocktail ECO
- 9.6 Testdurchführung für die Analyse von Lebensmitteln

9.1 Allgemeine Hinweise

Der Puffer ist gebrauchsfertig und muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden. Achten Sie darauf, dass der Puffer während der Verwendung nicht mit Gluten kontaminiert wird.

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

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40 % Ethanol oder 2-Propanol reinigen.
- Bei der Analyse sollten die Extraktion und die Testdurchführung in getrennten Räumen durchgeführt werden.
- Bei Verwendung des Cocktail (patented) wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da er β -Mercaptoethanol enthält.

9.2 Wischtest von Oberflächen

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Oberflächen zu analysieren sind.
- 500 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- Mit dem unteren Ende (Applikationsfeld; siehe auch Kapitel 10 Abb. 2) eines trockenen Teststreifens eine Fläche von 10 x 10 cm mit einer Kreuzschraffur-Technik in allen Richtungen (siehe Abb. 1) gründlich abwischen.

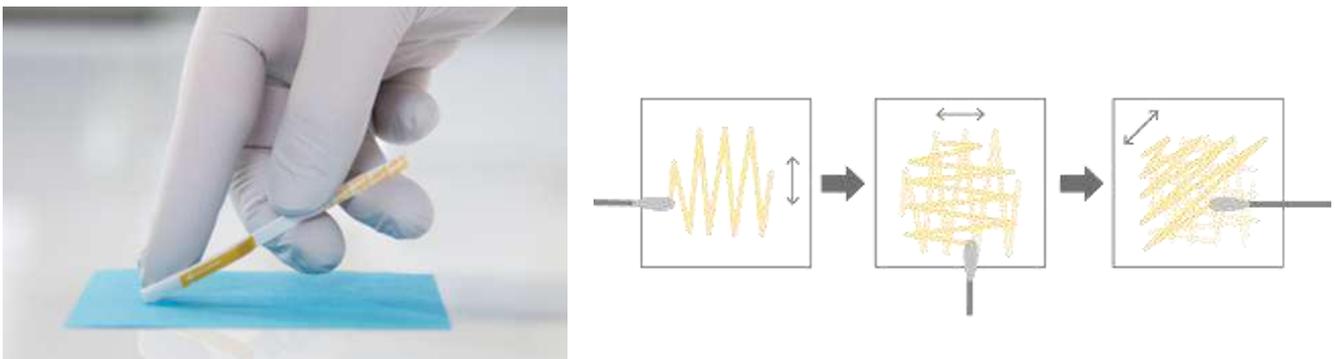


Abb. 1: Direkte Probennahme von Oberflächen mit RIDA®QUICK Gliadin

- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (\pm 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.3 Analyse von CIP-Wasser ohne Reinigungsmittel

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 250 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z.B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- 250 μ l des Spülwassers in das Reaktionsröhrchen geben (z.B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette) und vorsichtig mischen.

- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (± 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.4 Analyse von CIP-Wasser mit Reinigungsmitteln

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 500 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- 50 μ l des Spülwassers (entspricht 3 Tropfen aus der mitgelieferten, senkrecht gehaltenen Einmalpipette) in das Reaktionsröhrchen pipettieren und vorsichtig mischen.
- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (± 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.5 Extraktion von Lebensmitteln

Im Rahmen der AOAC OMA 2015.16 Validierung^[2] wurden nichtprozessierte Maisproben mit einer 60 % Ethanol-Extraktion und prozessierte Maisproben mit der Cocktail (patented)-Extraktion validiert.

In Abhängigkeit von der Extraktionsmethode ist bei einigen Inhaltsstoffen die Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Magermilchpulver (MMP) nötig, um unerwünschte Störreaktionen zu vermeiden.

Inhaltsstoffe in Lebensmitteln	Ethanol Extraktion	Cocktail (patented) / Cocktail ECO Extraktion
Soja	1 g MMP	-
Tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel (z. B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Buchweizen, Hirse, Gewürze)	1 g MMP	0,25 g MMP

9.5.1 Extraktion mit Ethanol (empfohlen für Rohware)

Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) einer ausreichenden Menge des Lebensmittels (z. B. 50 g bzw. 50 ml), um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probenmenge entnommen wird.

- **Flüssige Proben:** 1 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 1 g MMP zugeben) und 9 ml 60 % Ethanol hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Weiche und feste Lebensmittel:** 1 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei soja-, tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 1 g MMP zugeben) und 10 ml 60 % Ethanol hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- Mind. 30 Sek. gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Zentrifugieren: 10 min / mind. 2.500 x g / Raumtemperatur (20 - 25 °C).
(Alternativ: Probe absetzen lassen und/oder filtrieren).

Zusätzlich zu Rohwaren kann die Ethanolextraktion prinzipiell für eine schnelle Analyse auch bei anderen Proben angewendet werden. **Dieses Vorgehen ist jedoch nicht Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis.** Es ist zu beachten, dass die Effektivität der Extraktion mit Ethanol besonders bei hitzeprozessierten Proben reduziert sein kann^[5]. Die Eignung der Ethanolextraktion für das jeweilige Probenmaterial ist daher vom Anwender zu verifizieren. Für eine bessere Extraktion von Gluten aus hitzeprozessierten Proben wurde von der Arbeitsgruppe von Enrique Mendéz der Cocktail (patented) entwickelt^[8], der grundsätzlich für alle Arten von Lebensmitteln verwendet werden kann. Als schnellere und umweltfreundlichere Alternative wurde von R-Biopharm zudem der Cocktail ECO entwickelt, der eine vergleichbare Effektivität der Extraktion aufweist.

9.5.2 Extraktion mit Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016) *empfohlen für hitze-prozessierte Lebensmittel und bei unbekannter Verarbeitung*

Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) einer ausreichenden Menge des Lebensmittels (z. B. 50 g bzw. 50 ml), um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probenmenge entnommen wird.

- **Flüssige Lebensmittel:** 0,25 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Weiche und feste Lebensmittel:** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Fleisch- und Wurstwaren:** Gluten kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich verteilt sein. Deshalb sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Probe homogenisiert wird: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Haferproben:** Gluten kann in Hafer sehr ungleich verteilt sein und die Proben sind schwer zu homogenisieren; deshalb 200 g Probe homogenisieren. Die Probenaufarbeitung sollte dann mindestens mit dem vierfachen Ansatz durchgeführt werden: 1 g der homogenisierten Probe einwiegen und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.

Bitte alle Cocktail (patented) Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren.
- Probe kurz abkühlen lassen (1 - 3 min).
- Mit 7,5 ml 80 % Ethanol (siehe Kapitel 5.2) versetzen (bei Haferproben: 30 ml 80 % Ethanol), das Gefäß verschließen und gut mischen.
- Anschließend 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen.
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x *g* bei Raumtemperatur (20 - 25 °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.
- Die Probenextrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) können unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 4 Wochen).

9.5.3 Extraktion mit Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)

empfohlen für hitze-prozessierte Lebensmittel und bei unbekannter Verarbeitung

Für eine schnellere Probenaufarbeitung kann als Alternative auch der umweltfreundlichere Cocktail ECO verwendet werden. Dieses Vorgehen ist nicht Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis. Gegenüber der Extraktion mit Cocktail (patented) erreicht der Cocktail ECO eine Extraktionseffizienz von etwa 70 - 110 %.

Die notwendige Menge an gebrauchsfertigem Cocktail ECO ist gemäß der Produktinformation herzustellen.

Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) einer ausreichenden Menge des Lebensmittels (z. B. 50 g bzw. 50 ml), um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probenmenge entnommen wird.

- **Flüssige Lebensmittel:** 0,25 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Weiche und feste Lebensmittel:** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Fleisch- und Wurstwaren:** Gluten kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich verteilt sein. Deshalb sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Probe homogenisiert wird: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Haferproben:** Gluten kann in Hafer sehr ungleich verteilt sein und die Proben sind schwer zu homogenisieren; deshalb 200 g Probe homogenisieren. Die Probenaufarbeitung sollte dann mindestens mit dem vierfachen Ansatz durchgeführt werden: 1 g der homogenisierten Probe einwiegen und 10 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.

Bitte alle Cocktail ECO Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren.
- Probe kurz abkühlen lassen (1 - 3 min).
- Mit 7,5 ml 80 % Ethanol (siehe Kapitel 5.2) versetzen (bei Haferproben: 30 ml 80 % Ethanol), das Gefäß verschließen und gut mischen.

- Anschließend 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen.
- Probe filtrieren oder für 5 min bei mind. 2.500 x *g* bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zentrifugieren.
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 5 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.
- Die Probenextrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) können unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 2 Wochen).

9.6 Testdurchführung für die Analyse von Lebensmitteln

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 500 µl des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit den mitgelieferten Einmalpipetten).
- 50 µl des nach Kapitel 9.5.1 - 9.5.3 hergestellten Probenextraktes (entspricht 3 Tropfen aus der mitgelieferten, senkrecht gehaltenen Einmalpipette) in das Reaktionsröhrchen pipettieren und vorsichtig mischen.
- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (± 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

10. Auswertung

Die rechte Bande im Ergebnisfeld ist die rote Testbande (siehe Abb. 2). Die Probe enthält Gluten, wenn die Testbande sichtbar ist.

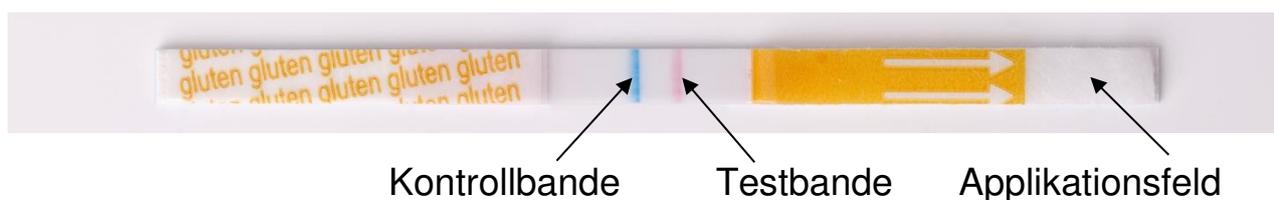


Abb. 2: Teststreifen RIDA®QUICK Gliadin

Die linke Bande im Ergebnisfeld ist die blaue Kontrollbande (siehe Abb. 2). Sie muss nach jedem Testlauf sichtbar sein.

Positives Ergebnis: zwei vollständige, farbige Banden

Die Probe ist positiv, wenn im Ergebnisfeld zwei farbige Banden (die blaue Kontrollbande und die rote Testbande) vollständig sichtbar sind. Bei Wischtests können vollständige Banden ungleichmäßiger Intensität auftreten. Dies wird durch eine inhomogene Glutenverteilung auf der Oberfläche oder aufgrund unterschiedlicher Wischprozeduren verursacht. Im Allgemeinen gilt: je höher die Konzentration des Analyten ist, umso stärker ist die rote Farbe der Testbande.

Wischtest:	> ca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
Rohware:	> ca. 4,4 mg/kg Gluten*
Prozessierte Lebensmittel:	> ca. 6,3 mg/kg Gluten**
CIP-Wasser (ohne Reiniger):	> ca. 10 ng/ml Gluten
CIP-Wasser (mit Reiniger):	> ca. 50 - 100 ng/ml Gluten

* ethanolische Extraktion

** Cocktail (patented)-Extraktion

Negatives Ergebnis: nur eine vollständige, blaue Bande

Die Probe ist negativ, wenn im Ergebnisfeld nur die blaue Kontrollbande vollständig sichtbar ist.

Wischtest:	< ca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
Rohware:	< ca. 4,4 mg/kg Gluten*
Prozessierte Lebensmittel:	< ca. 6,3 mg/kg Gluten**
CIP-Wasser (ohne Reiniger):	< ca. 10 ng/ml Gluten
CIP-Wasser (mit Reiniger):	< ca. 50 - 100 ng/ml Gluten

* ethanolische Extraktion

** Cocktail (patented)-Extraktion

Ungültiges Ergebnis: keine Kontrollbande oder unvollständige Banden

Wenn nach der Testdurchführung keine blaue Kontrollbande bzw. eine inkomplette Kontroll- oder Testbande sichtbar ist, bedeutet dies, dass das Ergebnis ungültig ist und der Test mit einem neuen Streifen wiederholt werden muss. Bei wiederholtem ungültigem Ergebnis überprüfen Sie bitte das Haltbarkeitsdatum des Testkits und kontrollieren den Inhalt auf sichtbare Zeichen eines Reagenzienverfalls (siehe Kapitel 8).

11. Grenzen der Methode

Der Test wurde zum Nachweis geringer Glutenkonzentrationen (Kontaminationen) entwickelt. Bei hohen Konzentrationen tritt kein Überladungseffekt (Overload- oder Hook-Effekt) ein. Bei sehr hohen Konzentrationen (> 10.000 mg/kg Gluten) kann es jedoch zu einem Verschmieren der roten Testbande kommen.

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

Die Nachweisgrenze ist abhängig von der Probenart und der Extraktionseffizienz bzw. von der Beschaffenheit der Oberfläche und der Art der Kontamination.

Eine inhomogene Verteilung von Gluten im Lebensmittel und eine nicht ausreichende Probenmenge können Ursache für ein negatives Ergebnis sein.

Spülwasser mit Hypochlorit-haltigen Reinigern können nicht untersucht werden. Dieser Reiniger zerstört Gluten sehr schnell durch Oxidation. Der Streifentest kann die möglicherweise zurückbleibenden Gluten-Fragmente nicht erkennen.

Grundsätzlich schließt ein negatives Testergebnis nicht aus, dass eine Glutenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Getreidekomponenten, wie z. B. Stärke, in einer Probe enthalten sein können. Ergebnisse sollten entsprechend kommentiert werden.

Es wird empfohlen, die Probenextraktion mit Ethanol für Lebensmittel zu verwenden, die nicht erhitzt wurden. Bei hitzeprozessierten Lebensmitteln kann die Effizienz der Extraktion reduziert sein. Die Eignung der Extraktionsmethode für das jeweilige Lebensmittel ist vom Anwender zu verifizieren.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine zudem verändert und/oder fragmentiert vorliegen. Dies kann die Wiederfindung oder die Kreuzreaktivität beeinflussen.

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.

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.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven 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.

Durch die Zugabe von Fremdprotein (z. B. Magermilchpulver) während der Extraktion oder der Testdurchführung können Matrixeffekte gegebenenfalls unterdrückt werden.

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.

12. 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 zu befolgen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen; hierfür sind Gluten-freie und Gluten-haltige (dotierte) Proben zu verwenden (z. B. Art. Nr. R7012).
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen. Ein Beispiel für eine Dotierung ist in dem 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.
- Die Extraktionseffizienz von Ethanol und Cocktail ECO (Art. Nr. R7080) mit dem Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016) zu vergleichen.
- Zur Abklärung unerwarteter Ergebnisse die Probe mit dem RIDASCREEN® Gliadin ELISA (Art. Nr. R7001) oder mittels PCR (z. B. SureFood®) zu untersuchen.
- Zur Quantifizierung eines positiven Ergebnisses den ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001) einzusetzen.

- Zur einfachen und schnellen Dokumentation der Teststreifen die im Google Play Store kostenfrei zur Verfügung stehende Dokumentations-App „RIDA®SMART APP Allergen“ zu verwenden (nur für Android-Geräte).

Zur Aufbewahrung der Teststreifen zu Dokumentationszwecken muss der obere mit „Gluten“ beschriftete Teil zusammen mit den Testbanden abgetrennt werden.

13. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für prozessierte Lebensmittel mit der RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098) - **nur nach Validierung.**
- Probenaufarbeitung für polyphenolhaltige Rohware mit Fischgelatine.

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

Literatur

- [1] Lacorn M. et al.: The Validation of the RIDA®QUICK Gliadin for AOAC Research Institute. J AOAC Int. 2018; 101(5):1548-1557
- [2] Lacorn M. et al.: Determination of Gluten in Processed and Nonprocessed Corn Products by Qualitative R5 Immunochemical Dipstick: Collaborative Study, First Action 2015.16., J AOAC Int. 2016; 99(3):730-737
- [3] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. CXS 118-1979. Adopted in 1979. Amended in 1983 and 2015. Revised in 2008.
- [4] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Recommended Methods of Analysis and Sampling. CXS 234-1999. Adopted in 1999. Amended in 2021. Pg. 21
- [5] Valdés I. et al.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003; 15(5):465-74
- [6] Immer U., Haas-Lauterbach S.: Gliadin as a measure of gluten in foods containing wheat, rye, and barley-enzyme immunoassay method based on a specific monoclonal antibody to the potentially celiac toxic amino acid prolamin sequences: collaborative study. J AOAC Int. 2012; 95(4):1118-1124
- [7] Lacorn M. et al.: Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 Sandwich ELISA RIDASCREENVR Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01. J AOAC Int. 2022; 105(2):442-455
- [8] Garcia E. et al.: Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005 May; 17(5):529-39

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-01-16	Vorgängerversion
2023-02-23	Vorgängerversion
2024-06-27	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none">– Generelle sprachliche und formale Überarbeitung– Ergänzung weiterer Produkte für den Nachweis von Gluten/Gliadin– Ergänzung der Pufferhandhabung in Kapitel 9.1– Ergänzung der Verfügbarkeit der kostenlosen Dokumentations-App in Kapitel 12– Ergänzung um Patenthinweis der Firma MORINAGA & Co., Ltd.– Aktualisierter Haftungsausschluss

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:



Gebrauchsanweisung beachten



Chargennummer



Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)



Lagertemperatur



Artikelnummer



Anzahl Testbestimmungen



Herstelldatum (YYYY-MM-DD)



Hersteller + Adresse

Patent-Hinweis:

Im Falle der Verwendung des R-Biopharm Produktes „Cocktail ECO“ für die Aufarbeitung von Lebensmittelproben kommt ein sulfithaltiges Extraktionsmittel zum Einsatz. 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 herstellenseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDA®Quick Gliadin

Brief information

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003) is an R5-based immunochromatographic test for the qualitative determination of gluten-contamination on surfaces, in cleansing waters (CIP waters) and in foods.

The test has been approved as AOAC Proficiency Tested Method (PTM 101702) for swabbing and cleansing waters^[1] and as AOAC Official Method of Analysis (OMA 2015.16) for corn based food matrices using ethanol or Cocktail (patented) extraction^[2].

The test kit contains 25 test strips, each of which can be used for one analysis. All reagents required for the swab test are contained in the test kit. Results are evaluated visually.

Time requirement: sampling for swab test ca. 1 min
 Sample preparation for:
 10 CIP water samples ca. 5 min
 10 raw materials..... ca. 15 min
 10 processed foods (R7006) ca. 120 min
 10 processed foods (R7080) ca. 35 min
 Test implementation (incubation time)..... 5 min
CIP = Clean-In-Place (rinse water from cleaning process)

Detection Limit: Surfaces..... ca. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm²
(Matrix-dependent) Raw material ca. 4.4 mg/kg gluten*
 Processed food ca. 6.3 mg/kg gluten**
 CIP water (without cleansing agent).....ca. 10 ng/mL gluten
 CIP water (with cleansing agent)... ca. 50-100 ng/mL gluten
* with ethanol extraction ** with Cocktail (patented) extraction

Deviation may occur from the above mentioned values depending on investigated matrices and chosen extraction method.

Specificity: The **monoclonal antibody R5** reacts with the gliadin-fractions from wheat and corresponding prolamins from rye and barley. Further information 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.

Related products and accessories for gluten/gliadin determination

RIDA®QUICK Gliadin (single packaged) (Art. No. R7004)

RIDA®QUICK Gliadin (ready to swab) (Art. No. R7005)

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021)

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041)

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051)

Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)

Cocktail ECO (Art. No. R7080)

RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)

Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. No. R7012)

SureFood® ALLERGEN Gluten (Art. No. S3606)

SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. No. S3301)

SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals (Art. No. S7006)

1. Intended use

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003) is an R5-based immunochromatographic assay in test strip format for the qualitative determination of gluten

- on surfaces (swab test for hygiene control in production and laboratories)
- in cleansing waters (CIP water).
- in foods after extraction with ethanol, with Cocktail (patented) or with Cocktail ECO.

The test has been developed for the detection of low amounts of gluten and detects gluten contaminations even below 10 mg/kg. Sensitivity of detection varies with investigated matrices and chosen extraction methods.

For the AOAC-RI validation of the assay for testing of surfaces and CIP waters^[1], stainless steel, sealed ceramic, plastic and silicone rubber were validated or waters without and with commercial cleansing agents respectively.

Corn-based raw materials with ethanol extraction and heat-processed corn-based foods with the Cocktail (patented) extraction are part of the AOAC Official Method of Analysis approval^[2].

It can be assumed that the assay is also suitable for the analysis of other foods. However, this must be verified by the user before applying the test kit to the respective food. For detailed results and further information on validation data with other food matrices please refer to our validation report. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we publish in our Application Notes (see chapter 13).

2. General information

The use of wheat flour and gluten in foodstuff is extremely common because of their useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavor. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley. Coeliac disease is a permanent intolerance to gluten that results in damage to the small intestine and is reversible when gluten is avoided by diet.

The Codex Alimentarius Commission has stipulated the limit value for gluten-free food at 20 mg/kg gluten^[3]. This threshold has also been adopted by many national legislations. The prolamin content of gluten (e.g. gliadin in wheat) is set to be 50 %.

The official type I method for gluten determination of the Codex Alimentarius^[4] is an ELISA, which uses the R5 antibody in combination with a special extraction buffer, the Cocktail (patented) (Mendéz method)^[5]. The RIDASCREEN® Gliadin ELISA (Art. No. R7001) fulfils this requirement and showed in an additional international collaborative study in 2020 its broad applicability for investigation of foods from different product groups and of different processing levels^[6, 7].

The RIDA®QUICK Gliadin test strips also use the R5 antibody and show a good correlation with the official method the RIDASCREEN® Gliadin ELISA.

Only R-Biopharm AG is authorized to use the R5 antibody in immunochromatographic tests.

3. Test principle

The principle of the test in strip format is an antigen-antibody reaction and bases on the monoclonal R5-antibody, which is specific for the detection of gliadin from wheat and prolamins from rye and barley. In the lower are, the strip contains red latex particle-R5-antibody-conjugates (latex conjugates). The test band contains immobilized R5 antibody. The strip is placed in a running buffer containing a

prepared sample. Following the chromatographic principle, the liquid (running buffer and sample) moves upwards inside the strip. Latex conjugates are solved by the liquid and pass together with it the test band. If the analyte is present, a sandwich is formed consisting of immobilized R5 antibody, gliadin and red latex-conjugate coloring the test band red. Results are read visually.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for max. 25 determinations. Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Volume
Test strip		Ready to use	25 pieces
Test tube		Ready to use	30 pieces
Disposable pipet			25 pieces
Buffer	Transparent	Ready to use	60 mL
Evaluation card			1 piece

5. Materials 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 $2,500 \times g$) + centrifugal vials (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Optional: filter paper (pore size 8 - 12 μm)
- Shaker
- Water bath (50 °C / 122 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder

5.2 Reagents

Different reagents are recommended for analysis of raw materials and processed food (see 9.5)

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Skimmed milk powder (SMP) (food quality) for soy, tannin and polyphenol containing food
- 60 % ethanol solution (mix 150 mL ethanol p.a. with 100 mL dist. water)
- 80 % ethanol solution (mix 120 mL ethanol p.a. with 30 mL dist. water)
- Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)
- Alternatively: Cocktail ECO (Art. No. R7080)

6. Warnings and precautions for the users

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

Only trained laboratory employees should carry out this test. Follow strictly the instruction for use.

This kit may contain hazardous substances. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

The Cocktail (patented) 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 (36 - 46°F). Do not freeze the test strips or any test kit components.

Once the test strip container has been opened, store the container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

The test strips are sensitive to moisture and must be absolutely protected against it. Moist test strips can have a negative impact on the result. For this reason, remove the test strips from packaging only after having reached room temperature and immediately prior to use in the test.

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

- A missing control band or an incomplete test or control band
- A turbid or flaked buffer

9. Test implementation

9.1 General information

9.2 Swab test on surfaces

9.3 Analysis of CIP water without cleansing agent

9.4 Analysis of CIP water with cleansing agent

9.5 Extraction of foods

9.5.1 Extraction with ethanol

9.5.2 Extraction with Cocktail (patented)

9.5.3 Extraction with Cocktail ECO

9.6 Test procedure for food analysis

9.1 General information

The buffer is ready for use and must be brought to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use. Make sure that the buffer does not become contaminated with gluten during use.

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 with 40 % ethanol or 2-propanol.
- For the analysis, the extraction and the test procedure should be carried out in separate rooms.
- When using the Cocktail (patented), it is recommended to work under a chemical hood, because it contains β -Mercaptoethanol.

9.2 Swab test on surfaces

- Take as many test tubes as surfaces to be analyzed.
- Place 500 μL of buffer in the test tube (e.g. using the disposable pipette provided).
- Swab the lower end (application area; see also chapter 10 fig. 2) of a dry test strip thoroughly in a cross-hatch technique over a sampling area of 10 x 10 cm (see fig. 1).

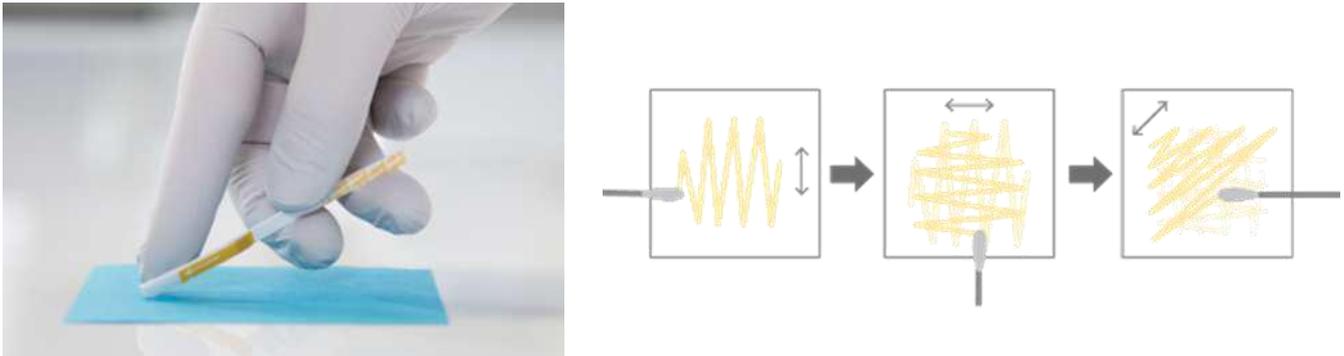


Fig. 1: Direct swabbing of surfaces with RIDA®QUICK Gliadin

- Place the strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (± 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.3 Analysis of CIP water without cleansing agent

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 250 μL of buffer in the test tubes (e.g. using a disposable pipette provided).
- Place 250 μL of cleansing water in the test tube (e.g. using a disposable pipette provided) and mix gently.
- Place a test strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (± 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.4 Analysis of CIP water with cleansing agent

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 500 μL of buffer in the test tube (e.g. using the disposable pipette provided).

- Place 50 µL of cleansing water in the test tube (e.g. using the disposable pipette provided) and mix gently.
- Place a test strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (\pm 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.5 Extraction of foods

For AOAC OMA 2015.16 validation^[2], non-processed corn samples were analyzed using the ethanol extraction and processed corn samples using the Cocktail (patented) extraction.

Depending on the extraction method, the addition of skimmed milk powder (SMP) is necessary for some ingredients to avoid unwanted disturbing reactions.

Food ingredient	Ethanol extraction	Cocktail (patented) / Cocktail ECO extraction
Soy	1 g SMP	-
Tannin- and polyphenol containing food (e.g. chocolate, coffee, cacao, chestnut flour, buckwheat, millet, spices)	1 g SMP	0.25 g SMP

9.5.1 Extraction with ethanol

recommended for raw materials

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 mL of a liquid sample respectively).

- **Liquid food samples:** pipet 1 mL of the homogenized sample into a vial (add 1 g of SMP in case of soy, tannin and polyphenol containing samples) and add 9 mL of 60 % ethanol; close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 1 g of the homogenized sample (add 1 g of SMP in case of soy, tannin and polyphenol containing samples) and add 10 mL of 60 % ethanol; close the vial and mix well.
- Shake well for at least 30 sec (e.g. vortex).

- Centrifuge: 10 min / at least 2,500 x *g* / room temperature (20 - 25 °C / 68 – 77 °F).
(Alternatively: let the sample settle down and/or filtrate.)

Principally, ethanol extraction can also be used for fast analysis of other samples than raw materials. **However, this procedure is not part of the AOAC Official Method of Analysis.** Please notice, that efficiency of ethanol extraction can be reduced especially with heat-processed samples [5]. Hence, users have to verify suitability of ethanol extraction for the particular sample material. The group of Enrique Mendéz has developed the Cocktail (patented) for improved extraction of gluten from heat-processed samples^[8]. It can be used generally for all kind of foods. As a faster and more environmental-friendly alternative, R-Biopharm has developed the Cocktail ECO, which shows a comparable extraction efficiency.

9.5.2 Extraction with Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)

(recommended for heat-processed food and in case of unknown treatment)

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 ml of a liquid sample respectively).

- **Liquid food samples:** pipet 0.25 mL of the homogenized sample into a vial (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Meat and sausages:** uneven gluten distribution is typical for these matrices; therefore, ensure to homogenize a sufficient sample amount: weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) into a vial and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Oat samples:** uneven gluten distribution is typical for oats; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, homogenize 200 g and carry out the extraction with at least the fourfold amount of sample and reagents: weigh 1 g of the homogenized sample into a vial and add 10 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.

Please further extract all Cocktail (patented) samples as described in the following:

- Incubate for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down shortly (1 - 3 min).
- Add 7.5 mL 80 % ethanol (see chapter 5.2) close the vial and mix well (for oat samples, add 30 mL 80 % ethanol accordingly).
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 x *g* at room temperature (20 - 25 °C) / 68 - 77 °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 undiluted sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed tube at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark (shelf life approx. 4 weeks).

9.5.3 Extraction with Cocktail ECO (Art. No. R7080)

(recommended for processed food and in case of unknown treatment)

For a faster sample preparation, the more environmental-friendly Cocktail ECO can be used as alternative. This procedure is not part of the AOAC Official Method of Analysis. The Cocktail ECO has an extraction efficiency of approx. 70 - 110 % compared to Cocktail (patented).

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 mL of a liquid sample respectively). Prepare the necessary amount of Cocktail ECO according to the corresponding product information.

- **Liquid food samples:** pipet 0.25 mL of the homogenized sample into a vial (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.
- **Meat and sausages:** uneven gluten distribution is typical for these matrices; therefore, ensure to homogenize a sufficient sample amount: weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol

containing samples) into a vial and add 2.5 mL of the Cocktail ECO; close the vial and mix well.

- **Oat samples:** uneven gluten distribution is typical for oats; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, homogenize 200 g and carry out the extraction with at least the fourfold amount of sample and reagents: weigh 1 g of the homogenized sample into a vial and add 10 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.

Please further extract all Cocktail ECO samples as described in the following:

- Incubate for 10 min at 50 °C (122 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down shortly (1 - 3 min).
- Add 7.5 mL 80 % ethanol (see chapter 5.2) close the vial and mix well (for oat samples, add 30 ml 80 % ethanol accordingly).
- Shake for 10 min upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25°C / 68 - 77 °F).
- Filter sample or centrifuge for 5 min at > 2,500 x *g* at room temperature (20 - 25 °C) / 68 - 77 °F).
(Alternatively: transfer 2 mL of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x *g*) for 5 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 undiluted sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed tube at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark (shelf life approx. 2 weeks).

9.6 Test procedure for food analysis

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 500 µL of the buffer into each test tube (e.g. using the disposable pipettes provided).
- Add 50 µL of the extracts prepared according to chapter 9.5.1 - 9.5.3 to the test tubes (e.g. using the provided disposable pipettes, 50 µL correspond to 3 drops from a vertically hold pipette) and mix carefully.
- Place one test strip into the test tube with the arrow pointing down and take care that the strip immerses only with the application area (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (± 10 s) and read the result using the evaluation card.

10. Evaluation

The right line in the result area is the red test band (see fig. 2). The sample contains gluten, if the test band becomes visible.

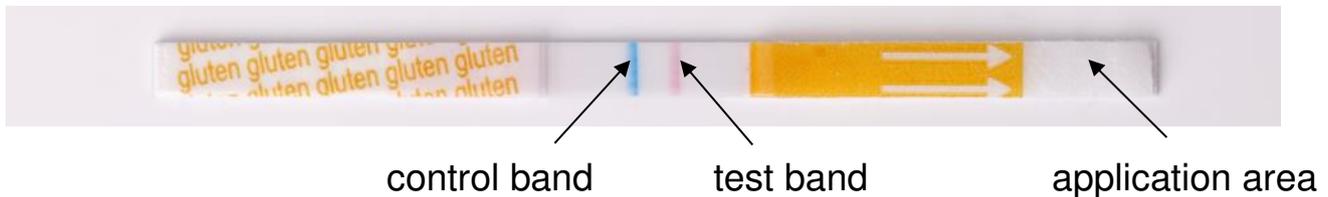


Fig. 2: Test strip RIDA®QUICK Gliadin

The left line in the result area is the blue control band (see fig. 2). It must be present after each test procedure.

Positive result: two complete colored bands

The sample is positive if two colored bands (the blue control band and the red test band) are visible within the result area. In the case of swabbing, complete test bands with non-uniform intensity may occur due to an inhomogeneous gluten distribution on the surface or different swabbing procedures. Principally, the test band's red color is stronger with higher analyte concentrations.

Swab test:	> approx. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm ²
Raw material:	> approx. 4.4 mg/kg gluten*
Processed food:	> approx. 6.3 mg/kg gluten**
CIP water (without cleansing agent):	> approx. 10 ng/mL gluten
CIP water (with cleansing agent):	> approx. 50 - 100 ng/ml gluten

* ethanol extraction ** Cocktail (patented) extraction

Negative result: only one complete blue band

The sample is negative if only the blue test band is visible within the result window.

Swab test:	< approx. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm ²
Raw material:	< approx. 4.4 mg/kg gluten*
Processed food:	< approx. 6.3 mg/kg gluten**
CIP water (without cleansing agent):	< approx. 10 ng/mL gluten
CIP water (with cleansing agent):	< approx. 50 - 100 ng/ml gluten

* ethanol extraction ** Cocktail (patented) extraction

Invalid result: no control band or incomplete bands

If the blue control band is not visible after a run or an incomplete control or test band is visible, the test result is not valid and the test must be repeated with a new test strip. If the result is invalid again, check the expiry date of the test kit and control the content for visible sign of reagent deterioration (see chapter 8).

11. Limits of the method

The test has been developed for the detection of low amounts of gluten (contamination). No high-dose-hook-effect is observed at high concentrations. However, the red test band may smear at very high gluten concentrations (> 10,000 mg/kg gluten).

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

The limit of detection depends on sample type and extraction efficiency or the properties of the swabbed surface and the kind of contamination respectively.

Inhomogeneous gluten distribution inside a sample and an inadequate sample size may cause a negative result.

Cleansing water containing hypochlorite cannot be analyzed. This cleansing agent destroys gluten very quickly by oxidation. The test strip is not able to detect potentially remaining gluten fragments.

A negative result does not exclude a gluten contamination below the detection limit of the assay, or that other cereal components, such as starch, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

It is recommended to use ethanol extraction with foods, which have not been heated. Extraction efficiency may be reduced with heat-processed samples. Kit users need to verify suitability of an extraction method for particular foods.

Furthermore, proteins may have been altered and/or fragmented in processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.). This may have an impact on recovery or cross-reactivity.

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

Cross reactivities are side reactions of the used antibody with antigen showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with antigens

from closely related species. In contrast to matrix effects, it is a specific reaction of the antigen with the antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as the actual analyte. Therefore, food processing may induce cross-reactivity in single cases or cause its loss.

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

Addition of foreign protein (e.g. skimmed milk powder) during extraction or test procedure may suppress matrix effects.

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 interlaboratory comparisons.

12. 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.
- To carry along test controls for quality control. Gluten-free and gluten-containing (spiked) samples should be used (e.g. Art. No. R7012).
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure. An example of a spike experiment is given in the validation report.
- To adjust the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction in case of extremely acidic or basic samples.
- To compare the extraction efficiency of ethanol and Cocktail ECO (Art. No. R7080) with the Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016).
- To clear unexpected results, use the ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001) or run a PCR (e.g. SureFood®).
- To use the ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001) for quantification of a positive result.
- For quick and easy documentation of the test strips, use the "RIDA®SMART APP Allergen" documentation app available free of charge in the Google Play Store (only for Android devices).

For storing the test strip for documentation, cut off the upper part of the strip marked with “Gluten” together with the test bands.

13. Further applications

- Sample preparation for processed food with the RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098) - **only after validation.**
- Sample preparation for polyphenol containing raw material using fish gelatine.

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

Literature

- [1] Lacorn M. et al.: Determination of Gluten in Processed and Nonprocessed Corn Products by Qualitative R5 Immuno-chromatographic Dipstick: Collaborative Study, First Action 2015.16., J AOAC Int. 2016; 99(3):730-737
- [2] Lacorn M. et al.: The Validation of the RIDA®QUICK Gliadin for AOAC Research Institute. J AOAC Int. 2018; 101(5):1548-1557
- [3] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. CXS 118-1979. Adopted in 1979. Amended in 1983 and 2015. Revised in 2008.
- [4] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Recommended Methods of Analysis and Sampling. CXS 234-1999. Adopted in 1999. Amended in 2021. Pg. 21
- [5] Valdés I. et al.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003; 15(5):465-74
- [6] Immer U., Haas-Lauterbach S.: Gliadin as a measure of gluten in foods containing wheat, rye, and barley-enzyme immunoassay method based on a specific monoclonal antibody to the potentially celiac toxic amino acid prolamin sequences: collaborative study. J AOAC Int. 2012; 95(4):1118-1124
- [7] Lacorn M. et al.: Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 Sandwich ELISA RIDASCREENVR Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01. J AOAC Int. 2022; 105(2):442-455
- [8] Garcia E. et al.: Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005 May; 17(5):529-39

Version overview

Version number	Chapter and title
2018-01-16	Previous version
2023-02-23	Previous version
2024-06-27	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General linguistic and formal revision– Addition of related products for gluten/gliadin detection– Addition of buffer handling in chapter 9.1– Addition of the availability of the free of charge documentation app in chapter 12– Addition of marking concerning patents of MORINAGA & Co., Ltd.– 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:

If the R-Biopharm product “Cocktail ECO” is used for the processing of food samples, a sulphite-containing extraction agent is used. 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