

r-biopharm®



RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive

REF R7051

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gliadinen und verwandten Proteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gliadins and corresponding proteins

In vitro Test

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



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

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

R-Biopharm AG switchboard

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

Order department

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

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. Nr. R7051) ist ein R5 Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaminen aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) 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, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung Cocktail (patented) (für 10 Proben)..... ca. 2 h Cocktail ECO (für 10 Proben) ca. 35 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Standardmaterial:	Standard der Prolamin Working Group (PWG-Gliadin, http://www.wgpat.com/handling.html)
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,2 mg/kg Gliadin bzw. 0,4 mg/kg Gluten* 0,19 - 0,21 mg/kg Gliadin *Mittelwert
Bestimmungsgrenze:	1,25 mg/kg Gliadin bzw. 2,5 mg/kg Gluten
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 Doterversuche erkannt werden.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards

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

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Gluten/Gliadin

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001)
RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)
RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021)
RIDASCREEN® Total Gluten (Art. Nr. R7041)
RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003 / R7004 / R7005)
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

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. Nr. R7051) ist ein R5 Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Kontaminationen in glutenfrei-deklarierten Lebensmitteln durch Prolamine aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Kekse, Reismehl, Hafermehl, Wurst, Quinoa, Schokolade, Hirse und verschiedene Gewürze. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits auf diese Produkte 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 15) zur Verfügung stellen.

Die Probenaufarbeitung mit Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016) ist die offizielle R5-Mendéz Methode nach dem Codex Alimentarius und der AOAC.

Die schnellere Probenaufarbeitung mit dem umweltfreundlicheren Cocktail ECO (Art. Nr. R7080) eignet sich für das Screening von Proben. Gegenüber der Extraktion mit dem Cocktail (patented), erreicht der Cocktail ECO eine Extraktionseffizienz von etwa 70 - 110 %.

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 Glutenuunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius „Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten“ (CODEX STAN 118-1979) gibt es zwei "Stufen" für die Bezeichnung von Lebensmitteln hinsichtlich ihres Glutengehaltes:

- 1) "**Glutenfrei**" sind Lebensmittelprodukte, die den Grenzwert von 20 mg/kg Gluten einhalten.
- 2) Produkte gekennzeichnet mit "**sehr geringer Glutengehalt**" dürfen mehr als 20 und höchstens 100 mg Gluten pro kg enthalten.

Der Grenzwert von 20 mg/kg Gluten wurde in viele nationale Gesetzgebungen übertragen. Der Prolamingehalt von Gluten (z. B. Gliadin in Weizen) wird per Definition mit 50 % festgelegt (CODEX STAN 118-1979).

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen R5 Antikörpern gegen Gliadine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet in der Probe vorhandenes Gliadin 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 Peroxidasegekoppelten R5 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 Gliadin-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als ng/ml (ppb) Gliadin angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	Transparent	Gebrauchsfertig		2 x 100 ml
Standard 1 Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 ng/ml	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	2,5 ng/ml	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	5 ng/ml	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	10 ng/ml	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	20 ng/ml	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		10 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. 50 ml Centrifuge Tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler

- Wasserbad (50 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 µm)
- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Gluten-freies Magermilchpulver (MMP) (Lebensmittelqualität)
- Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016) oder Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)
- Ethanollösung (**80 %**): d.h. 120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml dest. Wasser gut mischen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

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

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

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

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

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40 % Ethanol oder 2-Propanol reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003 / R7004 / R7005) auf Gliadinkontamination überprüfen.
- Bei Verwendung des Cocktail (patented) wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da er β -Mercaptoethanol enthält.
- β -Mercaptoethanol kann im ELISA stören, deshalb die Proben mindestens 1:500 verdünnen.
- Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1 Extraktion mit Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016, offizielle AOAC-Methode)

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 (mind. 50 g) 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 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 1 g Probeneinwaage (z. B. Haferproben): 30 ml 80 % Ethanol).
- Gefäß verschließen und 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 bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln (Haltbarkeit ca. 4 Wochen) aufbewahrt werden.
- Die hergestellten Extrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit Puffer verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2). Die verdünnten Probenextrakte sind nur begrenzt haltbar und innerhalb von 30 Minuten im Test einzusetzen.

9.2 Extraktion mit Cocktail ECO (schnellere Methode)

Die schnellere Probenaufarbeitung mit dem umweltfreundlicheren Cocktail ECO (Art. Nr. R7080) eignet sich für das Screening von Proben. Gegenüber der Extraktion mit Cocktail (patented) erreicht der Cocktail ECO eine Extraktionseffizienz von etwa 70 - 110 %. Bei dieser schnellen und umweltfreundlicheren Probenaufarbeitung ist kein Abzug nötig.

Die notwendige Menge an gebrauchsfertigem Cocktail ECO gemäß der Produktinformation Cocktail ECO herstellen.

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 (mind. 50 g) 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 mind. 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 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 1 g Probeneinwaage (z. B. Haferproben): 30 ml 80 % Ethanol), das Gefäß verschließen und gut mischen.
- Gefäß verschließen und 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 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 bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln (Haltbarkeit ca. 2 Wochen) aufbewahrt werden.
- Die hergestellten Extrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit Puffer verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2). Die verdünnten Probenextrakte sind nur begrenzt haltbar und innerhalb von 30 Minuten im Test einzusetzen.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

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

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

10.2 Testdurchführung

Die nach Kapitel 9.1 und 9.2 hergestellten Extrakte müssen vor dem Einsatz im Test 1:12,5 (1+11,5) mit Puffer verdünnt werden (z. B. 920 µl Puffer + 80 µl Probe). Der finale Verdünnungsfaktor der Probe ist 500.

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

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite, unbeschichtete Platte (siehe Kapitel 5.1) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität). Hiervon werden 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.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9 extrahierten und nach Kapitel 10.2 verdünnten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
6. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell durch leichtes Schütteln der Platte mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Es wird empfohlen, die RIDASOFT® Win.NET und die Cubic spline Funktion zu verwenden.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat) entnommen 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 eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Die Gliadinkonzentration in ng/ml (ppb), die aus der RIDASOFT® Win.NET Standardkurve abgelesen wird, muss weiter mit dem Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung von mindestens 500 multipliziert werden. Dieses Ergebnis wird dann noch mit 2 multipliziert, um die Glutenkonzentration zu erhalten (Gluten besteht zu 50 % aus Gliadin, Codex Definition). Bei der RIDASOFT® Win.NET (ab Version 1.93) werden die Ergebnisse in Gliadin und Gluten angezeigt.

Rechenbeispiel

Die Absorption einer Probe entspricht einer Konzentration von 10 ng/ml Gliadin in der Standardkurve. Multipliziert mit dem empfohlenen Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung 500 ergibt sich ein Wert von 5.000 ng/ml entsprechend 5 mg/kg (ppm) Gliadin bzw. 0,0005 % Gliadin. Um den Glutengehalt zu berechnen, muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden, dies ergibt 10 mg/kg Gluten (0,001 % Gluten). Die Probe ist deshalb als „glutenfrei“ zu bezeichnen, da die Konzentration unterhalb von 20 mg/kg liegt.

12. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Ermittelte Werte in diesem Bereich sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ „< LoQ“ angegeben werden.

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

Falls Proben eine höhere Absorption als Standard 5 zeigen, können die Proben stärker verdünnt und erneut im ELISA eingesetzt werden. Hierzu den Extrakt wie unter Kapitel 9.1 und 9.2 beschrieben nochmals frisch 1:12,5 mit Puffer verdünnen. Anschließend den so verdünnten Probenextrakt mit der folgenden Mischung weiter verdünnen:

- 2 % Cocktail (patented) oder Cocktail ECO (je nach Extraktionsmethode)
- 6 % einer 80 %igen Ethanollösung
- 92 % Puffer

Dies entspricht z. B. 100 µl Cocktail (patented) oder Cocktail ECO, 300 µl 80 % Ethanol und 4.600 µl Puffer. Bei Verwendung dieser Mischung bleibt die Zusammensetzung des Probenmediums entsprechend der Extraktion nach Kapitel 9.1 und 9.2 erhalten. Im Falle einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Allergenkonzentration berücksichtigt werden.

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.

13. Grenzen der Methode

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

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

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

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ± 1 % gegeben.

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.

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

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven / erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte (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 (abhängig vom Test z. B. BSA, Gelatine, Magermilchpulver) während der Extraktion oder der Testdurchführung können Matrixeffekte gegebenenfalls unterdrückt 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 im Test verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln auch erst in Erscheinung treten oder aber verloren gehen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Lebensmittel wurde jeweils eine repräsentative Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle analysierten Kreuzreaktivitäten sind im Validierungsbericht beschrieben.

Der Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung können in Weizen-, Roggen-, und Gerstensorten unterschiedlich sein, sodass für verschiedene Sorten abweichende Ergebnisse zu erwarten sind.

Das Haupteptop des R5 Antikörpers ist die Aminosäuresequenz QQPFP, die Teil vieler Zöliakie-toxischer Sequenzen ist. Diese Sequenz kommt wiederholt in den Prolaminen von Weizen, Roggen und Gerste vor. Allerdings ist die Sequenz in Roggen und Gerste häufiger vorhanden als in Weizen, weshalb

Roggen und Gerste gemessen am eingesetzten Weizenstandard überbestimmt werden.

Neuere Forschung hat gezeigt, dass der tatsächliche Umrechnungsfaktor von Prolaminen auf Gluten in Weizen etwa 1,5 beträgt ^{[1], [2], [3]}. Der offizielle Faktor zur Umrechnung ist jedoch weiterhin 2 (Codex Alimentarius).

14. Empfehlung

Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird außerdem empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, wie sie in den Normen EN 15633-1 und 15842 aufgeführt werden (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen) zu befolgen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind 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 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.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood[®]) durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt[®] / Bolt[™]) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.
- Bei der Herstellung von Lebensmitteln wie z. B. Bier und Sauerteig werden Proteine fragmentiert. Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für **fragmentierte Proteine** vermindert. Daher sollten diese Proben mit einem kompetitiven ELISA, wie dem **RIDASCREEN[®] Gliadin competitive** (Art. Nr. R7021), analysiert werden.

15. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für prozessierte Lebensmittel mit der RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098) - **nur nach Validierung**
- Probenaufarbeitung für Rohwaren mit Ethanol
- Probenaufarbeitung für polyphenolhaltige Rohwaren (z. B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Buchweizen) mit Fischgelatine und Ethanol

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

Literatur

- [1] Schall, E., Scherf, K. A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R. E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020) Food Chem. 313, 126049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [2] Wieser et al.: Celiac Disease and Gluten. (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, Seite 107.
- [3] Wieser, H. & Koehler, P. (2009) Eur. Food Res. Technol. 229, 9 - 13.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-08-08	Freigabeversion
2023-02-09	Vorgängerversion
2024-06-27	Aktuelle Version Vorgenommene Änderung: <ul style="list-style-type: none">– Generelle sprachliche Überarbeitung– Ergänzung der weiteren Produkte für den Nachweis von Gluten/Gliadin– Anpassung des Haftungsausschlusses– Ergänzung um Patenthinweis der Firma MORINAGA & Co., Ltd.

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

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive

Brief information

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051) is a R5 sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of prolamins from wheat (gliadin), rye (secalin) and barley (hordein) 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, extraction and centrifugation

Time requirement: sample preparation
Cocktail (patented) (for 10 samples)2 h
Cocktail ECO (for 10 samples)..... approx. 35 min
test implementation (incubation time)..... 30 min

Standard material: The RIDASCREEN® standard material is the standard of the Prolamin Working Group (PWG-Gliadin, <http://www.wgpat.com/handling.html>)

Limit of detection: 0.2 mg/kg (ppm) gliadin or to 0.4 mg/kg (ppm) gluten*
(matrix-dependent) 0.19 - 0.21 mg/kg (ppm) Gliadin
*mean value

Limit of quantification: 1.25 mg/kg (ppm) gliadin or to 2.5 mg/kg (ppm) gluten

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 spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice manual. 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 product and accessories for gluten/gliadin determination

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021)

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041)

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003 / R7004 / R7005)

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

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051) is an R5 sandwich enzyme immunoassay based on specific monoclonal antibody to celiac toxic amino acid prolamins sequences to determine gliadin as a measure of gluten in food. 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: cookies, rice flour, oat flour, sausages, quinoa, chocolate, millet and various spices. It can be assumed, that the assay is also suitable for the analysis of other foods; this must be checked by the user himself.

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

The sample preparation using the Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016) corresponds to the official R5-Mendéz method according to the Codex Alimentarius and the AOAC.

The faster sample preparation using the environmental-friendlier Cocktail ECO (Art. No. R7080) is convenient for the screening of samples. The Cocktail ECO has an extraction efficiency of approx. 70 - 110 % compared to Cocktail (patented).

2. General information

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common because of their heat stability and useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavour. 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.

According to the Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979) two categories for labeling of food according to the gluten content exist:

- 1) Food products which contain less than 20 mg/kg can be labeled as "**gluten-free**".
- 2) Food products labeled as "**very low gluten**" can have a gluten content above 20 and up to 100 mg/kg.

The threshold of 20 mg/kg has been adopted by many national legislations in many countries. The prolamin content of gluten (e.g. gliadin in wheat) is per definition generally assumed to be 50 % (CODEX STAN 118-1979).

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific R5 antibodies against gliadins. By adding the standard or sample solution to the wells, gliadin present in the solutions will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Following the washing step, a solution containing R5 antibodies conjugated to peroxidase is added. This conjugate binds to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution, which is proportional to the gliadin concentration in the sample, is measured photometrically at 450 nm and expressed as ng/mL (ppb) gliadin.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format	Volume
Microtiter plate	-	Ready to use	96 wells
Buffer	Transparent	Ready to use	2 x 100 mL
Standard 1	Transparent	Ready to use	0 ng/mL 1.3 mL
Standard 2	Transparent	Ready to use	2.5 ng/mL 1.3 mL
Standard 3	Transparent	Ready to use	5 ng/mL 1.3 mL
Standard 4	Transparent	Ready to use	10 ng/mL 1.3 mL
Standard 5	Transparent	Ready to use	20 ng/mL 1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x 100 mL
Conjugate	Red	Ready to use	10 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	10 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 mL

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (50 °C / 122 °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 μ L
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Gluten-free skimmed milk powder (SMP) (food quality)
- Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016) or Cocktail ECO (Art. No. R7080)
- Ethanol solution (**80 %**): e.g. add 120 mL ethanol p.a. to 30 mL dist. water and shake well

6. Warnings and precautions for the users

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

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

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

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

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

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (36 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

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

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

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

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Sample preparation

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

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment with 40 % ethanol or 2-propanol.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.
- Check for gliadin contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003 / R7004 / R7005).
- When using the Cocktail (patented), it is recommended to work under a chemical hood, because it contains β -mercaptoethanol.
- β -Mercaptoethanol can disturb the ELISA, therefore dilute the samples at least 1:500.
- The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1 Extraction with Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016, official AOAC method)

Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) well a sufficient amount (e.g. 50 g or 50 mL) to ensure taking a representative test portion of sample.

- **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 soy, 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 (at least 50 g): 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 samples as described in the following:

- Extract 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) (with 1 g sample weight (e.g. oat samples): 30 mL 80 % ethanol).
- Close the vial and 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 sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °C) (shelf life approx. 4 weeks) until used in the test.
- For use in the test, extracts (supernatant of centrifugation step or filtrate) must be diluted with buffer (for dilution see chapter 10.2). The diluted sample extracts have a limited shelf life and must be used in the test within 30 minutes.

9.2 Extraction with Cocktail ECO (faster method)

The faster sample preparation using the environmental-friendlier Cocktail ECO (Art. No. R7080) is convenient for the screening of samples. The Cocktail ECO has an extraction efficiency of approx. 70 - 110 % compared to Cocktail (patented). For this fast and environmental-friendlier sample preparation, it is not necessary to work under a chemical hood.

Prepare the necessary amount of Cocktail ECO according to the product information.

Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) well a sufficient amount (e.g. 50 g or 50 mL) to ensure taking a representative test portion of sample.

- **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 (at least 50 g): weigh 0.25 g 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 the RIDA® 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 a homogenized sample into a vial and add 10 mL of Cocktail ECO, close the vial and mix well.

Please further extract all samples as described in the following:

- Extract 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) (with 1 g samples (e.g. oat samples): 30 mL 80 % ethanol).
- Close the vial and 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 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 sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °C) (shelf life approx. 2 weeks) until used in the test.
- For use in the test, extracts (supernatant of centrifugation step or filtrate) must be diluted with buffer (for dilution see chapter 10.2). The diluted sample extracts have a limited shelf life and must be used in the test within 30 minutes.

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

The **wash buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water (e.g. 900 mL dist. water + 100 mL buffer concentrate). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for 4 weeks.

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

10.2 Test procedure

The extracts prepared according to chapter 9.1 and 9.2 must be diluted 1:12.5 (1+11.5) with buffer before usage (e.g. 920 µL buffer + 80 µL extract). The final sample dilution factor is 500.

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

Carefully follow the recommended washing procedure 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). 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.

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 and diluted according chapter 10.2) in duplicate to the wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
4. Add 100 µL of the conjugate to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
6. Add 100 µL of substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µL of 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. It is recommended to use RIDASOFT® Win.NET and cubic spline curve fitting procedure.

For the evaluation it should be clarified, that the quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the attached analysis certificate.

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

The gliadin concentration in ng/mL (ppb) is read from the RIDASOFT® Win.NET calibration curve and must be further multiplied by the dilution factor from the sample preparation of at least 500. This result is then multiplied by 2 in order to obtain the gluten concentration (gliadin represents 50 % of the proteins present in gluten, Codex definition). The RIDASOFT® Win.NET (version 1.93 or newer) indicates the results in gliadin and gluten.

Calculation example

The absorbance value of a sample corresponds to 10 ng/mL gliadin in the calibration curve. Multiplying by the recommended dilution factor 500 from the sample preparation leads to 5,000 ng/mL, corresponding to 5 mg/kg (ppm) gliadin, respectively 0.0005 % gliadin. To calculate the gluten content, it is necessary to multiply by factor 2 which results in 10 mg/kg gluten, respectively 0.001 % gluten. This sample is considered to be gluten-free, because the gluten concentration is below 20 mg/kg.

12. Result interpretation

Results between LoD and LoQ indicate a low analyte concentration in the sample. Calculated results show a high uncertainty in this area due to the method's high variation below LoQ. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LoQ".

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

If samples show a higher absorbance than standard 5, the samples can be further diluted and used again in the ELISA. For this purpose, dilute the extract again freshly 1:12.5 with buffer as described in chapter 9.1 and 9.2. Then, further dilute the sample extract diluted in this way with the following mixture:

- 2 % Cocktail (patented) or Cocktail ECO (depending on extraction method)
- 6 % of an 80 % ethanol solution
- 92 % buffer

This corresponds e.g. to 100 µL Cocktail (patented) or Cocktail ECO, 300 µL 80 % ethanol and 4,600 µL buffer. When using this mixture, the composition of

the sample medium is maintained according to the extraction in chapter 9.1 or 9.2. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the allergen concentration.

Compared to the certificate, higher absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

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 ± 1 %.

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

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

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

The addition of foreign protein (depending on the test e.g. BSA, gelatine, skim milk powder) during extraction or test procedure may suppress matrix effects.

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

Cross reactivities are side reactions of the antibody used for preparing the test kit with antigen showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with antigens from closely related species. In contrast to matrix effects, it is a specific reaction of the antigen with the antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as the actual analyte. Therefore, cross reactivities may also appear after food processing in single case or are lost.

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.

The protein content and protein composition of wheat, rye and barley cultivars may differ. Varying results are thus to be expected for different cultivars.

The main epitope of the R5 antibody is the amino acid sequence QQPFP which is part of many celiac-toxic sequences. The sequence occurs repeatedly in the prolamins from wheat, rye and barley. However, rye and barley contain a higher number of replicates of this sequence, which leads to an overestimation of rye and barley compared to the wheat standard.

Recent research has shown that the real conversion factor from gliadin to gluten is approx. 1.5 [1], [2], [3]. However, the official conversion factor (Codex Alimentarius) is still 2.

14. Recommendation

Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

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. 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 spiking 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.
- During the production of foods such as beer or sourdough, proteins are fragmented. In sandwich ELISAs **protein fragments** lead to a reduced recovery, such samples should be analyzed with a competitive ELISA test systems like the **RIDASCREEN® Gliadin competitive** (Art. No. R7021).

15. Further application notes

- Sample preparation for processed food with the RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098) - **only after validation**
- Sample preparation for raw materials with ethanol
- Sample preparation for polyphenol containing raw materials (e.g. chocolate, coffee, cacao, buckwheat) with fish gelatine and ethanol

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

Literature

- [¹] Schall, E., Scherf, K. A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R. E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020) Food Chem. 313, 126049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [²] Wieser et al.: Celiac Disease and Gluten. (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, page 107.
- [³] Wieser, H. & Koehler, P. (2009) Eur. Food Res. Technol. 229, 9 - 13.

Version overview

Version number	Chapter and title
2017-08-08	Release version
2023-02-09	Previous version
2024-06-27	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General linguistic revision– Addition of related products for gluten / gliadin determination– Adaptation of disclaimer– Addition of marking concerning patents of MORINAGA & Co., Ltd.

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),

Jochen Hirsch, Ute Salzbrenner,

Dr. Hans Frickel, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321