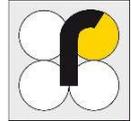


r-biopharm®



RIDASCREEN®EASY Crustacean

REF RAE3001

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Crustaceen-Protein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of crustacean protein

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °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

R-Biopharm AG switchboard

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department

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

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®EASY Crustacean (Art. Nr. RAE3001) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Crustaceen-Protein 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 wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 80 min
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf Crustaceen-Protein kalibriert.
Nachweisgrenze:	0,15 mg/kg (ppm) Crustaceen-Protein; Matrix-abhängig 0,02 - 0,21 mg/kg (ppm)
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg Crustaceen-Protein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Proteinen des Troponin-Tropomyosin-Komplexes von Crustaceen.

Aufgrund konservierter Bereiche der Zielantigene besteht eine Kreuzreaktivität zu anderen Klassen aus dem Stamm der Arthropoden (z. B. Insekten). Aus dem gleichen Grund ist auch eine Kreuzreaktion des Tests mit Mollusken nicht auszuschließen. Aufgrund der Ernährungsweise von Mollusken ist es allerdings möglich, dass positive Reaktionen bei der Untersuchung von Mollusken auf eine Detektion von Crustaceen-Protein im Verdauungstrakt der Mollusken zurückzuführen sind.

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 (siehe Kapitel 10.2 und 13.).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch „Gute ELISA Praxis“. 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 Crustaceen

bioavid Lateral Flow Crustacean incl. Hook Line (Art. Nr. BLH716-15)
SureFood®ALLERGEN Crustaceans (Art. Nr. S3612)
SureFood®ALLERGEN 4plex SEAFOOD (Art. Nr. S3405)

1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN®EASY Crustacean (Art. Nr. RAE3001) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Kontaminationen durch Crustaceen-Protein in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden stellvertretend für verschiedene Lebensmittelkategorien folgende Proben im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Nudeln, Soße, Fisch, Suppe, Frischkäse und Dressing. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Verwendung des Testkits durch entsprechende Experimente zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

2. Allgemeines

Crustaceen können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 müssen Crustaceen als Auslöser von Lebensmittelallergien auf

dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Als Krustentiere (Crustaceen) gelten Garnele, Krabbe, Shrimp, Krill, Hummer, Languste, Fluss- und Taschenkrebis. Besonders das Muskelprotein Tropomyosin aus Krustentieren kann allergische Reaktionen auslösen, wobei hochgradige Sensibilisierungen nicht selten sind. Allergien gegen Krustentiere treten vermehrt im Erwachsenenalter auf und bleiben oft lebenslang bestehen.

Die allergieauslösenden Proteine in Krustentieren verlieren auch durch Verarbeitung nicht ihre allergene Wirkung. Im Rahmen der Validierung des RIDASCREEN®EASY Crustacean wurden deshalb auch prozessierte Proben untersucht, die bereits vor der Verarbeitung mit Krustentieren kontaminiert waren. Die Allergene haben bei dieser Art Proben (engl.: incurred samples) wesentliche Schritte der Lebensmittelherstellung durchlaufen, was einen Einfluss auf die Wiederfindung haben kann.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Crustaceen-Proteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandene Crustaceen-Proteine an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidase-gekoppelten Antikörper-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Eine Substrat/Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben. Das an das Antikörperkonjugat gebundene Enzym wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung, die proportional zur Crustaceen-Proteinkonzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Das Ergebnis wird in mg/kg Crustaceen-Protein 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
Extraction tablets Extraktionstabletten	Weiß	Gebrauchsfertig		50 Stk.
Standard 1* Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	2,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	5,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	10,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	20,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	50 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml
Spike solution Dotierlösung	Grün	Gebrauchsfertig	50 µg/ml	1,3 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Konzentration an Crustaceen-Protein in der Probe direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (60 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 µm)
- Messpipetten

- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific, Art. Nr. 95029390, oder low binding Greiner bio-one, Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes (dest.) oder deionisiertes Wasser
- Abhängig von der Probenmatrix: Magermilchpulver (MMP, Lebensmittelqualität)
- zusätzliche Extraktionstabletten können gegebenenfalls unter der Art. Nr. RAA0008 bestellt werden

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 10.3) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung, etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren. Beachten Sie zu den Tabletten auch den folgenden Hinweis.

Für die Entnahme von Extraktionstabletten den Behälter erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser an den Tabletten zu vermeiden. Die Extraktionstabletten können im verschlossenen Behälter bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auch bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden.

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.

Die Extraktionstabletten und der Waschpuffer sind nicht chargenspezifisch. Sie können auch bei EASY Allergen ELISA mit anderer Chargennummer verwendet werden. Darüber hinaus ist ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen 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:

- Den Behälter der Extraktionstabletten nach Entnahme der Tabletten immer geschlossen halten. Die Tabletten mit sauberen Handschuhen oder einer sauberen Pinzette entnehmen.

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

Die Proben bis zur Aufarbeitung kühl und lichtgeschützt lagern.

Hinweis zu den Extraktionstabletten:

Die RIDASCREEN®EASY Allergen ELISA enthalten anstatt eines flüssigen Extraktionspuffers eine Tablette mit allen für die Extraktion benötigten Chemikalien. Die Tablette wird zu jeder Probe gegeben. Anschließend wird eine definierte Menge an dest. Wasser zugegeben und die Probe bis zum Zerfallen der Tablette durch Mischen suspendiert. Das Wasser sollte auf 60 °C vorgewärmt sein. Dies erleichtert den Zerfall und gewährleistet, dass die optimale Temperatur für die Extraktion sofort gegeben ist.

Die Tabletten sind in allen EASY Allergen ELISA identisch. Die mit ihnen hergestellten Extrakte können somit in den verschiedenen EASY Allergen ELISA eingesetzt werden (auf die Zugabe weiterer, Testparameterspezifischer Zusätze bei bestimmten Proben ist zu achten). Hierbei ist eine unterschiedliche Stabilität der Extrakte in Abhängigkeit vom untersuchten Allergen zu beachten.

Sollte für das Verdünnen hoch positiver Proben, die außerhalb des Messbereichs des Tests liegen, oder für die Verdünnung der Dotierlösung (siehe Kapitel 10.2) zusätzlicher Extraktionspuffer benötigt werden, kann eine Tablette in 20 ml vorgewärmten dest. Wasser (60 °C) gelöst werden. Die Tablette enthält unlösliche, inerte Zusätze, die zum Pressen der Tabletten benötigt werden. Diese werden üblicherweise mit den festen Bestandteilen der Probe während der Zentrifugation sedimentiert. Bei der Herstellung zusätzlichen Puffers für die Probenverdünnung sind diese Bestandteile durch Filtration oder Zentrifugation (5 min bei 2.500 x g) abzutrennen. Im Falle einer Zentrifugation empfiehlt es sich, den Überstand in ein neues Gefäß zu dekantieren.

9.1 Probenextraktion

Dest. Wasser in einem Wasserbad auf 60 °C vorwärmen.

Eine ausreichend große Menge einer festen Probe gut homogenisieren (mind. 5 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g der Probe (bzw. 1 ml von flüssigen Proben) in ein ausreichend großes Reagenzröhrchen (siehe Kapitel 5.1) einwiegen, eine Extraktionstablette und 20 ml des vorgewärmten dest. Wassers zugeben.
- 30 s intensiv mischen (z. B. vortexen) bis die Extraktionstablette vollständig zerfallen ist und sich eine homogene Suspension gebildet hat.
- 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren.
- 5 min bei mindestens 2.500 x g zentrifugieren;
Alternativ bzw. bei Proben, die langsam sedimentieren:
2 ml des Extraktes in ein frisches Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig (> 10.000 x g) zentrifugieren.
- Die Extrakte zusätzlich filtrieren, wenn durch die Zentrifugation kein partikelfreier Überstand erreicht wird.
- Der partikelfreie Extrakt kann unverdünnt im Test eingesetzt werden.

Bei Proben, die einen unspezifischen Matrixeffekt zeigen (siehe auch Kapitel 13), wird die Zugabe von 1 g Magermilchpulver (MMP) empfohlen. Das MMP wird direkt zur Probe zugegeben. Danach werden die Tablette und dest. Wasser zugegeben und die Proben wie oben beschrieben extrahiert.

Anmerkung

Der partikelfreie Extrakt muss zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse innerhalb einer Stunde im EASY Crustaceen ELISA eingesetzt werden.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1 + 9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 450 ml dest. Wasser + 50 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 oder von 3 Monaten bei 2 - 8 °C.

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

10.2 Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Extraktion und der Testdurchführung enthält das Testkit eine Dotierlösung. Diese kann entweder zur Dotierung einer (möglichst) negativen Probenmatrix verwendet werden, oder matrixfrei als einfache Verdünnung im Extraktionspuffer im ELISA eingesetzt werden. Im Falle der Dotierung einer Matrix wird diese wie andere Proben auch extrahiert. Auf diese Weise wird der gesamte Prozess (Extraktion + Testdurchführung) überwacht. Wird die Dotierlösung lediglich in Extraktionspuffer verdünnt im ELISA eingesetzt, wird nur der korrekte Ablauf der Testdurchführung kontrolliert.

Für eine Dotierung ist die Dotierlösung gebrauchsfertig. Zum Dotieren von Proben wird, wie unter Kapitel 9.1 beschrieben, 1 g einer homogenisierten Probe eingewogen und mit der Dotierlösung versetzt. Anschließend werden eine Extraktionstablette und 20 ml vorgewärmtes dest. Wasser zugegeben und weiter extrahiert (siehe Kapitel 9.1). Abhängig vom entnommenen Volumen der Dotierlösung kann eine Probe auf unterschiedliche Bereiche der Standardkurve dotiert werden. Mit folgenden Volumina wird näherungsweise eine Konzentration erreicht, die den Standards im Kit entspricht:

Standard 2 (2,5 mg/kg): 50 µl Dotierlösung
Standard 3 (5,0 mg/kg): 100 µl Dotierlösung
Standard 4 (10,0 mg/kg): 200 µl Dotierlösung
Standard 5 (20,0 mg/kg): 400 µl Dotierlösung

Zur Herstellung einer Laufkontrolle (ohne Matrix) wird die Dotierlösung 1:500 mit frisch hergestelltem Extraktionspuffer verdünnt. Für eine bessere Reproduzierbarkeit der Verdünnung empfehlen wir, nicht zu kleine Volumina der Dotierlösung zu pipettieren, auch wenn zur Erreichung einer 1:500 Verdünnung zwei Schritte benötigt werden:

z. B. 50 µl Dotierlösung + 950 µl Extraktionspuffer (1:20)
50 µl 1:20 Verdünnung + 1200 µl Extraktionspuffer (1:25)

Von der so hergestellten 1:500 Verdünnung der Dotierlösung können 100 µl im ELISA als Kontrolle eingesetzt werden.

Achtung:

Eine Matrix hat häufig einen drückenden Effekt auf das Messergebnis. Dies wird durch die Kalibrierung des Tests teilweise ausgeglichen, um eine Unterbestimmung zu verhindern. Bei unterschiedlichen Lebensmitteln kann dieser Effekt aber unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die gemessenen Konzentrationen, die mit den genannten Volumina der Dotierlösung erreicht werden, sind somit matrixabhängig. Für jede Lebensmittelprobe muss deshalb ein eigener Zielwert ermittelt werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Validierungsbericht.

Der Test ist auf die Messung von Allergenen in einer Lebensmittelmatrix kalibriert. Dies führt dazu, dass eine Verdünnung der Dotierlösung in Puffer (ohne Matrix) zu höheren Werten als den theoretisch berechneten führen kann. Der Wert ist zudem von den Umgebungsbedingungen im Labor abhängig. Deshalb ist auch für eine matrixfreie Laufkontrolle von jedem Labor ein eigener Zielwert zu ermitteln.

10.3 Testdurchführung

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

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

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9 vorbereiteten Probenextrakte als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 60 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 dreimal wiederholen (insgesamt vier 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 dreimal wiederholen (insgesamt vier 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 mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat, CoA) entnommen werden, das über den QR-Code auf dem Testkit erhältlich ist. Da die Absorptionswerte im Labor von den auf dem Zertifikat genannten abweichen können, wird empfohlen, die Verhältnisse der Standards zueinander mit denen auf dem Zertifikat zu vergleichen. Hierfür werden die B/B_{max} -Werte (das Verhältnis der Absorptionswerte der Standards zum höchsten Standard) miteinander verglichen. Diese sollten im aktuellen Testlauf ähnlich zu den Verhältnissen der Standards auf dem Zertifikat sein.

Der Test ist gegen Crustaceen-Protein kalibriert. Das Ergebnis gibt deshalb die Menge an Crustaceen-Protein in mg pro kg Lebensmittel an (**Crustaceen-Protein in mg/kg**).

Beim Arbeiten nach der vorliegenden Gebrauchsanweisung werden die Proben bei der Extraktion 1:20 verdünnt. Der Probenverdünnungsfaktor von 20 ist bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe Kapitel 4*). Die Konzentration an Crustaceen-Protein in der Probe kann deshalb direkt aus der Standardkurve abgelesen 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.

12. Interpretation der Ergebnisse

Höhere Absorptionswerte ($A_{450\text{nm}}$) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten laut Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Kontamination der Reagenzien mit Crustaceen-Protein hinweisen.

Proben mit Absorptionswerten ($A_{450\text{nm}}$), die größer Standard 5 sind, können zur exakten Bestimmung der Kontamination zusätzlich verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden. Weitere Verdünnungen sollten wegen der begrenzten Haltbarkeit der Extrakte mit erneut extrahierten Proben und mit frisch hergestelltem Extraktionspuffer (siehe Kapitel 9: Hinweis zu den Extraktionstabletten) durchgeführt werden.

Ergebnisse zwischen LoD (Limit of Detection) und LoQ (Limit of Quantification) können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Je nach untersuchter Matrix können auch unterhalb des LoQ noch Werte mit ausreichender Präzision ($VK < 30\%$) ermittelt werden. Sofern die Präzision des Tests mit einer bestimmten Probenmatrix nicht validiert wurde, sollten Ergebnisse unterhalb des Messbereichs nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ “< LoQ“ angegeben werden. Weitere Informationen hierzu können Sie dem Validierungsbericht entnehmen.

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

13. Grenzen der Methode

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

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

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können bei verschiedenen Crustaceenarten unterschiedlich sein. Verschiedene Arten können daher unterschiedliche Ergebnisse liefern, da die Kalibrierung des Tests gegen das exemplarische, im Standardmaterial verwendete Protein von *Litopenaeus vannamei* vorgenommen wurde.

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.

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 oder erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte, beispielsweise ausgelöst durch Polyphenole und Tannine, sind unabhängig von der Spezifität des im Test

verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Die Zugabe von Fremdprotein (z. B. Magermilchpulver) während der Extraktion kann helfen, Matrixeffekte zu reduzieren oder zu beseitigen. Für detaillierte Informationen zu potenziellen Matrixeffekten einzelner Lebensmittel schauen Sie bitte in den Validierungsbericht.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und / oder fragmentiert werden. Dies kann Wiederfindung und Testergebnisse beeinträchtigen.

Allergene in hitzebehandelten Proben werden nicht vollständig von dem verwendeten Antikörper erfasst. Das Ergebnis der Wiederfindung hängt von der Art und Dauer der Hitzebehandlung ab, so dass bei hoch erhitzten Proben die Wiederfindung stark reduziert sein kann.

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des im Test verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Proteinen mit konservierten Bereichen 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 verloren gehen oder auch erst in Erscheinung treten.

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

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

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, wird 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.
- Mitnahme von Testkontrollen zur Qualitätskontrolle. Hierfür sind Allergenfreie und Allergen-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Testkontrollen mitzuführen. Zur Herstellung von Kontrollen mit einer definierten Allergenkonzentration (Dotierung) kann die im Kit enthaltene Dotierlösung verwendet werden (siehe Kapitel 10.2).
- 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.

15. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2024-10-14	Freigabeversion

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM-DD)
	Hersteller + Adresse

Patent-Hinweis:

Die Extraktionstablette des Testkits enthält Sulfite. Verfahren zur Überprüfung eines Lebensmittels unter Nutzung eines Sulfite-enthaltenden 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 Verwendung der geschützten Technologie in den benannten Regionen erteilt.

Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellerseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDASCREEN® EASY Crustacean

Brief information

RIDASCREEN®EASY Crustacean (Art. No. RAE3001) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of crustacean protein in food validated for the method (see chapter 1.).

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

Sample preparation: homogenization and extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)... approx. 20 min
test implementation (incubation time)..... 80 min

Standard material: The RIDASCREEN® standard material is calibrated to crustacean protein.

Limit of detection: 0.15 mg/kg (ppm) crustacean protein;
0.02 - 0.21 mg/kg (ppm) depending on the matrix

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) crustacean protein

Specificity: The antibodies used in the test specifically react with proteins of the troponin-tropomyosin-complex of crustaceans.

Due to conserved areas of the target antigens, there is a cross-reactivity to other classes of arthropods (e.g. insects). For the same reason, a cross-reaction of the test with molluscs cannot be excluded. Regarding the diet of molluscs, it is also possible that positive reactions in the examination of molluscs are due to the detection of crustacean proteins in the intestinal tract of the mollusc.

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. Potentially interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments (see chapters 10.2 and 13).

To increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our “Good ELISA Practice” brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related product and accessories for Crustacean determination

bioavid Lateral Flow Crustacean incl. Hook Line (Art. No. BLH716-15)

SureFood®ALLERGEN Crustaceans (Art. No. S3612)

SureFood®ALLERGEN 4plex SEAFOOD (Art. No. S3405)

1. Intended use

RIDASCREEN®EASY Crustacean (Art. No. RAE3001) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of contaminations by crustacean protein in foods. Due to the large number of different food products, the following samples were examined as representative for different food product categories within the scope of the test development: noodles, sauce, soup, fish, cream cheese, and dressing. It can be assumed that the test is also suitable for the analysis of other foodstuffs; this is to 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.

2. General information

Crustaceans can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed products. According to the regulation (EU) No. 1169/2011, crustaceans must be declared on food labels as they can induce allergic reactions. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Shrimp, crab, prawns, krill, lobster, langouste and crayfish are described as crustaceans. Especially, the muscle protein tropomyosin can cause allergic reactions, severe sensitizations are not rare. Allergies to crustaceans occur more frequently in adult people and remain there for life.

The allergenic proteins in crustaceans do not lose their allergenic effect through processing. Therefore, processed samples have been investigated during assay validation of the RIDASCREEN®EASY Crustacean, which were contaminated with crustaceans before processing already. Hence, in this type of sample (incurred samples), the crustacean proteins have passed through significant steps in food production, which may have an impact on recovery.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against crustacean proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, crustacean proteins present in the sample will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Following the washing step, a solution containing conjugated, crustacean protein-specific antibodies is added. This conjugate is bound to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the chromogen into a blue end product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution which is proportional to the crustacean protein concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm. The result is expressed as mg/kg crustacean protein.

4. Reagents provided

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Extraction tablets	White	Ready to use		50 pcs.
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 mL
Standard 2*	Transparent	Ready to use	2.5 mg/kg	1.3 mL
Standard 3*	Transparent	Ready to use	5.0 mg/kg	1.3 mL
Standard 4*	Transparent	Ready to use	10.0 mg/kg	1.3 mL
Standard 5*	Transparent	Ready to use	20.0 mg/kg	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	50 mL
Conjugate	Red	Ready to use		11 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL
Spike solution	Green	Ready to use	50 µg/mL	1.3 mL

*) The concentration values of the standards already consider the **dilution factor of 20** coming from sample extraction. Therefore, the crustacean protein concentration of samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F; for fluctuation range, please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 µm)
- Graduated pipettes
- Measuring cylinder
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes
- If necessary: a further microtiter plate (e.g. universal binding, breakable MTP from Thermo Fisher Scientific Art. No. 95029390 or low binding Greiner bio-one Art. No. 655901)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Depending on sample matrix: skim milk powder (SMP; food grade)
- If needed, additional extraction tablets can be ordered with Art. No. RAA0008

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 10.3). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

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

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components. Consider also the following advice for the extraction tablets.

To avoid moisture at the extraction tablets, open the container only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). The extraction tablets can be also stored in the closed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) until the expiry date printed on the label.

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

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

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

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

The extraction tablets and the wash buffer are not lot-specific. They can be used also with EASY allergen ELISA of different lot numbers. Beyond that, do not interchange other 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:

- Keep the container of the extraction tablets always closed after withdrawal of tablets. Take out the tablets with clean gloves or clean tweezers.
- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.

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

Note about extraction tablets:

RIDASCREEN®EASY Allergen ELISA contain extraction tablets with all needed chemicals for extraction instead of a liquid extraction buffer concentrate. A tablet is added to each sample. Then, a defined volume of dist. water is added, and the sample will be suspended by mixing until the tablet is decomposed. The water should be pre-heated to 60 °C (140 °F). This eases decomposition and guarantees the ideal extraction temperature from the beginning.

Tablets are identical with all EASY allergen ELISA. Extracts prepared with the tablets can be used with other EASY allergen ELISA, too (adhere to additional test-specific additives with certain samples). Regard different extract stabilities depending on the actual allergen.

If additional extraction buffer is needed for dilution of high positive samples being above the assay's measuring range or for dilution of the spike solution (see chapter 10.2), one tablet can be solved in 20 mL of pre-heated (60 °C / 140 °F) dist. water. Tablets contain insoluble, inert additives, which are needed for tablet pressing. These usually sediment with sample particles during centrifugation. When preparing additional buffer, these additives must be separated by filtration or centrifugation (5 min at 2,500 x *g*). It is recommended to decant the supernatant into a fresh vial in case of centrifugation.

9.1 Sample extraction

Preheat dist. water to 60 °C (140 °F).

Homogenize well a sufficient amount of a solid sample (at least 5 g; grind it thoroughly to powder and mix well) or mix well a sample in case of liquid foods.

- Weigh 1 g of the sample (or 1 mL from a liquid sample) into a sufficiently large vial (see chapter 5.1) and add one extraction tablet and 20 mL of preheated dist. water.
- Mix thoroughly for 30 s (e.g. vortexer) until the extraction tablet is fully decomposed and a homogeneous suspension has formed.
- Incubate for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Centrifuge: 5 min, mind. 2500 x *g*;
Alternatively, or for samples that sediment slowly:
Transfer 2 mL of the extract into a fresh vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x *g*) for 10 min in a microcentrifuge.
- Filter extract additionally, if no particle-free supernatant is obtained by centrifugation.
- The particle-free extract can be used undiluted in the test.

Addition of 1 g skim milk powder (SMP) is recommended for samples showing an unspecific matrix effect (see also chapter 13). SMP is directly added to the samples. Then, the tablet and dist. water are added and samples are extracted as described above.

Note

The particle-free extract must be used within one hour with the EASY Crustacean ELISA for getting reproducible results.

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. 450 mL dist. water + 50 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 or for 3 months at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Kit components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Quality control

The test kit contains a spiking solution to check that the extraction and test procedure have been carried out correctly. This can either be used for spiking a (preferably) negative sample matrix or used matrix-free as a simple dilution in the extraction buffer in the ELISA. If a matrix is spiked, it is extracted in the same way as other samples. In this way, the entire process (extraction + test procedure) is monitored. If the spiking solution is only used diluted in extraction buffer in the ELISA, only the correct procedure of the test run is monitored.

The spiking solution is ready to use for spiking. To spike samples, weigh 1 g of a homogenized sample as described in chapter 9.1 and add the spiking solution. Then, add an extraction tablet and 20 mL of preheated dist. water and extract further as described in chapter 9.1. Depending on the taken volume of spiking solution, a sample can be spiked to different areas of the standard curve. With the following volumes, a concentration is approximately achieved that corresponds to the standards in the kit:

Standard 2 (2.5 mg/kg): 50 µL spiking solution
Standard 3 (5.0 mg/kg): 100 µL spiking solution
Standard 4 (10.0 mg/kg): 200 µL spiking solution
Standard 5 (20.0 mg/kg): 400 µL spiking solution

To prepare a run control (without matrix), the spiking solution is diluted 1:500 with freshly prepared extraction buffer. It is recommended to perform the 1:500 dilution in two steps and not to use small volumes for pipetting:

e.g. 50 µL spiking solution + 950 µL extraction buffer (1:20)
50 µL 1:20 dilution + 1200 µL extraction buffer (1:25)

Use 100 µL of the 1:500 dilution of the spiking solution prepared in this way as control sample in the ELISA.

Caution:

A matrix often has a suppressing effect on the measurement result. This is partially compensated by the calibration of the test to prevent an underestimation. However, this effect can vary for different foods. The measured concentrations that are achieved with specified volumes of the spiking solution are therefore matrix dependent. A target value must therefore be determined for each food sample separately. Further information on this can be found in the validation report.

The test is calibrated for the measurement of allergens in a food matrix. This means that dilution of the spiking solution in buffer (without any matrix) can lead to higher values than those calculated theoretically. The value is also dependent on the ambient conditions in the laboratory. For this reason, each laboratory must determine its own target value for a matrix-free run control.

10.3 Test procedure

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

Do not use more than three microtiter plate strips (24 wells) at a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate due to pipetting. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µL per well) and then exactly 100 µL are quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

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

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 100 μL of each standard or sample (prepared according to chapter 9) in duplicate to the wells and incubate for 60 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$).
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 three more times (a total of four wash cycles).
4. Add 100 μL of the conjugate to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$).
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 three more times (a total of four wash cycles).
6. Add 100 μL of the reddish substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$) in the dark.
7. Pipette 100 μL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter function.

It must be clarified that all quality criteria are met for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the quality assurance certificate (certificate of analysis, CoA), which is available via the QR code on the test kit. As the absorbance values in the laboratory may differ from those stated on the certificate, it is recommended to compare the ratios of the standards to each other with those on the certificate. For this purpose, the B/B_{max} values (the ratio of the absorbance values of the standards to the highest standard) are compared with each other. In the current test run, these should be similar to the ratios of the standards on the certificate.

The test is calibrated against crustacean protein. The result therefore indicates the amount of crustacean protein in mg per kg of food (**crustacean protein in mg/kg**).

When working according to these instructions for use, the samples are diluted 1:20 during extraction. The sample dilution factor of 20 is already considered in the concentration data of the standards (see chapter 4*). The concentration of crustacean protein in the sample can therefore be read directly from the standard curve.

The assay can also be evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not consistent with standards like EN 15633-1 and EN 15842. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

12. Result interpretation

Higher absorbance values (A_{450nm}) of the calibration curve, especially for the zero standard, as mentioned on the certificate may be a result of insufficient washing or a crustacean contamination of reagents.

A further sample dilution and new determination is recommended for samples with an absorbance value (A_{450nm}) > standard 5. In case of further dilution, the additional dilution factor must be considered when calculating the result. Due to limited extract stability, further dilutions should be carried out with freshly extracted samples and freshly prepared extraction buffer (see chapter 9: Note on extraction tablets).

Results between LoD (Limit of Detection) and LoQ (Limit of Quantification) indicate a low allergen concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision (CV < 30 %). If the precision of the test has not been validated with a specific sample matrix, results below the measuring range should therefore not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the validation report.

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

13. Limits of the method

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

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

The protein content and protein composition may vary in different crustaceans. Different varieties can therefore provide different results, as the test is calibrated against the exemplary protein of *Litopenaeus vannamei*, which is used in the standard solutions.

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

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive or increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects – e.g. caused by polyphenols and tannins – 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. skim milk powder) during extraction can help to reduce or eliminate matrix effects. For detailed information on potential matrix effects of individual foods, please refer to the validation report.

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.

Allergens in heat-treated samples are not completely detected by the antibody used. Recovery depends on type and duration of heat treatment, so that recovery can be significantly reduced in highly heated samples.

Cross reactivities are side reactions of the antibody used in the test with antigens showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with proteins having conserved areas. 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 for the actual analyte. In single cases, cross-reactivities can be lost or only become apparent through the processing of foods.

For evaluation of the cross reactivity, only one representative sample was analyzed. Other samples may show a different result. All analyzed cross reactivities are described in the validation report.

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

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance, we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in the standards EN 15633-1 and 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Allergen-free and allergen containing (spiked) samples should be used.
- 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 do spiking experiments to ensure an accurate and correct test procedure. The spiking solution contained in the kit can be used to prepare controls with a defined allergen concentration (spiking) (see chapter 10.2).
- 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.

15. Further application notes

Further application notes are available on request.

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

Version overview

Version number	Chapter and title
2024-10-14	Release version

Explanation of symbols

General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM-DD)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM-DD)



Manufacturer + address

Patent Marking:

The extraction tablet of the test kit contains sulfite. Food inspection methods using a sulfite-containing extractant as used in this test kit 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 the protected technology in said 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