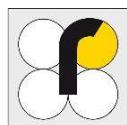


**r-biopharm®**



## **RIDASCREEN®EASY Hazelnut**

**REF RAE6401**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Haselnussprotein

Enzyme immunoassay for quantitative determination  
of hazelnut 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

Auftragsannahme

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

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb

E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & sales

E-mail: [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de)

RIDA®<sup>®</sup>, RIDASCREEN® und RIDASOFT®  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA®<sup>®</sup>, 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 Hazelnut (Art. Nr. RAE6401) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnussprotein 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)..... 50 min
Standardmaterial:	Der RIDASCREEN®EASY Hazelnut ELISA ist auf Haselnussprotein kalibriert. Als Standardmaterial wird das NIST Reference Material 8405 Hazelnut Flour for Allergen Detection mit einem Proteingehalt von 33,8 % verwendet.
Nachweisgrenze:	0,018 mg/kg (ppm) Haselnussprotein
Bestimmungsgrenze:	0,3 mg/kg Haselnussprotein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Proteinen verschiedener Haselnuss-Spezies ( <i>Corylus avellana</i> , <i>C. mandshurica</i> and <i>C. heterophylla</i> ).
	Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Walnuss. 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 zusammengezogenen / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 10.2 und Kapitel 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 Haselnuss

bioavid Lateral Flow Hazelnut incl. Hook Line (Art. Nr. BLH704-15)

SureFood®ALLERGEN Hazelnut (Art. Nr. S3602)

SureFood®ALLERGEN 4plex Peanut/Hazelnut/Walnut + IAC (Art. Nr. S3402)

SureFood®ALLERGEN 4plex EU NUTS (Art. Nr. S3404)

## **1. Verwendungszweck**

Der RIDASCREEN®EASY Hazelnut (Art. Nr. RAE6401) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Kontaminationen durch Haselnussprotein in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden stellvertretend für verschiedene Lebensmittelkategorien folgende Proben im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Pesto, Schokolade, Kekse, Kuchen und Pudding.

Generell sollte das Testkit innerhalb der methodischen Grenzen (siehe Kapitel 13) auch für die Analyse weiterer Lebensmittel verwendbar sein. Die Eignung ist im Einzelfall vom Anwender und vor Verwendung des Testkits durch entsprechende Experimente zu überprüfen.

Aufgrund des Aufbaus als Sandwich-ELISA ist der Test nicht für die Untersuchung hydrolyserter Lebensmittel geeignet.

Detaillierte Ergebnisse zu den untersuchten Lebensmitteln, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrices entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

## **2. Allgemeines**

Haselnuss zählt zu den 14 Allergenen, die in der EU nach der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 als Zutat auf Lebensmitteln speziell gekennzeichnet werden müssen. Ähnliche Regelungen gibt es z. B. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Zu den allergischen Symptomen zählen unter anderem Hautausschlag, Schwellungen, Atemnot, Asthma, Magenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen bis hin zum anaphylaktischen Schock. Betroffene müssen deshalb Lebensmittel, die Haselnussprotein enthalten, strikt meiden. Eine falsche Deklaration stellt deshalb für Haselnussallergiker eine große Gefahr dar. Eine weitere Gefahrenquelle ist der unbeabsichtigte Eintrag von Haselnussprotein durch Kreuzkontamination bei der Verarbeitung, Lagerung, Transport und Abpackung von Lebensmitteln.

Schon geringe Mengen an Haselnussprotein in einem Lebensmittel können zu allergischen Reaktionen führen. Von der WHO/FAO wurde anhand klinischer Studien eine Risikobewertung vorgenommen und man stimmte darin überein, dass bei einer Aufnahme von bis zu 3 mg Haselnussprotein 5 % der Haselnussallergiker schwache Reaktionen jedoch ohne die Entwicklung von lebensbedrohlichen Symptomen zeigen können. 95 % der Allergiker zeigen keine Symptome. Deshalb publizierte die WHO/FAO 2022 eine Menge von

3 mg Haselnussprotein als sogenannte Referenzdosis für das Auslösen von Symptomen bei 5 % der betroffenen Allergiker (Eliciting Dose ED05). Diese wird in Bezug zur typischen Verzehrmenge eines Lebensmittels gesetzt, um das Risiko einer gemessenen Konzentration an Haselnussprotein in mg/kg in einem Lebensmittel für Allergiker richtig einzuschätzen. Auf diese Weise werden Aktionslevel für die Kennzeichnung von Allergenen auf Lebensmitteln definiert. Beispielsweise korreliert die Aufnahme von 3 mg Haselnussprotein mit dem Verzehr von 100 Gramm eines Lebensmittels, das Haselnussprotein in einer Konzentration von 30 mg/kg enthält. Bei einer höheren Verzehrmenge von 400 Gramm liegt die tolerierbare Konzentration entsprechend bei 7,5 mg/kg Haselnussprotein. Für die Gewährleistung einer ausreichenden Präzision von Nachweisverfahren wird empfohlen eine Methode zu verwenden deren Bestimmungsgrenze (LoQ) um den Faktor drei niedriger liegt. Diese Forderung erfüllt der RIDASCREEN®EASY Hazelnut ELISA.

Die allergieauslösenden Proteine der Haselnuss verlieren auch durch Verarbeitung nicht ihre allergene Wirkung. Allerdings können manche Prozesse einen Einfluss auf die Wiederfindung des Allergens in einem Test haben. Im Rahmen der Validierung des RIDASCREEN®EASY Hazelnut wurden deshalb auch prozessierte Proben untersucht, die mit Haselnuss bereits vor der Verarbeitung kontaminiert waren. Die Haselnussallergene haben bei dieser Art Proben (engl.: incurred samples) wesentliche Schritte der Lebensmittelherstellung durchlaufen und ermöglichen so eine realistischere Bewertung der Leistungsfähigkeit einer Testmethode.

### 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Haselnussproteine beschichtet. Nach Zugabe von Standard oder Probe binden darin enthaltene Haselnussproteine an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschritt entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidase-gekoppelten Haselnussprotein-spezifischen Antikörper-Lösung (Konjugat). Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschritt 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 Haselnussprotein-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Das Ergebnis wird in mg/kg Haselnussprotein angegeben.

#### 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Extraction tablets</b> Extraktionstabletten	Weiß	Gebrauchsfertig		50 Stk.
<b>Standard 1*</b> Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 2*</b> Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	0,3 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 3*</b> Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	0,9 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 4*</b> Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	1,8 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 5*</b> Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	5,4 mg/kg	1,3 ml
<b>Wash buffer</b> Waschpuffer	Braun	<b>Konzentrat</b>	<b>10x</b>	50 ml
<b>Conjugate</b> Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
<b>Stop solution</b> Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml
<b>Spike solution</b> Dotierlösung	Grün	Gebrauchsfertig	12 µg/ml	3,5 ml

\* Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Haselnussproteinkonzentration 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 Reagenzröhren 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
- 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](http://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 unabhängig von der Chargennummer auch für andere Allergen ELISA der EASY Produktlinie verwendet werden. Darüber hinaus ist ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern 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:

- 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 dest. Wassers 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 oder ggf. auch variierender Extraktionstemperaturen bei bestimmten Proben ist zu achten). Hierbei ist eine unterschiedliche Stabilität der Extrakte in Abhängigkeit vom untersuchten Parameter 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 Universelle Probenaufarbeitung

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

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g 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.
- Das Röhrchen verschließen und die Probe so lange mischen (z. B. vortexen), bis die Tablette vollständig zerfallen ist und sich eine homogene Suspension gebildet hat (ca. 10 - 30 s, Matrix-abhängig).
- 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.

**Geröstete Pekannüsse und geröstete Pistazien zeigen im RIDASCREEN® EASY Hazelnut eine schwache Reaktion oberhalb der Bestimmungsgrenze (siehe Validierungsbericht). Diese kann durch die Zugabe von 1 g Magermilchpulver (MMP) zur Extraktion unterdrückt werden. Das MMP wird vor der Zugabe von Tablette und dest. Wasser zur Probe gegeben. Siehe auch die Hinweise zur Zugabe von Fremdprotein in Kapitel 13.**

### Anmerkung

Der partikelfreie Extrakt kann bei 20 - 25 °C einen Tag und bei 2 - 8 °C zwei Tage aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung bis zu zwei Monate muss der Extrakt bei -80 °C eingefroren werden. Für eine kürzere Aufbewahrung bis zu einem Monat kann der Extrakt auch bei -20 °C aufbewahrt werden. Extrakte, die Magermilchpulver enthalten, sollten zur Vermeidung von mikrobiologischem Wachstum immer eingefroren 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 als Laufkontrolle matrixfrei als einfache Verdünnung im Extraktionspuffer im ELISA eingesetzt werden. Im Falle der Dotierung einer Matrix wird diese wie eine Lebensmittelprobe auch extrahiert. Auf diese Weise wird der gesamte Prozess (Extraktion + Testdurchführung) überwacht. Wird die Dotierlösung lediglich in Extraktionspuffer verdünnt im ELISA als Laufkontrolle eingesetzt, wird nur der korrekte Ablauf der Testdurchführung kontrolliert.

Für die Dotierung einer Lebensmittelmatrix ist die Dotierlösung gebrauchsfertig und muss nicht verdünnt werden. 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 nach Kapitel 9.1 extrahiert. Abhängig vom entnommenen Volumen der Dotierlösung kann auf diese Weise eine Probe variabel auf Konzentrationen dotiert werden, die den unterschiedlichen Bereichen der Standardkurve entsprechen.

Mit folgenden Volumina wird näherungsweise eine Konzentration erreicht, die den Standards im Kit entspricht:

Standard 2 (0,3 mg/kg):	25 µl Dotierlösung
Standard 3 (0,9 mg/kg):	75 µl Dotierlösung
Standard 4 (1,8 mg/kg):	150 µl Dotierlösung
Standard 5 (5,4 mg/kg):	450 µl Dotierlösung

Zur Herstellung einer Laufkontrolle (ohne Matrix) wird die Dotierlösung 1:100 mit frisch hergestelltem Extraktionspuffer verdünnt:

z. B. 50 µl Dotierlösung + 4950 µl Extraktionspuffer

### Achtung:

Eine Lebensmittelmatrix hat häufig einen inhibierenden 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). 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 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. 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.

Der Test ist gegen Haselnussprotein kalibriert. Das Ergebnis gibt deshalb die Menge an **Haselnussprotein in mg pro kg Lebensmittel** an.

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 Haselnussprotein in der Probe kann deshalb direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

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

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

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist bei einer Durchführung in Einzelbestimmung mit einer höheren Ungenauigkeit und bei Wiederholungstestungen mit einer höheren Schwankung der Ergebnisse zu rechnen.

## 12. Interpretation der Ergebnisse

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

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Je nach untersuchter Matrix können auch unterhalb des LoQ noch Werte mit ausreichender Präzision

(VK < 30 %) ermittelt werden. Grundsätzlich sind Werte in diesem Bereich aber aufgrund der höheren Schwankungsbreite des Tests mit einer größeren Unsicherheit versehen. Sofern die Präzision des Tests mit einer bestimmten Probenmatrix nicht validiert wurde, sollten Ergebnisse unterhalb des Messbereichs deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ “< LoQ“ angegeben werden. Weitere Informationen hierzu können Sie dem aktuellen Validierungsbericht entnehmen.

Ein Ergebnis unterhalb der LoD schließt nicht aus, dass eine Haselnusskontamination 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 Protein Zusammensetzung können in verschiedenen Haselnusssorten unterschiedlich sein. Verschiedene Haselnusssorten können daher unterschiedliche Ergebnisse liefern, da die Kalibrierung des Tests gegen das exemplarische, im Standardmaterial verwendete Haselnussmehl 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  $\pm 1\%$  gegeben.

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

empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven oder erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden. Für detaillierte Informationen zu potentiellen Matrixeffekten einzelner Lebensmittel schauen Sie bitte in den Validierungsbericht.

Generell können bei immunologischen Testmethoden gegebenenfalls Matrixeffekte durch die Zugabe von Fremdprotein (abhängig vom Test z. B. BSA, Gelatine, Magermilchpulver) während der Extraktion unterdrückt werden. Der Einfluss der Zugabe auf die Wiederfindung sollte durch Dotierversuche überprüft werden.

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

In veganen Milchalternativen auf Haselnussbasis (Haselnuss Drink) sind die Proteine häufig so stark prozessiert, dass deren Wiederfindung deutlich reduziert ist.

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.

Obwohl der Extraktionspuffer in der Lage ist, pH-Werte von Proben in einem gewissen Maße auszugleichen, kann grundsätzlich eine pH-Einstellung vor der Extraktion zu einer Verbesserung des Ergebnisses beitragen. Allerdings kann ein stark saurer pH-Wert (< pH 4,5) der zu untersuchenden Probe einen irreversiblen Einfluss auf die Struktur der Haselnussproteine haben. Dies beeinträchtigt gegebenenfalls die Wiederfindung der Haselnussproteine im Testsystem und kann je nach Probe zu einer stark reduzierten Wiederfindung führen.

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.

Detaillierte Ergebnisse sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrices 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 und Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung. Hierfür sind Allergen-freie und Allergen-haltige (dotierte) Proben zu verwenden. Zur Herstellung von Kontrollen mit einer definierten Allergenkonzentration (Dotierung) kann die im Kit enthaltene Dotierlösung verwendet werden (siehe Kapitel 10.2).
- Bei stark sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen. Hierdurch wird die Probe bereits vor der Extraktion für die Durchführung im Test pH-optimiert. Durch extreme pH-Werte verursachte Konformationsänderungen des Zielantigens sind aber nicht in allen Fällen reversibel und können trotzdem zu einer reduzierten Wiederfindung führen.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood<sup>®</sup>) durchzuführen.
- Für die Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt<sup>®</sup> / Bolt<sup>TM</sup>) [info@rbiopharm.de](mailto:info@rbiopharm.de) kontaktieren.

## 15. Weitere Applikationen

- Swabbing-Methode für den Nachweis von Kontaminationen durch Haselnuss in Produktionslinien oder an Laborgeräten.
- Extraktion mehrerer Lebensmittelproben – Vorbereitung eines größeren Extraktionspuffervolumens

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

## Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2025-10-01	Freigabeversion

## Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

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

## Patent-Hinweis:

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

## Haftungsausschluss

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

# RIDASCREEN®EASY Hazelnut

## Brief information

RIDASCREEN®EASY Hazelnut (Art. No. RAE6401) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of hazelnut 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)..... 50 min

Standard material: The RIDASCREEN®EASY Hazelnut standard material is calibrated to hazelnut protein. The NIST Reference Material 8405 Hazelnut Flour for Allergen Detection is used as standard material.

Limit of detection: 0.018 mg/kg (ppm) hazelnut protein

Limit of quantification: 0.3 mg/kg (ppm) hazelnut protein

Specificity: The antibodies used in the test specifically react with different hazelnut species (*Corylus avellana*, *C. mandshurica* and *C. heterophylla*).

There is a cross-reactivity to walnut. 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 products and accessories for hazelnut determination**

bioavid Lateral Flow Hazelnut incl. Hook line (Art. No. BLH704-15)

SureFood®ALLERGEN Hazelnut (Art. No. S3602)

SureFood®ALLERGEN 4plex Peanut/Hazelnut/Walnut + IAC (Art. Nr. S3402)

SureFood®ALLERGEN 4plex EU NUTS (Art. No. S3404)

### **1. Intended use**

RIDASCREEN®EASY Hazelnut (Art. No. RAE6401) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of contaminations by hazelnut protein in foods. Due to the large number of different food products, the following matrices were examined as representatives for different food product categories within the scope of the test development: pesto, chocolate, cookies, cake and pudding.

The test kit should generally be able to provide usable results for other foods within the methodological limits (see chapter 13). In individual cases, the user must check the suitability of the test kit by carrying out appropriate experiments before use.

Due to its set-up as sandwich ELISA, the test is not suitable for the investigation of hydrolyzed foods.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report.

### **2. General information**

Hazelnuts are one of 14 allergens that must be specifically labeled as ingredients on food products in the EU according to Regulation (EU) No. 1169/2011. Similar regulations exist in the US, Canada, Australia, and New Zealand, for example.

Allergic symptoms include skin rash, swelling, shortness of breath, asthma, stomach pain, nausea and vomiting, and can even result in an anaphylactic shock. Those affected must therefore strictly avoid foods that contain hazelnut protein. Incorrect labeling therefore poses a major risk to people with hazelnut allergies. Another source of danger is the unintentional introduction of hazelnut protein through cross-contamination during processing, storage, transport and packaging of food.

Even small amounts of hazelnut protein in food can cause allergic reactions. At the WHO/FAO, a risk assessment was done based on clinical studies and experts agreed on the fact that 5 % of people with hazelnut allergies show mild reactions without developing life-threatening symptoms when consuming up to 3 mg of hazelnut protein. 95 % of allergy sufferers show no symptoms. For this reason, in 2022 the WHO/FAO published a quantity of 3 mg of hazelnut protein as the so-called reference dose for triggering symptoms in 5 % of affected allergy sufferers (eliciting dose ED05). This is set in relation to a typical amount of food consumed to correctly assess the risk for allergy sufferers of a measured concentration of hazelnut protein in mg/kg in a food. This is how action levels for labeling allergens on food products are defined. For example, the intake of 3 mg of hazelnut protein correlates with the consumption of 100 g of a food product containing a concentration of 30 mg/kg of hazelnut protein. For a higher consumption of 400 grams, the tolerable concentration is 7.5 mg/kg of hazelnut protein. To ensure sufficient precision of detection methods, it is recommended to use a method whose limit of quantification (LoQ) is three times lower. The RIDASCREEN®EASY Hazelnut ELISA meets this requirement.

The allergy-causing proteins in hazelnuts do not lose their allergenic effect through food processing. However, some processes can influence the detection of the allergen in a test. As part of the validation of RIDASCREEN®EASY Hazelnut, processed samples that were contaminated with hazelnuts prior to processing were therefore also examined. The hazelnut allergens in these types of samples (incurred samples) have undergone essential steps in food production, thus enabling a more realistic assessment of the performance of a test method.

### **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 hazelnut proteins. By adding a standard or sample solution to the wells, hazelnut proteins present therein 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 hazelnut 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 hazelnut protein concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm. The result is expressed as mg/kg hazelnut 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
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready to use		96 wells
<b>Extraction tablets</b>	White	Ready to use		50 pcs.
<b>Standard 1*</b>	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 2*</b>	Transparent	Ready to use	0.3 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 3*</b>	Transparent	Ready to use	0.9 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 4*</b>	Transparent	Ready to use	1.8 mg/kg	1.3 mL
<b>Standard 5*</b>	Transparent	Ready to use	5.4 mg/kg	1.3 mL
<b>Wash buffer</b>	Brown	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	50 mL
<b>Conjugate</b>	Red	Ready to use		11 mL
<b>Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro</b>	Brown	Ready to use		13 mL
<b>Stop solution</b>	Yellow	Ready to use		14 mL
<b>Spike solution</b>	Green	Ready to use	12 µg/mL	3.5 mL

\* The concentration values of the standards already take into account the **dilution factor of 20** coming from sample extraction. Therefore, the hazelnut 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  $\pm 0.01$  g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500  $\times g$ ) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath ( $60^{\circ}\text{C}$  /  $140^{\circ}\text{F}$ ; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12  $\mu\text{m}$ )
- Graduated pipettes
- Measuring cylinder
- Variable 20 - 200  $\mu\text{L}$  and 200 - 1000  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT<sup>®</sup> Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

### **5.2 Reagents**

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- 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 instructions 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.de](http://www.r-biopharm.de).

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, open the container of the extraction tablets only after it has reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). The extraction tablets can also be 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 also be used 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 note the following recommendations:

- Keep the container of the extraction tablets always closed after withdrawal of tablets. Remove 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. One 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 for all EASY allergen ELISA. Extracts prepared with the tablets can be used with other EASY allergen ELISA, too (adhere to additional test-specific additives or eventually varying extraction temperatures with certain samples). Regard different extract stabilities depending on the actual test parameter.

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 and sediment usually 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 Universal sample preparation

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

Homogenize a representative, adequately big amount of a solid sample (e.g. 50 g; grind it thoroughly to powder and mix well) or mix well a sample in case of liquid foods.

- 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.

- Close the vial and mix the sample thoroughly (e.g. vortex) until the extraction tablet is fully decomposed and a homogeneous suspension has formed (approx. 10 - 30 s, depending on the matrix).
- Incubate for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Centrifuge: 5 min, at least 2,500 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.

**Roasted pecans and roasted pistachios show a weak reaction above the limit of detection in RIDASCREEN®EASY Hazelnut (see validation report). This can be suppressed by adding 1 g of skim milk powder (SMP) to the extraction. The SMP is added to the sample before adding the tablet and dist. water. See also the notes on the addition of foreign protein in chapter 13.**

## Note

The undiluted, particle-free extract can be stored for one day at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) or for two days at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). For longer storage up to two months, the extract must be frozen at -80 °C (-112 °F). For a shorter storage up to one month, the extract can also be stored at -20 °C (-4 °F). Skim milk powder containing extracts should always be stored frozen to avoid microbial degradation.

## 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 must be diluted 1:10 (1+9) with dist. water (e.g. 450 mL dest. 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 as a run control matrix-free with a simple dilution in the extraction buffer in the ELISA. If a matrix is spiked, it is extracted in the same way as other food samples. Therefore, the entire process (extraction + test procedure) is monitored. If the spiking solution is 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 a food sample and does not need to be diluted. 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 further extract according to chapter 9.1. Depending on the used volume of spiking solution, a sample can be spiked at different concentrations corresponding to the standard curve.

With the following volumes, a concentration is approximately achieved that corresponds to the standards in the kit:

Standard 2 (0.3 mg/kg): 25 µL spiking solution

Standard 3 (0.9 mg/kg): 75 µL spiking solution

Standard 4 (1.8 mg/kg): 150 µL spiking solution

Standard 5 (5.4 mg/kg): 450 µL spiking solution

To prepare a run control (without matrix), the spiking solution is diluted 1:100 with freshly prepared extraction buffer:

e.g. 50 µL spiking solution + 4950 µL extraction buffer

### **Caution:**

A food matrix often has a suppressing effect on the measurement result. This is partially compensated by the calibration of the test to prevent 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 extract (prepared according to chapter 9) in duplicate to the wells and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat three more times (a total of four wash cycles).
4. Add 100 µL of the conjugate to each well and incubate for 20 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 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 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

7. Pipette 100 µL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorption at 450 nm. Read within 30 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 immuno-assays. The evaluation should be done using the 4-parameter function.

The test is calibrated against hazelnut protein. Results therefore indicate the amount of **hazelnut protein in mg per kg** of food.

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

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

A further sample dilution and new determination is recommended for samples with an absorption ( $A_{450\text{nm}}$ )  $>$  standard 5. In case of further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the result. Further dilutions should be carried out with freshly prepared extraction buffer (see chapter 9, note on extraction tablets).

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, when performed as a single determination, a

higher degree of inaccuracy can be expected, and when performing repeated tests, a higher degree of variation in the results can be expected.

## 12. Result interpretation

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

Results between LoD and LoQ indicate a low allergen concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision ( $CV < 30\%$ ). However, values in this range are generally subject to greater uncertainty due to the higher fluctuation range of the test. If the precision of the test has not been validated with a specific sample matrix, results below the measuring range should therefore not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the validation report.

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

## 13. Limits of the method

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

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

The protein content and protein composition may vary in different hazelnut varieties. Different varieties of hazelnuts can therefore produce different results, as the test was calibrated against the exemplary hazelnut flour used in the standard material.

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 weight in of +10 %). Sufficient accuracy is given with a fluctuation of max.  $\pm 1\%$ .

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

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive or increased results but also reduce or suppress correct reactions. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments. For detailed information on potential matrix effects of individual foods, please refer to the validation report.

In general, matrix effects in immunological test methods can be suppressed by adding foreign protein (depending on the test, e.g., BSA, gelatin, skim milk powder) during extraction. The influence of the addition on recovery should be checked by spiking experiments.

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

Proteins in vegan milk alternatives based on hazelnuts (e.g. hazelnut drink) are often heavily processed. This leads to a significant reduction in recovery.

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.

Although the extraction buffer is able to level out pH values of samples to a certain extent, a pH adjustment before extraction may improve a test result. Nevertheless, strong acidic pH values (< pH 4.5) can irreversibly alter the structure of hazelnut proteins. This may affect the recovery of hazelnut proteins in the test system and, depending on the sample, can lead to a significantly reduced recovery.

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

## 14. Recommendation

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

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in the standards EN 15633-1 and 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control and ensurance of an accurate and correct test procedure. Allergen-free and allergen-containing (spiked) samples should be used. The spiking solution contained in the kit can be used to prepare controls with a defined allergen concentration (spiking) (see chapter 10.2).
- For highly acidic or alkaline samples, adjust the pH value of the sample to neutral (pH 6.5 to 7.5) before extraction. This optimizes the pH of the sample for the test before extraction. However, conformational changes in the target antigen caused by extreme pH values are not reversible in all cases and can still lead to reduced recovery.
- To perform PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- To contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

## 15. Further application notes

- Swabbing method for detecting contamination by hazelnuts in production lines or on laboratory equipment.
- Extraction of multiple food samples - preparation of a larger extraction buffer volume

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

## Version overview

Version number	Chapter and title
2025-10-01	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 means in this product contains sulfite. Food inspection methods using a sulfite-containing extractant as in this product and/or corresponding detection kits are subject to the following patents of MORINAGA & Co., Ltd.: European Patent EP 2 224 239 B1, Australian Patent AU 2008 330 507 B2, United States Patent US 8 859 212 B2, Japanese Patent JP 5 451 854 B2. The patent holder has granted R-Biopharm AG a license to use, and sell products that employ, said protected technology in the above-mentioned territories.

## Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code ("BGB") R-Biopharm AG provides a limited warranty ("Gewährleistung") against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.  
ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm's own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
  - a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
  - b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
  - c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
  - d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG's liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG's sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser's expenses, losses, or damages from loss of goodwill, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements ("Gewährleistung") implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpretation is not intended.

**R-Biopharm AG**

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17  
64297 Darmstadt, Germany  
Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt  
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40  
E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://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