

RIDASCREEN[®] Gliadin competitive

Art. No. R7021

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa dei frammenti peptidici delle gliadine e delle prolamine corrispondenti

**Approvato come AOAC Official Method of Analysis (OMA)
First Action Status 2015.05**

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Per informazioni:

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Ordini

(0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA® e RIDASCREEN®

sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN® Gliadin competitive

Introduzione

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) è utilizzato per l'analisi di alimenti fermentati ed idrolizzati (quali ad esempio, birra, sciroppo di amido, amido, estratto di malto, lievito naturale, salsa di soia) dichiarati "privi di glutine".

L'immunodosaggio enzimatico competitivo è adatto per l'analisi quantitativa dei frammenti peptidici delle prolamine di frumento (gliadine), segale (secalina) e orzo (ordeina). L'anticorpo monoclonale R5 impiegato riconosce, oltre ad altre, la sequenza tossica QQFPF espressa ripetutamente nelle molecole di prolamina.

Il kit R5 RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) è

- riconosciuto come AOAC-OMA (2015-05), First Action Status
- validato da AACCI (AACCI 38-55.01).

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio immunoenzimatico sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è richiesto un lettore colorimetrico per micropiastra.

Preparazione campioni: omogeneizzazione, estrazione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni) . ca. 30 min
esecuzione del test (tempo d'incubazione)..... 40 min

Limite di rilevabilità: 2.3 mg gliadina/ kg campione alimentare
(ca. 4.6 mg glutine/ kg campione alimentare)
(a seconda della matrice)

Limite di quantificazione: 5 mg di gliadina / kg campione alimentare
(ca. 10 mg glutine/ kg campione alimentare)

Materiale standard Il materiale standard RIDASCREEN® è un idrolizzato (miscela di grano, segale ed orzo).

Specificità: L'anticorpo monoclonale R5 riconosce le sequenze peptidiche potenzialmente tossiche di gliadina del frumento e le prolamine correlate di segale e orzo.

La cross-reattività degli anticorpi utilizzati è stata determinata per le materie prime (ad esempio, farina di mais). In alimenti composti o trattati (ad esempio il pane di mais) le cross-reattività potrebbero essere diverse. Le sostanze interferenti (ad esempio polifenoli) possono essere rilevate con prove di contaminazione.

Al fine di aumentare la qualità della valutazione durante l'esecuzione di metodi ELISA, è disponibile la nostra guida Good ELISA Practice (GEP) che elenca gli standard minimi e le procedure concernenti le condizioni generali di utilizzo dei kit per analisi di R-Biopharm AG e di esecuzione dei test ELISA. Il manuale può essere recuperato, stampato e scaricato dal sito web <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Prodotti correlati

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr.: R7001)

RIDASCREEN® FAST Gliadin (Art. Nr.: R7002)

RIDA® QUICK Gliadin (Art. Nr.: R7003, R7004, R7005)

RIDA® Extraction Solution (R7098)

Cocktail Solution (brevettata) (R7006, R7016)

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

SureFood® ALLERGEN (real time PCR) Gluten (Art. No. S3106)

SureFood® ALLERGEN QUANT (real time PCR) Gluten (Art. No. S3206)

1. Scopo

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) è utilizzato per l'analisi di alimenti fermentati ed idrolizzati (quali ad esempio, birra, sciroppo di amido, amido, estratto di malto, lievito naturale, salsa di soia) dichiarati "privi di glutine".

2. Generale

L'utilizzo della farina di frumento e del glutine nei prodotti alimentari è estremamente diffuso per la stabilità di questi ingredienti al calore e per gli utili effetti sulla struttura del prodotto, sulla ritenzione dell'umidità e sul sapore. Il glutine è una miscela di proteine prolamine e gluteline presente nel frumento, nella segale e nell'orzo.

La celiachia è un'intolleranza permanente al glutine che causa danni all'intestino tenue. Gli effetti sono reversibili se il glutine viene escluso dalla dieta.

Secondo il Codex Alimentarius (Alinorm 08/31/26), in base al contenuto di glutine, esistono attualmente due categorie di etichettatura dei prodotti alimentari:

1. Alimenti che contengono meno di 20 ppm possono essere etichettati come " **privi di glutine** ".
2. Alimenti " **a basso contenuto di glutine** " possono avere un contenuto di glutine da 20 ppm fino a 100 ppm.

Durante i processi alimentari, quali ad esempio la fermentazione o l'idrolisi, le molecole di prolamina intatte sono parzialmente o totalmente ridotte a piccoli frammenti peptidici. Per le persone celiache questi frammenti rimangono pericolosi anche dopo la digestione nello stomaco.

I test ELISA in formato sandwich non sono in grado di rilevare piccole e singole sequenze di peptidi (motivi) poiché, per la loro esecuzione, sono necessari almeno due epitopi. Tuttavia con un test immunoenzimatico competitivo è possibile rilevare singoli frammenti peptidici. RIDASCREEN® Gliadin Competitive (Art. Nr.: R7021) contiene un nuovo materiale standard. Per questo scopo, il frumento, la segale e l'orzo sono stati digeriti dalla pepsina e dalla tripsina ed i frammenti peptidici, dopo la determinazione della proteina, sono stati mescolati e liofilizzati. Il contenuto proteico è stato determinato secondo Dumas.

Il dosaggio può essere collegato alla concentrazione di prolamine e quindi ai valori limite stabiliti dal Codex Alimentarius. Il risultato è espresso in mg / kg (ppm) di gliadina. Lo standard idrolizzato è stato prodotto dal gruppo di lavoro del Prof. Dr. Köhler (German Research Centre for Food Chemistry).

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. La micropiastra è rivestita con gliadina. Vengono aggiunti rispettivamente gli standard (miscela di grano, segale e orzo), la soluzione campione e gli anticorpi anti-gliadina coniugati con perossidasi (coniugati con anticorpi R5 monoclonali). La gliadina libera e quella legata competono per i siti di legame degli anticorpi. Durante il lavaggio viene eliminato l'enzima coniugato che non si è legato. Ai pozzetti viene poi aggiunta e incubata la soluzione substrato/cromogeno. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm; l'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di peptidi prolamini presenti nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 analisi (incluse le analisi degli standard). In particolare:

Componente	Colore Tappo	Formato		Volume
Micropiastra	-	Pronta all'uso		96 pozzetti
Soluzione Tampone	Bianco	Concentrato	5x	60 ml
Standard 1 *	Trasparente	Pronto all'uso	0 ng/ml	1.3 ml
Standard 2 *	Trasparente	Pronto all'uso	10 ng/ml	1.3 ml
Standard 3 *	Trasparente	Pronto all'uso	30 ng/ml	1.3 ml
Standard 4 *	Trasparente	Pronto all'uso	90 ng/ml	1.3 ml
Standard 5 *	Trasparente	Pronto all'uso	270 ng/ml	1.3 ml
Tampone di lavaggio	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Coniugato	Rosso	Concentrato	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Soluzione di stop	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*Gli standard contengono un idrolizzato di prolamine di grano, segale e orzo. Contrariamente alla AOAC OMA Approval 2015.05 le concentrazioni degli standard sono espresse in gliadina. Per convertire la gliadina in glutine è stato utilizzato il fattore 2 (definizione del Codex Alimentarius).

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + provette per centrifuga con tappo a vite
- agitatore
- macinino/tritatore da laboratorio, mortaio e pestello, ultra-turrax oppure omogenizzatore
- pipette graduate
- micropipette variabili da 20 - 200 µl e da 200 - 1000 µl

5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata
- per l'estrazione dei campioni di amido/sciroppo è richiesta una **soluzione di etanolo (60%)**. A tal fine aggiungere 150 ml di etanolo a 100 ml di acqua distillata e agitare bene
- per l'estrazione di campioni contenenti polifenoli, quali **birra, malto e luppolo** è richiesta una **soluzione di etanolo (60%) contenente il 10% di gelatina di pesce liquida**. A tal fine versare 30 ml di acqua distillata in un cilindro graduato da 100 ml, aggiungere 10 g di gelatina liquida di pesce (ad es. Serva, Art. No. 22156 or Sigma Art. No. G-7765, entrambe con un contenuto solido del 45%) e mescolare bene; aggiungere 60 ml di etanolo p.a, miscelare, regolare il pH a 8,5 e portare a 100 ml con acqua distillata. La gelatina di pesce non si può disciogliere completamente in etanolo al 60% pertanto prelevare il volume richiesto per la preparazione del campione sotto agitazione. La gelatina di pesce in soluzione di etanolo può essere conservata per 2 settimane a temperatura ambiente.
- idrossido di sodio 1 M

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test dovrebbe essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere rispettate rigorosamente.

Il kit può contenere ulteriori sostanze pericolose. Per maggiori dettagli, si prega di far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) disponibile direttamente sul sito web www.r-biopharm.com.

7. Conservazione

Conservare il kit a 2-8°C (35-46°F). **Non congelare alcun componente del kit.**

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa e conservata a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno di colore rosso è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

Non si applica alcuna garanzia di qualità dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con numero di lotto differente.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno, di colore rosso, prima dell'esecuzione del test.
- Valori inferiori a 0,8 unità di assorbanza ($A_{450nm} < 0,8$) per lo standard zero

9. Preparazione dei campioni

9.1. Indicazioni preliminari

Polveri di cereali sospese nell'ambiente e un'attrezzatura da laboratorio non perfettamente pulita possono determinare la contaminazione del saggio. E' bene quindi indossare i guanti durante l'esecuzione del test e prima di avviare la procedura:

- pulire le superfici, le provette in vetro, i macinini/tritadori e tutta l'attrezzatura con etanolo al 60% (vedi par. 5.2.)
- eseguire la preparazione del campione in un locale isolato da quello dove si esegue il test immunoenzimatico ELISA
- verificare l'eventuale contaminazione da gliadina dei reagenti e dell'attrezzatura utilizzando le strip RIDA[®]QUICK Gliadin (Cod. R7003, R7004, R7005)

9.2. Estrazione dei campioni

Nel saggio RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021) non è possibile utilizzare campioni preparati con la soluzione cocktail. Utilizzare quindi sempre l'estrazione con etanolo.

Il **tampone del campione** è fornito concentrato 5X. Diluire con acqua distillata solamente la quantità necessaria per l'esecuzione del saggio (esempio 3 ml di concentrato + 12 ml di acqua distillata, sufficiente per la diluizione di 10 campioni). Accertarsi che il diluente non sia contaminato dalla gliadina contenuta nel campione.

Omogeneizzare una quantità rappresentativa di campione alimentare (5 - 50 g)

- campioni solidi (es. amido e sciroppo d'amido)** pesare 1 g di campione rappresentativo e aggiungere 10 ml di soluzione di etanolo al 60% (vedi 5.2.)
- campioni contenenti polifenoli (es. malto e luppolo):** pesare 1 g di campione rappresentativo, omogeneizzarlo ed aggiungere 10 ml di soluzione di etanolo al 60% contenente 10% di gelatina di pesce (vedi 5.2)
- campioni liquidi (es. salsa di soia)** mescolare 1 ml di campione con 9 ml della soluzione di etanolo al 60% (vedi 5.2)

–**birra**: miscelare 1 ml di campione con 9 ml di soluzione di etanolo al 60% contenente il 10% di gelatina di pesce (vedi 5.2.)

Procedere per tutti i campioni nel modo seguente:

- miscelare con cura per almeno 30 secondi (con vortex)
- agitare bene per inversione o tramite rotazione per 10 minuti
- centrifugare per 10 min a 2500 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e/o filtrare l'estratto (in alternativa centrifugare ad alta velocità per 10 min 2 ml di estratto in una apposita provetta utilizzando una microcentrifuga)
- diluire ulteriormente il surnatante 1:50 (1+49) con il diluente del campione (ad esempio 20 µl di surnatante + 980 µl di tampone diluito)
- utilizzare 50 µl per pozzetto

Nota:

I surnatanti ottenuti dalla centrifugazione si conservano ben chiusi al buio a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) fino a 4 settimane.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) prima dell'uso.

L'**anticorpo coniugato con enzima** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato 11X. Dal momento che l'enzima coniugato diluito ha una stabilità limitata, è consigliabile ricostituire solo la quantità necessaria ad effettuare il dosaggio. Prima di pipettare l'enzima, agitarlo accuratamente. Ricostituire l'enzima coniugato diluendolo 1:11 (1+10) con acqua distillata (es. 100 µl di coniugato concentrato + 1 ml di acqua, sufficiente per 2 strip). Assicurarsi che l'acqua non sia contaminata da gliadina.

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10X. Prima della diluizione del tampone concentrato, sciogliere eventuali cristalli mediante riscaldamento a 37°C (99°F) in un bagnetto termostatico e mescolare bene. Successivamente diluire il tampone concentrato 1:10 (1+9) con acqua distillata (ad esempio 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone di lavaggio diluito è stabile a 20 - 25 °C (68 - 77 °F) per 4 settimane.

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test.

Si raccomanda di dispensare il coniugato, il substrato/cromogeno e la soluzione di stop con una pipetta multicanale o stepper al fine di evitare slittamenti di tempo sulla piastra.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard e ai campioni.
2. Pipettare 50 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti.
3. Aggiungere 50 µl di enzima coniugato diluito (vedi par. 10.1.) in ogni pozzetto, miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).
4. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per 3 volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio diluito (vedi par. 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte.
5. In ogni pozzetto aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno. Agitare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm contro aria, entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per l'elaborazione dei test ELISA RIDASCREEN® è disponibile il software denominato RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996). Il calcolo deve essere fatto per mezzo di una funzione spline cubica. Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato.

Per ottenere la concentrazione di gliadina in ng/ml, moltiplicare la concentrazione letta sulla curva di calibrazione per il fattore di diluizione 500. Questo fattore 500 è già impostato nel RIDA®SOFT Win .

Il RIDA®SOFT Win (Versione 1.93 e successive) esprime i risultati in gliadina e glutine. L'acticorpo R5 rileva gliadina, secalina e ordeina.

Per avere il risultato espresso in glutine, si utilizza solitamente il fattore 2 (definizione Codex Alimentarius). Tuttavia, questo fattore dipende molto dal campione analizzato, soprattutto per gli amidi che possono contenere una maggiore percentuale di glutenine. In questo caso il fattore è maggiore di 2 e di conseguenza la concentrazione di glutine è superiore.

Esempio:

Dalla curva standard si ottiene una concentrazione di 50 ng/ml (ppb) di glutine. Moltiplicando per il fattore di diluizione raccomandato di 500, si ottengono 25000 ng/kg di gliadina, che corrispondono a 25 mg/kg (ppm) di gliadina. Per calcolare il glutine effettivamente contenuto, è necessario moltiplicare per il fattore 2, con un risultato finale di 50 mg/kg (ppm) di glutine.

Ulteriori informazioni:

La tabella seguente mostra l'intervallo di variazione per l'analisi di campioni idrolizzati (ulteriori dati sulle prestazioni del metodo sono pubblicati nel J. AOAC. Int. 98: 1346-1354, 2015).

Symbol	Beer			Starch syrup		Sourdough	
	gluten-free	15 mg/kg prolamin	50 mg/kg prolamin	gluten-free	naturally contaminated	35 mg/kg prolamin	75 mg/kg prolamin
Total number of laboratories	13	12	11	13	13	13	13
Total number of replicates	26	24	22	26	26	26	26
Overall mean	1.2	13.1	59.7	0.7	5.3	24.2	72.8
Recovery (%)		87	119			69	97
Repeatability SD* (mg/kg) s(r)	1.2	4.0	18.6	1.0	0.9	5.6	14.2
Reproducibility SD* (mg/kg) s(R)	1.5	4.8	18.6	1.5	1.8	6.3	20.0
Repeatability rel. SD* (%) RSD(r)	97.9	30.2	31.2	157.2	16.3	23.1	19.5
Reproducibility rel. SD* (%) RSD(R)	126.1	36.9	31.2	236.1	34.4	25.9	27.5
Horrat value	8.1	3.4	3.6	13.8	2.8	2.6	3.3

- La digestione con pepsina/tripsina utilizzata come calibratore in questo test non rappresenta tutti i processi di idrolisi. Si consiglia agli utilizzatori di verificare le prestazioni del metodo per i propri processi specifici.

- I campioni risultati negativi potrebbero ancora contenere una contaminazione di glutine al di sotto del limite di rilevazione del test
- A causa del gran numero di tipi di alimenti, non si possono escludere effetti matrice. In alimenti processati (ad esempio il trattamento termico, disidratazione, ecc), le proteine possono essere modificate o frammentate, questo può avere un impatto sul recupero / reattività crociata.
- I campioni sottoposti a trattamento termico estratti con etanolo mostrano valori di recupero ridotti. Per questi campioni si raccomanda di eseguire l'estrazione con la Cocktail (brevettata) e l'analisi con il kit sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin..

Raccomandazioni:

Al fine di assicurare un elevato rendimento analitico:

- ogni campione deve essere analizzato in duplicato
- utilizzare anche campioni senza glutine e con glutine (addizionati) come controllo
- eseguire prove di spike per una procedura accurata e corretta
- confermare i risultati con i kit SureFood® PCR

Ulteriori note applicative:

- Analisi del glutine in enzimi supplementari

Il rapporto di validazione contenete ulteriori informazioni è disponibile presso il rivenditore locale o presso R-Biopharm AG.

R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.