

RIDASCREEN[®] FAST Gliadin sensitive

Art. No. R7051

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Gliadinen und verwandten Prolaminen

Enzyme immunoassay for the quantitative of gliadins and corresponding prolamins

Enzimoimmunoensayo para la detección cuantitativa de gliadinas y prolaminas correspondientes

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Almacenar a 2 – 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Para más consultas e información por favor contacte:

Zentrale/Switchboard/Central

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

Auftragsannahme/Order department/Nuestro departamento

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales/Marketing y Ventas

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail: info@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDA® y RIDASCREEN®
son marcas registradas de R-Biopharm AG
Elaborador R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG tiene certificación ISO 9001.

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive

Información breve

El kit RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (R7051) es un enzimoimmunoensayo sándwich para la determinación de prolaminas de cereales que contienen gluten en alimentos declarados “gluten free” (galletitas, harina de arroz, harina de avena, salchichas, harina de quínoa, harina de mijo).

Todos los reactivos requeridos para el enzimoimmunoensayo –incluyendo los estándares – están contenidos en el kit. El kit es suficiente para 96 determinaciones (incluyendo los estándares). Se requiere un espectrofotómetro para la cuantificación.

Preparación de muestra:	homogeneización y extracción
Material estándar:	El material de los estándares de RIDASCREEN® está calibrado con el estándar del Prolamin Working Group.
Tiempo requerido:	Preparación de muestras Cocktail (patented) (para 10 muestras)aprox. 2 h Cocktail ECO (para 10 muestras).....aprox. 35 min Implementación del ensayos (tpo. incubación)..30 min
Límite de detección:	0.2 mg/kg (ppm) gliadina o. 0.4 mg/kg (ppm) gluten (dependiendo de la matriz)
Límite de cuantificación:	1.25 mg/kg (ppm) gliadina o 2.5 mg/kg (ppm) gluten
Especificidad:	El anticuerpo monoclonal R5 reacciona con las fracciones de gliadina de trigo y las prolaminas correspondientes de centeno y cebada.

Las reactividades cruzadas de los anticuerpos usados se determinaron para alimentos puros (ej. Harina de maíz). En alimentos compuestos/procesados (ej. Pan de maíz) las reactividades cruzadas pueden diferir. Las sustancias interferentes (ej. Polifenoles) se pueden detectar en experimentos de fortificación. Más información se describe en el reporte de validación actualizado.

Con el fin de aumentar la calidad de la evaluación al realizar procedimientos ELISA, nos referimos además a la Buena Práctica de ELISA (GEP) - Manual en la versión respectiva. Dichos manuales listan las normas mínimas relativas a las condiciones generales utilizando los kits de ensayo de R-Biopharm AG y la realización de análisis ELISA. El manual puede ser descargado e impreso en el sitio web www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis.

Productos relacionados

RIDASCREEN® Gliadin (R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (R7061)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)

Cocktail (patented) (R7006/R7016)

Cocktail ECO (R7080)

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

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

RIDA®QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)

SureFood® PCR Allergen Gluten

1. Intenciones de uso

El kit RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (R7051) es un enzimoimmunoensayo sándwich para la determinación de prolaminas de cereales que contienen gluten en alimentos declarados “gluten free” (galletitas, harina de arroz, harina de avena, salchichas, harina de quínoa, chocolate, harina de mijo).

La preparación de muestra usando el **Cocktail (patented)** (R7006/R7016) es el método oficial de Méndez se acuerdo al Codex Alimentarius y AOAC.

La preparación de muestra más rápida utilizando el **Cocktail ECO** (R7080) más amigable con el ambiente, tiene una eficiencia de extracción de aprox. 70 - 110% comparada con el Cocktail (patented).

2. General

El uso de harina de trigo y gluten en alimentos es muy común dada su estabilidad térmica y sus efectos beneficiosos en la textura, retención de humedad y gusto de los alimentos. El gluten es una mezcla de prolaminas y glutelinas presentes en el trigo, el centeno y la cebada.

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente al gluten que daña el intestino delgado y que es reversible si el gluten se evita en la dieta.

En concordancia con el Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979) existen actualmente dos categorías para etiquetar a los alimentos de acuerdo a su contenido de gluten:

1.) Alimentos que contengan menos de 20 ppm se puede rotular como “**libres de Gluten**” ("gluten-free").

2.) Alimentos rotulados “**muy bajos en gluten**” ("very low gluten") pueden tener un contenido de gluten mayor a 20 y menor a 100 ppm.

El usos de harina de trigo y gluten en alimentos es extremadamente común debido a su estabilidad térmica y sus efectos beneficiosos sobre por ej. textura, retención de humedad y sabor. El Gluten es una mezcla de proteínas (prolaminas y glutelinas) presentes en trigo, centeno y cebada.

3. Principio del ensayo

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están recubiertos con el anticuerpo específico R5 contra gliadinas. Por el agregado de estándares o soluciones de muestra en los pocillos, la gliadina presente se unirá a los anticuerpos específicos de captura. El resultado es un complejo anticuerpo-antígeno. Los componentes que no se unen a los anticuerpos son removidos en el paso de lavado. Se agrega, entonces anticuerpo R5 conjugado con peroxidasa. Este anticuerpo conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo. Se forma un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo (sándwich). El conjugado enzimático no unido es removido en el paso de lavado. Se agrega sustrato/cromógeno a los pocillos y se incuba. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno incoloro en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color, de azul a amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm. La absorción es proporcional a la concentración de gliadina en la muestra.

4. Reactivos provistos

Cada kit contiene materiales suficientes para 96 mediciones (incluyendo los estándares). Cada kit contiene:

Componente	Color de tapa	Formato	Volumen
Placa microtitulación	-	Lista para usar	96 Pocillos
Buffer	Transparente	Listo para usar	2 x 100 ml
Estándar 1	Transparente	Listo para usar	0 ng / ml gliadina
Estándar 2	Transparente	Listo para usar	2.5 ng / ml gliadina
Estándar 3	Transparente	Listo para usar	5 ng / ml gliadina
Estándar 4	Transparente	Listo para usar	10 ng / ml gliadina
Estándar 5	Transparente	Listo para usar	20 ng / ml gliadina
Buffer de lavado	Marrón	Concentrado	10x
Conjugado	Rojo	Listo para usar	10 ml
Sustrato/Cromógeno Red chromogen Pro	Marrón	Listo para usar	10 ml
Solución Stop	Amarillo	Listo para usar	14 ml

5. Materiales requeridos pero no provistos

5.1. Equipamiento

- espectrofotómetro de microplaca (450 nm)
- centrífuga, viales de centrífuga (ej. Brand 10742512)
- agitador
- molinillo de laboratorio / molino, mortero, ultra-turrax u homogeneizador
- baño de agua (50 °C / 122 °F)
- pipetas graduadas
- micropipetas de volumen variable 20 µl - 200 µl y 200 - 1000 µl

5.2. Reactivos

- agua destilada o deionizada
- **leche en polvo descremada** (gluten free) calidad alimenticia
- **Cocktail (patented)** (R7006/R7016, 105 ml/1000 ml) y **solución de etanol (80 %)**: ej. agregar 120 ml etanol p.a. a 30 ml agua destilada y agitar bien o
- **Cocktail ECO** (R7080), y **solución de etanol (80 %)**: ej. Agregar 120 ml etanol p.a. a 30 ml de agua destilada y agitar bien

6. Advertencias y precauciones para el usuario

Este ensayo debe llevarse a cabo solamente por laboratoristas bien entrenados. Deben seguirse estrictamente las instrucciones.

El kit puede contener sustancias peligrosas. Para las notas de seguridad de las sustancias contenidas, por favor refiérase a las Hojas de Seguridad (MSDS) de este producto disponibles en línea en www.r-biopharm.com

7. Instrucciones de almacenamiento

Almacenar el kit a 2 - 8 °C (35 - 46 °F). No congelar ningún componente del kit.

Guarde los pocillos no utilizados dentro del envase original, séllelos junto con el desecador provisto y almacene a 2 - 8°C (35 - 46°F)

El sustrato/cromógeno es sensible a la luz, evite la exposición directa a la luz.

No se garantiza calidad luego del vencimiento del kit (ver etiqueta).

No intercambie reactivos entre kits de diferente número de lote.

8. Indicación de inestabilidad o deterioro de los reactivos

- cualquier coloración azulada del sustrato/cromógeno teñido de rojo antes de la implementación del ensayo
- un valor menor a 1.2 unidades de absorbancia ($A_{450\text{ nm}}$) para el estándar 5

9. Preparación de las muestras

9.1. Comentarios preliminares

El polvo de cereal esparcido en el aire y el equipamiento de laboratorio sucio lleva a la contaminación del ensayo con gliadina. Por lo tanto utilice guantes durante el ensayo y antes de empezar el mismo.

- limpie las superficies, viales de vidrio y otros equipos con etanol 40 % o con 2-propanol (ver 5.2)
- lleve a cabo la preparación de la muestra en una habitación aislada del procedimiento del ELISA
- verifique la contaminación de reactivos y equipo por gliadina con las tiras de ensayo RIDA®QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)
- se recomienda trabajar **bajo campana química**, debido al β -mercaptoetanol del cóctel (patentado)
- el β -mercaptoetanol puede alterar el ELISA, por lo tanto diluya la muestra **al menos 1:500** (se recomienda 1:500 para muestras con aprox. 10 mg/kg de gluten y 1:2500 para muestras con aprox. 50 mg/kg de gluten)

9.2. Extracción con Cocktail (patented) (R7006 / R7016, método oficial AOAC)

Homogeneizar bien una cantidad suficiente (al menos 5 g o 5 ml) de muestra (molerla finamente a polvo o mezclar bien la solución respectivamente).

- **muestras líquidas**: usar 0.25 ml de muestra homogeneizada y agregar 2.5 ml de Cocktail (patented), cerrar el vial y mezclar bien
- **otras muestras (ej muestras conteniendo soja y quínoa)**: pesar 0.25 g de la muestra homogeneizada y agregar 2.5 ml del Cocktail (patented), cerrar el vial y mezclar bien
- **muestras conteniendo taninos y polifenoles (ej. chocolate, café, cacao, harina de castaña, alforfón, mijo y especias)**: pesar 0.25 g de muestra homogeneizada, agregar 0.25 g de leche en polvo descremada y agregar 2.5 ml de Cocktail (patented), cerrar el vial y mezclar bien
- **carne y salchichas**: en estas matrices la gliadina puede estar distribuida en forma no homogénea, por ello pese 50 g de muestra y homogeneice: pesar 0.25

g de la muestra homogeneizada y agregar 2.5 ml de Cocktail (patented), cerrar el vial y mezclar bien

- **muestras de avena:** la gliadina puede estar distribuida en forma no homogénea. Por ello homogeneice 200g, luego realice la extracción con al menos 4 veces la cantidad de reactivos: pese 1 g de muestra homogeneizada y agregue 10 ml de Cocktail (patented), cerrar el vial y mezclar bien

Por favor continúe extrayendo las muestras como se describe a continuación:

- incubar por 40 min a 50 °C (122 °F)
- dejar enfriar la muestra y luego mezclar con 7.5 ml de etanol 80 % (ver 5.2.) (para muestras de avena: 30 ml de etanol 80 %)
- cerrar el vial y agitar por 1 h cabeza cola o con rotador a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- centrifugar: 10 min, al menos a 2500 g, a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) y/o filtrar el extracto (alternativamente centrifugar 2 ml del extracto a alta velocidad por 10 min en tubos de reacción utilizando una microcentrífuga)
- transferir el sobrenadante a un vial con tapa a rosca
- diluir la muestra 1:12.5 (1+11.5 / 80 µl + 920 µl) con buffer: el factor final de dilución es 500
- usar **inmediatamente** 100 µl por pocillo en el ensayo

Advertencia:

El sobrenadante obtenido de la centrifugación o el filtrado pueden almacenarse en un vial muy bien tapado en oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) hasta ocho semanas.

9.3. Extracción con Cocktail ECO (más rápido y ambiente amigable)

La preparación de muestra se describe en el inserto del Cocktail ECO (R7080). Para esta preparación de muestra más rápida y ambiente amigable **no** es necesario trabajar en una campana química.

10. Implementación del ensayo

10.1. Preparación del ensayo

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) antes de usar.

El buffer de lavado se provee concentrado 10 veces. Antes de diluir el buffer concentrado, disolver cualquier cristal en baño de agua a 37 °C (99 °F)

completamente y mezclar bien. Luego diluir el buffer concentrado calentado 1:10 (1+9) con agua destilada antes de usar (ej. 100 ml buffer concentrado + 900 ml agua destilada). El buffer de lavado diluido es estable a 20 - 25 °C (68 - 77 °F) por aprox. cuatro semanas.

10.2. Procedimiento del ensayo

Seguir cuidadosamente el procedimiento de lavado recomendado. No permita que los pocillos se sequen entre las etapas de trabajo.

No utilice más de 3 tiras (24 pocillos) al mismo tiempo. Para un ensayo utilizando de tres a seis tiras, debe utilizarse una segunda microplaca sin sensibilizar (ej. placas de bajo pegado de Greiner bio-one Cat.-No. 655101 o Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) debe utilizarse como pre-placa para evitar tiempos diferentes en la misma microplaca. Todos los estándares y muestras se pipeteen en la placa no sensibilizada (al menos 150 µl por pocillo) y luego se transfieren rápidamente a la microplaca sensibilizada con un micropipeta de 8 canales.

Se recomienda pipetear el conjugado, el sustrato/cromógeno y solución stop con pipeta multicanal o multidispensadora para evitar diferentes tiempos en la placa.

1. Insertar un número suficiente de pocillos en el soporte para analizar todos los estándares y muestras por duplicado. Rotular las posiciones de los estándares y muestras.
2. Agregar 100 µl de cada estándar y muestra a pocillos separados por duplicado e incubar por 10 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Eliminar el líquido de los pocillos y golpear la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (tres veces) para asegurarse una completa remoción de líquido de los pocillos. Llenar los pocillos con 250 µl de buffer de lavado diluido (ver 10.1.) y eliminar nuevamente el líquido. Repetir el procedimiento dos veces más.
4. Agregar 100 µl del conjugado a cada pocillo e incubar por 10 min a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Eliminar el líquido de los pocillos y golpear la microplaca vigorosamente hacia abajo sobre un papel absorbente (tres veces) para asegurarse una completa remoción de líquido de los pocillos. Llenar los pocillos con 250 µl de buffer de lavado diluido (ver 10.1.) y eliminar nuevamente el líquido. Repetir el procedimiento dos veces más.

6. Agregar 100 µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo. Mezclar gentilmente por agitación manual de la placa e incubar por 10 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) en oscuridad.
7. Agregar 100 µl de solución stop a cada pocillo. Mezclar gentilmente por agitación manual de la placa y medir la absorbancia a 450 nm. Leer dentro de los 10 min luego de la adición de la solución stop.

11. Resultados

Está disponible un software especial, RIDA®SOFT Win. NET (Art. No. Z9999) para evaluar los ensayos RIDASCREEN® ELISA. El cálculo debe realizarse utilizando la función Spline cúbico. El curso de la curva de estándares se muestra en el Certificado de Aseguramiento de Calidad incluido en el kit. El documento "Criterios de Aceptación" provee los criterios para evaluar la curva de estándares. Para aseguramiento de la calidad, deben utilizarse controles de ensayo.

Comparado con el certificado, valores mayores de absorbancia ($A_{450 \text{ nm}}$) para la curva de estándares, especialmente para el estándar cero, puede ser el resultado de un lavado insuficiente o de contaminación con Gluten.

Se recomienda realizar otra dilución y una nueva determinación de las muestras con valores de absorbancia ($A_{450 \text{ nm}}$) > estándar 5.

La concentración de gliadina en ng/ml (ppb) se lee de la curva de calibración obtenida con el programa RIDA®SOFT Win.NET y debe ser multiplicada por el factor de dilución 500. Este resultado es nuevamente multiplicado por 2 para obtener la concentración de gluten (usualmente la gliadina representa el 50 % de las proteínas presentes en el gluten, Definición del Codex). El RIDA®SOFT Win (Versión 1.93 o posterior) indica el resultado en gliadina y en gluten.

Ejemplo:

El valor de absorbancia de la muestra corresponde a 10 ng/ml de gliadina en la curva de calibración. Multiplicando por el factor de dilución recomendado de 500, lleva a una concentración de 5 mg/kg (ppm) que corresponden a 0.0005 % de gliadina. Para calcular el contenido de gluten, es necesario multiplicar por un factor de 2 que resulta en 10 mg/kg de gluten, respectivamente 0.001 % de gluten. Esta muestra es considerada "libre de gluten", porque la concentración de gluten es menor a 20 mg/kg.

En general:

Las muestras negativas ensayadas aún podrían contener una contaminación de gluten por debajo del límite de detección del ensayo, o pueden contener otros componentes alergénicos como lípidos, por ejemplo.

Debido a la multitud de tipos de alimentos, los efectos de matriz no pueden ser excluidos. En los alimentos procesados (ej. tratamiento térmico, deshidratación, etc.), las proteínas pueden estar alteradas o fragmentadas, esto puede tener un impacto en la recuperación/reactividad cruzada.

Para la evaluación de la reactividad cruzada sólo se analizó una muestra ejemplar, otras muestras pueden mostrar un resultado diferente. Todas las reactividades cruzadas y matrices ejemplares analizadas se describen en el informe de validación.

El contenido proteico y la composición de proteínas de cultivares de trigo, centeno y cebada puede diferir. Se puede esperar resultados variados de diferentes cultivares.

Recomendaciones:

Con el objeto de asegurar un alto desempeño analítico:

- Cada muestra debe analizarse por duplicado
- Utilizar muestras libres de gluten y conteniendo gluten (fortificadas) como controles del ensayo
- Llevar a cabo experimentos de fortificación para un procedimiento preciso y correcto
- Muestras altamente alcalinas o ácidas tienen que ser neutralizadas antes de su análisis
- Confirmar los resultados con PCR (ej. SureFood[®] PCR Allergen Gluten)
- En la producción de alimentos como cerveza o masa fermentada, las proteínas están fragmentadas. En el ELISA sándwich, dichos fragmentos proteicos llevan a una reducción en la recuperación; dichas muestras deben ser analizadas con un sistema de ELISA competitivo como el RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021)
- No se recomienda extrapolar por debajo del límite de cuantificación
- Para detalles de uso en automatización (ej. Thunder Bolt[®] / Bolt, GEMINI) por favor contacte sales@r-biopharm.de

Más Notas de Aplicación:

- Preparación de muestras procesadas con el RIDA[®] Extraction Solution (incolora) (Art. No. R7098) – solamente luego de validación
- Preparación de muestras de materias primas con etanol
- Preparación de materias primas conteniendo polifenoles (ej. Chocolate, café, cacao, alforfón) con gelatina de pescado y etanol

Para más información de este producto y notas de aplicación, por favor contacte sales@r-biopharm.de.

Los datos corresponden a nuestro estado actual de tecnología y provee información de nuestros productos y sus usos. R-Biopharm no ofrece garantías de ningún tipo, tanto explícitas como implícitas, excepto que los materiales con los que están hechos sus productos son de calidad estándar. Los productos defectuosos se reemplazarán. No hay garantías sobre la comercialización de este producto o de la utilización del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no es responsable por ningún daño, incluidos daños especiales o por consecuencia, o gastos originados directa o indirectamente del uso de este producto.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321