

# **RIDASCREEN® FAST Gliadin sensitive**

**Art. No. R7051**

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

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](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl  
Via Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Telefono 02 9823 3330  
[info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it) - [www.r-biopharm.com](http://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<sup>®</sup> FAST Gliadin sensitive

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051) è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di prolamine provenienti da cereali contenenti glutine in alimenti dichiarati come privi di glutine (biscotti, farina di riso, farina d'avena, insaccati, farina di quinoa, cioccolato, farina di miglio).

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio immunoenzimatico - inclusi gli standard - 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 ed estrazione

Materiale standard: Il materiale standard RIDASCREEN<sup>®</sup> è calibrato per lo standard del Prolamin Working Group.

Tempo richiesto: preparazione dei campioni  
Cocktail (brevettata) (per 10 campioni).....ca. 2 ore  
Cocktail ECO (per 10 campioni).....ca. 35 min  
esecuzione del test (tempo d'incubazione).....30min

Limite di rilevabilità: 0.2 mg/kg (ppm) di gliadina corrispondenti a 0.4 mg/kg (ppm) di glutine (a seconda della matrice)

Limite di quantificazione: 1.25 mg/kg (ppm) di gliadina oppure 2.5 mg/kg (ppm) di glutine

Specificità: L'anticorpo monoclonale R5 reagisce con le frazioni di gliadina del frumento e con 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>.

### **Articoli correlati**

RIDASCREEN® Gliadin (R7001)

RIDASCREEN® FAST Gliadin (R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)

Cocktail (brevettata) (R7006/R7016)

Cocktail ECO (R7080)

RIDA® Extraction Solution (incolore) (R7098)

Set of 3 Gliadin Assay Controls (Art. Nr.: R7012)

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

SureFood® PCR Allergen Gluten

## **1. Scopo**

RIDASCREEN® FAST Gliadin sensitive (R7051) è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di prolamine provenienti da cereali contenenti glutine in alimenti dichiarati come privi di glutine (biscotti, farina di riso, farina d'avena, insaccati, farina di quinoa, cioccolato, farina di miglio).

La preparazione del campione utilizzando la **Cocktail (brevettata)** (R7006/R7016) è il metodo ufficiale R5-Mendez secondo il Codex Alimentarius e l'AOAC. L'estrazione più rapida eseguita con l'ecologica **Cocktail ECO** (R7080) è adatta per lo screening dei campioni. La Cocktail ECO mostra un'efficienza di estrazione di circa 70-110% rispetto al Cocktail (brevettata).

## 2. Generale

L'utilizzo di farina di frumento e di glutine negli alimenti è estremamente comune, a causa della stabilità termica di questi ingredienti e agli utili effetti da essi esercitati sulla consistenza, la ritenzione dell'umidità e il sapore. Il glutine è una miscela di prolamine e gluteline presente in frumento, segale e orzo.

La celiachia è un'intolleranza permanente al glutine che causa danni all'intestino tenue ma è reversibile se il glutine viene eliminato dalla dieta.

Secondo il Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979), in base al contenuto di glutine, esistono attualmente due categorie di etichettatura dei prodotti alimentari:

1. Alimenti che contengono meno di 20 mg/kg possono essere etichettati come " **privi di glutine** ".

2. Alimenti " **a basso contenuto di glutine** " possono avere un contenuto di glutine da 20 fino a 100 mg/kg.

La soglia di 20 mg/kg è stata adottata da molte legislazioni nazionali in molti paesi.

## 3. Principio

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi specifici R5 anti-gliadine. Aggiungendo gli standard e le soluzioni campione nei pozzetti, la gliadina presente viene immobilizzata dagli anticorpi specifici di cattura. Ne risulta un complesso antigene-anticorpo. I componenti dei campioni non legati dagli anticorpi vengono rimossi durante il lavaggio. Viene quindi aggiunto l'anticorpo coniugato R5 con perossidasi. Questo anticorpo coniugato si lega al complesso antigene-anticorpo, dando luogo alla formazione di un complesso anticorpo-antigene-anticorpo (sandwich). L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Successivamente viene aggiunto ai pozzetti ed incubato il substrato enzima/cromogeno. Il coniugato legato converte il cromogeno incolore 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'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di gliadina nel campione.

## 4. Reagenti forniti

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

Componente	Colore Tappo	Fromato		Volume
<b>Micropiastra</b>	-	Pronta all'uso	-	96 pozzetti
<b>Soluzione Tampone</b>	Trasparente	Pronta all'uso	-	2 x 100 ml
<b>Standard 1</b>	Trasparente	Pronto all'uso	0 ng/ml gliadina	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	Trasparente	Pronto all'uso	2.5 ng/ml gliadina	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	Trasparente	Pronto all'uso	5 ng/ml gliadina	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	Trasparente	Pronto all'uso	10 ng/ml gliadina	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	Trasparente	Pronto all'uso	20 ng/ml gliadina	1.3 ml
<b>Tampone di lavaggio</b>	Marrone	<b>Concentrato</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Coniugato</b>	Rosso	Pronto all'uso	-	10 ml
<b>Substrato/Cromogeno</b> Red chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso	-	10 ml
<b>Soluzione di stop</b>	Giallo	Pronto all'uso	-	14 ml

## 5. Materiale richiesto ma non fornito

### 5.1. Attrezzatura:

- lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- centrifuga con provette per centrifuga (es. Brand 10742512)
- agitatore
- macinino da laboratorio, pestello e mortaio, ultra-turrax oppure omogenizzatore
- bagnetto termostato (50°C/122°F)
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20-200 µl e 200-1000 µl

### 5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata
- **latte scremato in polvere** senza glutine (qualità alimentare)
- **Cocktail (brevettata)** (R7006 / R7016, 105 ml / 1000 ml) e **soluzione di etanolo (80%)**: mescolare ad esempio 120 ml di etanolo p.a. con 30 ml di acqua distillata e agitare accuratamente
- **Cocktail ECO** (R7080) e **soluzione di etanolo (80%)**: mescolare ad esempio 120 ml di etanolo p.a. con 30 ml di acqua distillata e agitare accuratamente.

## 6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

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

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per le informazioni sulla pericolosità delle sostanze contenute, consultare le schede di sicurezza (MSDS) appropriate per questo prodotto, disponibili online all'indirizzo <http://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).

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

La garanzia di qualità del prodotto decade alla data di scadenza del kit riportata in etichetta.

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra del substrato/cromogeno prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori a 1.2 unità di assorbanza ( $A_{450nm}$ ) per lo standard 5

## 9. Preparazione dei campioni

### 9.1. Indicazioni preliminari

Polvere di cereale presente nell'aria e attrezzatura da laboratorio sporca possono portare alla contaminazione dell'analisi con gliadina. Pertanto, indossare i guanti durante l'analisi e prima di iniziare il test:

- pulire superfici, contenitori di vetro, macinini e altre attrezzature con etanolo o 2-propanolo al 40% (vedi par. 5.2.)
- eseguire l'estrazione dei campioni in un locale isolato da quello dove verrà svolto il test ELISA

- verificare la contaminazione dei reagenti e dell'attrezzatura con le strips RIDA®QUICK Gliadin (cod. R7003/R7004/R7005)
- Si raccomanda di lavorare **sotto cappa chimica**, in quanto la Cocktail (brevettata) contiene  $\beta$ -mercaptoetanololo.
- Il  $\beta$ -mercaptoetanololo può interferire con l'ELISA, diluire pertanto i campioni **almeno 1:500** (si raccomanda una diluizione 1:500 per campioni contenuti circa 10 mg/kg di glutine e una diluizione 1:2500 per campioni contenuti circa 50 mg/kg di glutine).

## 9.2. Estrazione con Cocktail (brevettata) (R7006/R7016, metodo ufficiale AOAC)

Omogeneizzare bene un quantitativo sufficiente (almeno 5 g o 5 ml) di campione (ridurre in polvere e miscelare accuratamente, oppure miscelare bene la soluzione)

- campioni alimentari liquidi**: pipettare 0.25 ml di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene
- altri campioni alimentari (ad esempio contenenti soia o quinoa)**: pesare 0.25 g di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene
- campioni alimentari contenenti tannini e polifenoli (ad esempio. cioccolato, caffè, cacao, farina di castagne, grano saraceno, miglio e spezie)**: pesare 0.25 g di campione omogeneizzato, aggiungere 0.25 g di latte scremato in polvere e aggiungere 2.5 ml di Cocktail (brevettata), chiudere la provetta e miscelare
- carne e insaccati**: in queste matrici la gliadina può non essere distribuita in modo uniforme, pesare pertanto 50 g di campione e omogeneizzarli. Pesare 0.25 g di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene
- campioni di avena**: la gliadina può non essere distribuita in modo uniforme, inoltre, questi campioni sono difficili da omogeneizzare. Pertanto omogeneizzare 200g di campione ed eseguire l'estrazione con almeno il quadruplo dei reagenti: pesare 1 g di campione omogeneizzato e aggiungere 10 ml di Cocktail (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene

### **Continuare quindi l'estrazione di tutti i campioni con la seguente procedura:**

- incubare per 40 min a 50 °C (122 °F)
- lasciare raffreddare il campione e poi miscelarlo con 7.5 ml di etanolo all'80% (vedi par. 5.2) (per campioni d'avena: 30 ml di etanolo all'80%)



- chiudere la provetta e agitare per inversione oppure mediante agitatore rotante per 1 ora a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F)
- centrifugare per 10 minuti ad almeno 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)
- trasferire il surnatante in un provetta con tappo a vite
- diluire il campione almeno 1:12.5 (1+11.5 / 80 µl+ 920 µl) con il diluente del campione diluito (vedi par. 10.1.): la diluizione finale è almeno 500
- utilizzare **immediatamente** 100 µl per pozzetto nell'analisi.

### **Osservazioni:**

Il surnatante ottenuto dopo la centrifugazione o il filtrato possono essere conservati in un flacone ben chiuso, al buio e a temperatura ambiente (20 – 25 ° C / 68 – 77 ° F) fino a otto settimane.

### 9.3. Estrazione con Cocktail ECO (più veloce ed ecologia)

La preparazione del campione è descritta nella metodica della Cocktail ECO (R7080). Con questo tipo di estrazione, più rapida ed ecologica, **non è necessario lavorare** sotto cappa chimica.

## **10. Esecuzione del test**

### 10.1. Indicazioni preliminari

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

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10X. Prima della diluizione sciogliere eventuali cristalli mediante riscaldamento a 37°C (99°F) in un bagnetto termostatico. Successivamente, diluire il tampone concentrato riscaldato 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

Seguire accuratamente la procedura di lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino tra i vari passaggi operativi.

Non utilizzare più di 3 strip (24 pozzetti) per ciascun test. Nel caso in cui servano più di tre strip, usare una seconda piastra non rivestita (es. a ridotto legame da Greiner bio-one Cat.-No. 655.101 o Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) come pre-piastra, per evitare un allungamento dei tempi di incubazione della piastra. Tutti gli standard e i campioni vengono pipettati nella piastra non rivestita (almeno 150 µl per pozzetto) e quindi velocemente trasferiti nella piastra rivestita con una pipetta a 8 canali.

Si consiglia di pipettare il coniugato, il substrato/cromogeno e la soluzione di stop con una pipetta multicanale o pipetta stepper per evitare un allungamento dei tempi di incubazione della 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 100 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
3. 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 soluzione di lavaggio (vedi par. 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte.
4. In ogni pozzetto pipettare 100 µl di coniugato diluito (vedi par. 10.1.) e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
5. 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 soluzione di lavaggio diluita (par. 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte.
6. In ogni pozzetto pipettare 100 µl di substrato/cromogeno. Agitare leggermente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Pipettare 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente agitando la piastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

## 11. Risultati

Per l'elaborazione dei test ELISA RIDASCREEN® è disponibile il software denominato RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996). Il calcolo deve essere fatto per mezzo di una funzione spline cubica. Il grafico della curva standard è riportato sul Certificato di Controllo di Qualità allegato ad ogni kit. Il "Compliance Criteria" è un documento, disponibile su richiesta, che fornisce i criteri di accettabilità della curva standard. Per il controllo qualità dovrebbero essere utilizzati degli appositi controlli.

In accordo al certificato, valori di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}}$ ) più elevati rispetto alla curva di calibrazione, soprattutto per lo standard zero, possono essere il risultato di un insufficiente lavaggio o di una contaminazione da glutine.

I campioni con valori di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}}$ ) maggiori dello standard 5 dovrebbero essere diluiti ulteriormente e analizzati nuovamente.

La concentrazione in ng/ml (ppb) di gliadina viene letta dalla curva di calibrazione del software RIDASOFT® Win.NET e moltiplicata ulteriormente almeno per il fattore di diluizione 500. Tale risultato va ulteriormente moltiplicato per 2 per ottenere la concentrazione di glutine (le gliadine rappresentano in generale il 50% delle proteine presenti nel glutine, Codex Definition). Il RIDASOFT® Win.NET (versione 1.93 o successive) indica i risultati in gliadina e glutine.

### **Esempio:**

Il valore di assorbanza di un campione riportato sulla curva di calibrazione corrisponde a 10 ng/ml di gliadina. Moltiplicando tale valore per il fattore di diluizione 500 si arriva a 5000 ng/ml, corrispondenti a 5 mg/kg (ppm) di gliadina, ovvero allo 0,0005% di gliadina. Per calcolare il contenuto di glutine, moltiplicare ulteriormente per il fattore 2: si ottengono 10 mg/kg di glutine, ovvero lo 0,001% di glutine. Questo campione si può pertanto considerare privo di glutine, perché la concentrazione di glutine è inferiore a 20 mg/kg.

### **In generale:**

I campioni risultati negativi potrebbero ancora contenere una contaminazione di allergene al di sotto del limite di rilevazione del test, o potrebbero contenere altri componenti allergenici come ad esempio amido.

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.

Per la valutazione della reattività crociata è stato analizzato solo un campione di esempio, altri campioni possono fornire un risultato diverso. Tutte le reattività crociate e matrici di esempio analizzate sono descritte nel rapporto di validazione.

Il contenuto proteico e la composizione proteica delle diverse varietà di grano, segale e orzo possono differire. Sono quindi previsti risultati variabili per le diverse varietà.

### **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 arricchimento per una accurata e corretta procedura
- Campioni fortemente acidi o basici devono essere neutralizzati prima dell'analisi
- Confermare i risultati con PCR (SureFood® PCR Allergen Gluten)
- Nella produzione di alimenti come birra o lievito naturale, le proteine sono frammentate. Nei test ELISA a sandwich, frammenti di proteine portano ad un recupero ridotto, tali campioni devono essere analizzati con un test ELISA competitivo come il RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021).
- Si sconsiglia di estrapolare i dati sotto al limite di quantificazione
- Per ulteriori informazioni riguardo l'utilizzo dell'automazione (Thunder Bolt® / Bolt, GEMINI) contattare [info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it)

### **Ulteriori note applicative:**

- Preparazione del campione per alimenti processati con la RIDA® Extraction Solution (incolore) (Art. R7098.) - Solo dopo validazione.
- Preparazione delle materie prime con etanolo.
- Preparazione di materie prime contenenti polifenoli (ad esempio cioccolato, caffè, cacao, grano saraceno) con gelatina di pesce ed etanolo.

**Per il rapporto di validazione contenete ulteriori informazioni e le note applicative contattare [info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it)**

I dati corrispondono al nostro attuale stato della tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti ed il loro utilizzo. 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 di questo prodotto.