



RIDASCREEN® Gliadin

REF R7001

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gliadinen und verwandten Proteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gliadins and corresponding proteins



Approved as AOAC Official Method of Analysis (OMA) Final
Action Status 2012.01

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C



Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale

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

R-Biopharm AG switchboard

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

Auftragsannahme

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

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department

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

E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb

E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales

E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaminen aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in Lebensmitteln.

Der R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin ist:

- Codex Alimentarius Methode (Typ I)
- anerkannt als AOAC-OMA Final Action (2012.01) ^[1]
- anerkannt als AACCI 38-50.01
- zertifiziert bei AOAC-RI (PTM Nr. 120601)
- anerkannt als ICC 182

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 benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren und extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung
 Cocktail (patented) (für 10 Proben).....ca. 2 h
 Testdurchführung (Inkubationszeit).....1,5 h

Standardmaterial: Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist der Standard der Prolamin Working Group (PWG-Gliadin, <http://www.wgpat.com/handling.html>)

Nachweisgrenze: 0,5 mg/kg Gliadin bzw. 1 mg/kg Gluten*
(Matrix-abhängig) 0,06 - 1,24 mg/kg Gliadin
 *Mittelwert

Bestimmungsgrenze: 2,5 mg/kg Gliadin bzw. 5 mg/kg Gluten

Spezifität: Der eingesetzte monoklonale Antikörper R5 erkennt die Gliadinfraktionen aus Weizen und verwandte Prolamine aus Roggen und Gerste. Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Doterversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. 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 für den Nachweis von Gliadin / Gluten

Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016)

Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)

RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098)

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

RIDASCREEN[®]FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)

RIDASCREEN[®]FAST Gliadin sensitive (Art. Nr. R7051)

RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (Art. Nr. R7021)

RIDASCREEN[®] Total Gluten (Art. Nr. R7041)

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

SureFood[®] Allergen 4plex Cereals (Art. Nr. S7006)

SureFood[®] Allergen Gluten (Art. Nr. S3606)

SureFood[®] QUANTARD Allergen 40 (Art. Nr. S3301)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN[®] Gliadin (Art. Nr. R7001) ist ein R5 Sandwich-Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Gliadin als Messgröße für Gluten in Lebensmitteln. Der Test basiert auf einem spezifischen monoklonalen Antikörper (R5) gegen Aminosäure-Sequenzen in Prolaminen, die für Zöliakie-Patienten toxisch sind.

Der Test eignet sich zur quantitativen Bestimmung von intaktem Gliadin als Messgröße für Gluten in unprozessierten und prozessierten Matrices aus wichtigen glutenfreien Lebensmittelkategorien, darunter Produkte auf Reis- und Maisbasis, Soja, Stärke, Pseudogetreide, Hülsenfrüchte, Gewürze, Säfte,

Nuss-Nougat-Creme, Frischkäse, Pesto, Fleisch, vegetarische Fleischalternativen, Kekse, Desserts, Kuchen, Fisch, Brot, Süßigkeiten und Kartoffeln. Der Sandwich-ELISA quantifiziert intaktes Gliadin aus Weizen und auch intakte verwandte Proteine aus Roggen und Gerste. Diese Methode ist nicht geeignet für die Quantifizierung von fermentiertem oder hydrolisiertem Gluten.

Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits auf diese Produkte zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15) zur Verfügung stellen.

Alle Proben sollten mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016, offizielle R5-Mendez Methode) aufgearbeitet werden.

Die schnellere Probenaufarbeitung mit dem umweltfreundlicheren Cocktail ECO (Art. Nr. R7080) eignet sich für das Screening von Proben. Gegenüber der Extraktion mit dem Cocktail (patented), erreicht der Cocktail ECO eine Extraktionseffizienz von etwa 70 - 110 %.

2. Allgemeines

Weizenmehl und Gluten werden häufig aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als Kleber- und Streckungsmittel bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Als Gluten bezeichnet man das Eiweißgemisch aus Prolaminen und Glutelinen, welches in Weizen, Roggen und Gerste vorkommt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führen kann. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius „Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten“ (CODEX STAN 118-1979) gibt es zwei "Stufen" für die Bezeichnung von Lebensmitteln hinsichtlich ihres Glutengehaltes:

- 1) "**Glutenfrei**" sind Lebensmittelprodukte, die den Grenzwert von 20 mg/kg Gluten einhalten.
- 2) Produkte, die mit "**sehr geringer Glutengehalt**" gekennzeichnet sind, dürfen mehr als 20 und höchstens 100 mg Gluten pro kg enthalten.

Der Grenzwert von 20 mg/kg Gluten wurde in viele nationale Gesetzgebungen übertragen. Der Prolamingehalt (z. B. Gliadin) von Gluten wird per Definition mit 50 % festgelegt (CODEX STAN 118-1979).

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen R5 Antikörpern gegen Gliadine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet in der Probe vorhandenes Gliadin an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplex führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidasegekoppelten R5 Antikörper-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Eine Substrat- und Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben und inkubiert. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das farblose 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 Gliadin-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als ng/ml Gliadin angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	Transparent	Konzentrat	5x	60 ml
Standard 1 Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 ng/ml	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	5,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	10,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	20,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	40,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	Transparent	Gebrauchsfertig	80,0 ng/ml	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Konzentrat	11x	1,2 ml
Substrate Substrat	Grün	Gebrauchsfertig		7 ml
Chromogen Chromogen	Blau	Gebrauchsfertig		7 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von $\pm 0,01$ g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. 50 ml Centrifuge Tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (50 °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 Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Gluten-freies Magermilchpulver (MMP) (Lebensmittelqualität)
- Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016)
- Ethanollösung (**80 %**): d.h. 120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml dest. Wasser gut mischen

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, sowie gegebenenfalls zusätzliche Mikrotiterplatte zum Vorpipettieren, siehe Kapitel 10.2) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Der Cocktail (patented) enthält β -Mercaptoethanol. Daher sollte unter dem Abzug gearbeitet werden und Hautkontakt vermieden werden (Handschuhe tragen).

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.

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.

Die farblose Chromogen-Lösung ist lichtempfindlich; deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung der Chromogen-Lösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Absorption kleiner 1,2 ($A_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 6

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 Gliadin-Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40 % Ethanol oder 2-Propanol reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA®QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005) auf Gliadinkontamination überprüfen.
- Bei Verwendung des Cocktail (patented) wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da er β -Mercaptoethanol enthält.
- β -Mercaptoethanol kann im ELISA stören, deshalb die Proben mindestens 1:500 verdünnen.
- Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

9.1 Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016, offizielle AOAC-Methode)

Homogenisierung (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen) einer ausreichenden Menge des Lebensmittels (z. B. 50 g bzw. 50 ml), um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probenmenge entnommen wird.

- **Flüssige Lebensmittel:** zu 0,25 ml der homogenisierten Probe 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Sonstige Lebensmittel (z. B. soja- und quinoahaltige Lebensmittel):** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel (z. B. Schokolade, Kaffee, Fruchtsäfte, Kakao, Kastanienmehl, Buchweizen, Hirse und Gewürzen):** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen, 0,25 g Magermilchpulver und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Fleisch- und Wurstwaren:** die Gliadinverteilung kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich sein, deshalb sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Menge homogenisiert wird: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Haferproben:** die Gliadinverteilung kann sehr ungleich sein, zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren. Deshalb mindestens 200 g Probe homogenisieren, die Probenaufarbeitung sollte dann mindestens mit dem vierfachen Ansatz durchgeführt werden: 1 g der homogenisierten Probe einwiegen und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.

Bitte alle Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad extrahieren.
- Probe kurz abkühlen lassen (1 - 3 min).
- Mit 7,5 ml 80 % Ethanol (siehe Kapitel 5.2) versetzen (bei Haferproben: 30 ml 80 % Ethanol), das Gefäß verschließen und gut mischen.
- Anschließend 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen.

- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zentrifugieren.
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren).
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Die Probenextrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) können bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln (Haltbarkeit ca. 8 Wochen) aufbewahrt werden.
- Die hergestellten Extrakte (Überstand des Zentrifugationsschrittes bzw. das Filtrat) müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit Puffer verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2). Die verdünnten Probenextrakte sind nur begrenzt haltbar und innerhalb von 30 Minuten im Test einzusetzen.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der **Puffer** liegt als 5fach Konzentrat vor. Das benötigte Aliquot am Tag der Testdurchführung 1:5 (1+4) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 12 ml dest. Wasser + 3 ml Konzentrat, ausreichend für die Verdünnung von 10 Proben). Der verdünnte Puffer ist 1 Tag haltbar. Es ist sicherzustellen, dass der Puffer nicht mit Gliadin verunreinigt wird.

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 2 ml dest. Wasser + 200 µl Konzentrat, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen). Es ist darauf zu achten, dass das Wasser nicht mit Gliadin kontaminiert ist.

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 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.

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

10.2 Testdurchführung

Die hergestellten Extrakte nach Kapitel 9.1 müssen vor dem Einsatz im Test 1:12,5 (1+11,5) mit verdünntem Puffer (siehe Kapitel 10.1) verdünnt werden (z. B. 920 µl Puffer + 80 µl Probe). Der finale Verdünnungsfaktor ist 500.

Die verdünnten Probenextrakte sofort (innerhalb von 30 Minuten) im Assay verwenden. Ein längerer Zeitraum kann die Wiederfindung beeinflussen.

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als sechs Mikrotiterstreifen (48 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als sechs Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (siehe Kapitel 5.1) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und hiervon dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

Es wird empfohlen das Konjugat, Substrat, Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der nach Kapitel 9.1 extrahierten und nach Kapitel 10.2 verdünnten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 30 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 zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 30 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
6. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell durch leichtes Schütteln der Platte mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des 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. Es wird empfohlen, die RIDASOFT® Win.NET und die Cubic spline Funktion zu verwenden.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat) entnommen 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 der AOAC Official Method of Analysis entspricht oder das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Die Gliadinkonzentration in ng/ml (ppb), die aus der RIDASOFT® Win.NET Standardkurve abgelesen wird, muss weiter mit dem Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung von mindestens 500 multipliziert werden. Dieses Ergebnis wird dann noch mit 2 multipliziert, um die Glutenkonzentration zu erhalten

(Gluten besteht zu 50 % aus Gliadin, Codex Definition). Bei der RIDASOFT® Win.NET (ab Version 1.93) werden die Ergebnisse in Gliadin und Gluten angezeigt.

Rechenbeispiel

Die Absorption einer Probe entspricht einer Konzentration von 10 ng/ml Gliadin in der Standardkurve. Multipliziert mit dem empfohlenen Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung 500 ergibt sich ein Wert von 5.000 ng/ml entsprechend 5 mg/kg (ppm) Gliadin bzw. 0,0005 % Gliadin. Um den Glutengehalt zu berechnen, muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden, dies ergibt 10 mg/kg Gluten (0,001 % Gluten). Die Probe ist deshalb als „glutenfrei“ zu bezeichnen, da die Konzentration unterhalb von 20 mg/kg liegt.

12. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Ermittelte Werte in diesem Bereich sind aufgrund der hohen Schwankungsbreite des Tests aber mit einer hohen Unsicherheit versehen. Ergebnisse sollten deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ „< LoQ“ angegeben werden.

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

Falls Proben eine höhere Absorption als Standard 6 zeigen, können die Proben stärker verdünnt und erneut im ELISA eingesetzt werden. Hierzu den Extrakt wie unter Kapitel 9.1 beschrieben nochmals frisch 1:12,5 mit Puffer verdünnen. Anschließend den so verdünnten Probenextrakt mit der folgenden Mischung weiter verdünnen:

- 2 % Cocktail (patented)
- 6 % einer 80%igen Ethanollösung
- 92 % Puffer

Dies entspricht z. B. 100 µl Cocktail (patented), 300 µl 80 % Ethanol und 4600 µl Puffer. Bei Verwendung dieser Mischung bleibt die Zusammensetzung des Probenmediums entsprechend der Extraktion nach Kapitel 9.1 erhalten.

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

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.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse bemerkbar macht. Hierdurch können besonders Proben, die an den charakteristischen Grenzen der Methode (LoD, LoQ, obere Grenze des Messbereichs) liegen, zwischen den Bereichen der Kalibrationskurve wechseln.

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ± 1 % gegeben.

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

Für den vorliegenden ELISA wurden aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln 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 / 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.

Durch die Zugabe von Fremdprotein (abhängig vom Test z. B. BSA, Gelatine, Magermilchpulver) während der Extraktion oder der Testdurchführung können Matrixeffekte gegebenenfalls unterdrückt werden.

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

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des 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 im Tests verwendeten 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.

Der Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung können in Weizen-, Roggen-, und Gerstensorten unterschiedlich sein, sodass für verschiedene Sorten abweichende Ergebnisse zu erwarten sind.

Das Hauptepitop des R5 Antikörpers ist die Aminosäuresequenz QQPFP, die Teil vieler Zöliakie-toxischer Sequenzen ist. Diese Sequenz kommt wiederholt in den Prolaminen von Weizen, Roggen und Gerste vor. Allerdings ist die Sequenz in Roggen und Gerste häufiger vorhanden als in Weizen, weshalb Roggen und Gerste gemessen am eingesetzten Weizenstandard überbestimmt werden.

Neuere Forschung hat gezeigt, dass der tatsächliche Umrechnungsfaktor von Prolaminen auf Gluten in Weizen etwa 1,5 beträgt ^{[2], [3], [4]}. Der offizielle Faktor zur Umrechnung ist jedoch weiterhin 2 (Codex Alimentarius).

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen, jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird 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.
- Zur Qualitätskontrolle und zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Gluten-freie und Gluten-haltige (natürlich oder künstlich kontaminierte) Proben zu verwenden. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben kann es notwendig sein, den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood®) durchzuführen.
- Bei der Herstellung von Lebensmitteln wie z. B. Bier und Sauerteig werden Proteine fragmentiert. Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für **fragmentierte Proteine** vermindert. Daher sollten diese Proben mit einem kompetitiven ELISA, wie dem **RIDASCREEN® Gliadin competitive** (Art. Nr. R7021), analysiert werden.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für prozessierte Lebensmittel mit der RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098) - nur nach Validierung.
- Probenaufarbeitung für Rohwaren mit Ethanol.
- Probenaufarbeitung für polyphenolhaltige Rohwaren (z. B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Buchweizen) mit Fischgelatine und Ethanol.
- RIDASCREEN[®]FAST Allergen - Swabbing Methode für die qualitative Analyse von Allergenen in der Produktionslinie oder für Laborgeräte.

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

Literatur









- [¹] Lacorn et al. (2021) Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 sandwich ELISA RIDASCREEN[®] Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01, J. AOAC Int (publication in progress).
- [²] Schall, E., Scherf, K.A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R.E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020) Food Chem. 313, 126049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [³] Wieser et al.: Celiac Disease and Gluten. (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, Seite 107.
- [⁴] Wieser, H. & Koehler, P. (2009) Eur. Food Res. Technol. 229, 9-13.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2015-10-09	Freigabeversion
2021-10-11	Aktuelle Version Vorgenommene Änderung: <ul style="list-style-type: none"> – Generelle sprachliche Überarbeitung – Anpassungen in Kapitel 1. Verwendungszweck gemäß Scope-Erweiterung laut AOAC-OMA – Webseiten Link für (Kauf-)Informationen über PWG-Standardmaterial in Kapitel Kurzinformationen hinzugefügt – Änderung der Entsorgungsklausel im Kapitel 6. – Ausarbeitung der Kapitel 11., 12., 13. und 14. – Ergänzung im Kapitel 11. Auswertung (verschoben aus Kapitel 14.)
2024-06-03	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"> – Generelle Überarbeitung – Ergänzung der weiteren Produkte für den Nachweis von Gliadin/ Gluten – Ergänzung um Patenthinweis der Firma MORINAGA & Co., Ltd. – Erklärende Ergänzung in Kapitel 14 (Hinweis Doppelbestimmung)

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

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

Patent-Hinweis:

Im Falle der Verwendung des R-Biopharm Produktes „Cocktail ECO“ für die Aufarbeitung von Lebensmittelproben kommt ein sulfithaltiges Extraktionsmittel zum Einsatz. 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

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® Gliadin

Brief information

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of prolamins from wheat (gliadin), rye (secalin) and barley (hordein) in food.

The R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin is:

- Codex Alimentarius Method (Type I)
- approved as AOAC-OMA Final Action (2012.01) ^[1]
- approved as AACCI 38-50.01
- certified at AOAC-RI (PTM No. 120601)
- approved as ICC 182

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

Sample preparation: homogenization and extraction

Time requirement: sample preparation
Cocktail (patented) (for 10 samples).....approx. 2 h
test implementation (incubation time).....1.5 h

Standard material: The RIDASCREEN® standard material is the standard of the Prolamin Working Group (PWG-Gliadin, <http://www.wgpat.com/handling.html>)

Limit of detection: 0.5 mg/kg (ppm) gliadin or to 1 mg/kg (ppm) gluten*
(matrix-dependent) 0.06 - 1.24 mg/kg (ppm) gliadin
*mean value

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) gliadin or to 5 mg/kg (ppm) gluten

Specificity: The monoclonal antibody R5 reacts with the gliadin-fractions from wheat and corresponding prolamins from rye and barley.

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. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments (see chapter 13).

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

Related products for gliadin determination

Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)

Cocktail ECO (Art. No. R7080)

RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)

RIDA[®]QUICK Gliadin (Art. No. R7003 / R7004 / R7005)

RIDASCREEEN[®]FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDASCREEEN[®]FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051)

RIDASCREEEN[®] Gliadin competitive (Art. No. R7021)

RIDASCREEEN[®] Total Gluten (Art. No. R7041)

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

SureFood[®] Allergen 4plex Cereals (Art. No. S7006)

SureFood[®] Allergen Gluten (Art. No. S3606)

SureFood[®] QUANTARD Allergen 40 (Art. No. S3301)

1. Intended use

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001) is a R5 sandwich enzyme immunoassay based on specific monoclonal antibody to celiac toxic amino acid prolamin sequences to determine gliadin as a measure of gluten in food.

It is applicable for the quantitative measurement of intact gliadin as a measure of gluten in unprocessed and processed matrices from important gluten-free food categories, including rice- and corn-based products, soy, starches, pseudo cereals, legumes, spices, juice, nut nougat crème, cream cheese, pesto, meat, vegetarian meat alternative, cookies, dessert, cake, fish, bread, candies, and potatoes. The sandwich ELISA quantifies intact gliadin from wheat and also intact related proteins from rye and barley. This method is not accurate for quantification of fermented or hydrolyzed gluten. It can be assumed that the assay is also suitable for the analysis of other foods, however, this must be verified by the user before applying the test kit to that foods.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we make available in our application notes (see chapter 15).

All samples should be extracted with the Cocktail (patented) (Art. No. R7006/R7016, official R5-Mendez method).

The faster sample preparation using the environmental-friendlier Cocktail ECO (Art. No. R7080) is convenient for the screening of samples. The Cocktail ECO has an extraction efficiency of approx. 70 - 110 % compared to Cocktail (patented).

2. General

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common because of their heat stability and useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavour. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley.

Coeliac disease is a permanent intolerance to gluten that results in damage to the small intestine and is reversible when gluten is avoided by diet.

According to the Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979) two categories for labeling of food according to the gluten content now exist:

- 1) Food products which contain less than 20 mg/kg can be labeled as **"gluten-free"**.
- 2) Food products labeled as **"very low gluten"** can have a gluten content above 20 and up to 100 mg/kg.

The threshold of 20 mg/kg has been adopted by many national legislations in many countries. The prolamin content (e.g. gliadin) of gluten is per definition generally assumed to be 50 % (CODEX STAN 118-1979).

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific R5 antibodies against gliadins. By adding the standard or sample solution to the wells, gliadin present in the solutions will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Following the washing step, a solution containing R5 antibodies conjugated to peroxidase is added. This conjugate binds 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 and a chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution, which is proportional to the gliadin concentration in the sample, is measured photometrically at 450 nm and expressed as ng/mL (ppb) gliadin.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Buffer	Transparent	Concentrate	5x	60 mL
Standard 1	transparent	Ready to use	0 ng/mL	1.3 mL
Standard 2	Transparent	Ready to use	5.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 3	Transparent	Ready to use	10.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 4	Transparent	Ready to use	20.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 5	Transparent	Ready to use	40.0 ng/mL	1.3 mL
Standard 6	Transparent	Ready to use	80.0 ng/mL	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 mL
Conjugate	Red	Concentrate	11x	1.2 mL
Substrate	Green	Ready to use		7 mL
Chromogen	Blue	Ready to use		7 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x g) + centrifugal vials (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (50 °C / 122 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 μ m)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 μ L and 200 - 1000 μ 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 μ L
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

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

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Gluten-free skim milk powder (SMP) (food quality)
- Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)
- Ethanol solution (**80 %**): e.g. add 120 mL ethanol p.a. to 30 mL dist. water and shake well

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the plate (coated plate and pre-plate, if necessary (see chapter 10.2)). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

The Cocktail (patented) is harmful to health. It contains mercaptoethanol. It should be worked **under a chemical hood** and skin contact should be avoided (use gloves).

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.

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 colorless chromogen is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

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

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the chromogen solution prior to test implementation
- Value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 6

9. Sample preparation

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne allergens and dirty laboratory equipment lead to contamination of the assay. Therefore, please notice the following recommendations:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment with 40 % ethanol or 2-propanol.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.
- Check for gliadin contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA®QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005).
- When using the Cocktail (patented), it is recommended to work under a chemical hood, because it contains β -mercaptoethanol.
- β -Mercaptoethanol can disturb the ELISA, therefore dilute the samples at least 1:500.
- The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1 Extraction with the Cocktail (patented) (R7006 / R7016, official AOAC method)

Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) well a sufficient amount (e.g. 50 g or 50 mL) to ensure taking a representative test portion of sample.

- **Liquid food samples:** use 0.25 mL of the homogenized sample and add 2.5 mL of the Cocktail (patented), close the vial and mix well.

- **Other food samples (e.g. soy and quinoa containing samples):** weigh 0.25 g of the homogenized sample and add 2.5 mL of the Cocktail (patented), close the vial and mix well.
- **Tannin and polyphenol containing food samples (e.g. chocolate, coffee, fruit juices, cocoa, chestnut flour, buckwheat, millet, and spices):** weigh 0.25 g of the homogenized sample, add 0.25 g of skim milk powder, and add 2.5 mL of the Cocktail (patented), close the vial and mix well.
- **Meat and sausages:** in these matrices gliadin may be not distributed evenly, therefore, make sure to homogenize a sufficiently large amount of sample: weigh 0.25 g of the homogenized sample and add 2.5 mL of the Cocktail (patented), close the vial and mix well.
- **Oat samples:** gliadin may not be distributed evenly, furthermore the samples are difficult to homogenize. Therefore, homogenize at least 200 g, then carry out the extraction with at least the fourfold amount of reagents: weigh 1 g of the homogenized sample and add 10 mL of the Cocktail (patented), close the vial and mix well.

Please further extract all samples as described in the following:

- Extract for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath.
- Let the sample cool down shortly (1 - 3 min).
- Add 7.5 mL 80 % ethanol (see chapter 5.2) (for oat samples: 30 mL 80 % ethanol), close the vial and mix well.
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 x g at room temperature (20 - 25 °C) / 68 - 77 °F).
(Alternatively: transfer 2 mL of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x g) for 10 min in a microcentrifuge).
- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark (shelf life 8 weeks) until used in the test.

- For use in the test, the extracts (supernatant of centrifugation step or filtrate) must be diluted with buffer (for dilution see chapter 10.2). The diluted sample extracts have a limited shelf life and must be used in the test within 30 minutes.

10. Test implementation

10.1 Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The **buffer** is provided as a 5fold concentrate. Only the amount which actually is needed should be diluted 1:5 (1 + 4) with dist. water (e.g. 12 mL dist. water + 3 mL concentrate, sufficient for the dilution of 10 samples). The diluted buffer is stable for 1 day. Make sure that the buffer is not contaminated with gliadin.

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate (11fold). Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) with distilled water (e.g. 2 mL distilled water + 200 µL concentrate, sufficient for 2 microtiter strips).

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (e.g. 900 mL dist. water + 100 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 four weeks.

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

10.2 Test procedure

The extracts prepared according to chapter 9.1 must be diluted 1:12.5 (1+11.5) with diluted buffer (see chapter 10.1) before usage (e.g. 920 µL buffer + 80 µL sample). The final dilution factor is 500.

Use the diluted sample extracts immediately (within 30 minutes) in the assay. A longer time period may influence the recovery.

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

Do not use more than six strips (48 wells) at a time. If more than six 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. 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, substrate, chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Pipette 100 μL of each standard or sample (prepared according to chapter 9.1 and diluted according to chapter 10.2) in duplicate to the wells and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 μL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
4. Pipette 100 μL of the diluted conjugate (see chapter 10.1) to each well and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) 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 two more times (a total of three wash cycles).
6. Pipette 50 μL of substrate and 50 μL of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ / 68 - 77 $^{\circ}\text{F}$) in the dark.
7. Pipette 100 μL of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. It is recommended to use RIDASOFT® Win.NET and cubic spline curve fitting procedure.

For the evaluation it should be clarified, that the quality criteria are fulfilled for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the attached analysis certificate.

The assay can be also 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 the AOAC Official Method of Analysis and standards like EN 15633-1 and EN 15842. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

The gliadin concentration in ng/mL (ppb) is read from the **RIDASOFT® Win.NET** calibration curve and must be further multiplied by the dilution factor from the sample preparation of at least 500. This result is then multiplied by 2 in order to obtain the gluten concentration (gliadin represents 50 % of the proteins present in gluten, Codex Definition). The **RIDASOFT® Win.NET** (version 1.93 or newer) indicates the results in gliadin and gluten.

Calculation example

The extinction value of a sample corresponds to 10 ng/mL gliadin in the calibration curve. Multiplying by the recommended dilution factor 500 from the sample preparation leads to 5000 ng/mL, corresponding to 5 mg/kg (ppm) gliadin, respectively 0.0005 % gliadin. To calculate the gluten content, it is necessary to multiply by factor 2 which results in 10 mg/kg gluten, respectively 0.001 % gluten. This sample is considered to be gluten-free, because the gluten concentration is below 20 mg/kg.

12. Interpretation of results

Results between LoD and LoQ indicate a low analyte concentration in the sample. Calculated results show a high uncertainty in this area due to the

method's high variation below LoQ. Therefore, such results should not be reported with a quantitative value, but qualitative as "< LoQ".

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

If samples show a higher absorbance than standard 6, the samples can be further diluted and used again in the ELISA. For this purpose, dilute the extract again freshly 1:12.5 with buffer as described in chapter 9.1. Then further dilute the sample extract diluted in this way with the following mixture:

- 2 % Cocktail (patented)
- 6 % of an 80 % ethanol solution
- 92 % buffer

This corresponds e.g. to 100 µL Cocktail (patented), 300 µL 80 % ethanol and 4600 µL buffer. When using this mixture, the composition of the sample medium is maintained according to the extraction in chapter 9.1.

A further dilution and new detection of samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the allergen concentration.

Compared to the certificate, higher absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

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.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range resulting in higher variation. This may cause a switch of results between the different areas of the calibration curve especially at the test characteristic boundaries (LoD, LoQ, upper limit of measurement range).

An incorrect weight of the sample to be analyzed will have a 1:1 effect on the measurement result (e.g. a 10 % higher concentration is measured with a

weigh in of +10 %). A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max ± 1 %.

For detailed results and further information for 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.

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 / increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments.

The addition of foreign protein (depending on the test e.g. BSA, gelatine, skim milk powder) during extraction or test procedure may suppress matrix effects.

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

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 the actual analyte. Therefore, cross reactivities may also appear after food processing in single case or are lost.

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.

The protein content and protein composition of wheat, rye and barley cultivars may differ. Varying results are thus to be expected for different cultivars.

The main epitope of the R5 antibody is the amino acid sequence QQFPF which is part of many celiac-toxic sequences. The sequence occurs repeatedly in the prolamins from wheat, rye and barley. However, rye and barley contain a higher number of replicates of this sequence, which leads to an overestimation of rye and barley compared to the wheat standard.

Recent research has shown that the real conversion factor from gliadin to gluten is approx. 1.5 [2], [3], [4]. However, the official conversion factor (Codex Alimentarius) is still 2.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend to analyze each sample material in duplicates. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in standards like EN 15633-1 and EN 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 to ensure an accurate and correct test procedure. Gluten-free and gluten-containing (naturally contaminated or spiked) samples should be used. An example of a spike experiment is given in the validation report.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjustment of the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction may be necessary.
- To perform a PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- During the production of foods such as beer or sourdough, proteins are fragmented. In sandwich ELISAs, **protein fragments** lead to a reduced recovery. Such samples should be analyzed with a competitive ELISA like the **RIDASCREEN® Gliadin competitive** (Art. No. R7021).
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- Sample preparation for processed food with the RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098) - only after validation.
- Sample preparation for raw materials with ethanol.
- Sample preparation for polyphenol containing raw materials (e.g. chocolate, coffee, cacao, buckwheat) with fish gelatine and ethanol.
- RIDASCREEN®FAST Allergen - Swabbing method for the qualitative analysis of allergens in the production line or for laboratory equipment.

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

Literature









- [1] Lacorn et al. (2021) Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01, J. AOAC Int (publication in progress).
- [2] Schall, E., Scherf, K.A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R.E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020) Food Chem. 313, 126049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [3] Wieser et al.: Celiac Disease and Gluten. (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, page 107.
- [4] Wieser, H. & Koehler, P. (2009) Eur. Food Res. Technol. 229, 9-13.

Version overview

Version number	Chapter and title
2020-03-30	Release version
2021-10-11	Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General linguistic revision– Application in chapter 1. Intended Use according to AOAC-OMAs scope extension– Added website link to achieve (purchase) information of PWG standard material in chapter brief information– Modification of disposal clause in chapter 6– Revision of chapter 11, 12, 13 and 14– Addition in chapter 11. Evaluation (moved from chapter 14)
2024-06-03	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General revision– Addition of related products for gluten/ gliadin determination– Addition of marking concerning patents of MORINAGA & Co., Ltd.– Explanatory addition in chapter 14 (recommendation of analysis in duplicate)

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:

If the R-Biopharm product "Cocktail ECO" is used for the processing of food samples, a sulphite-containing extraction agent is used. 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

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321