



RIDA® QUICK Gliadin

REF R7003

Immunchromatographischer Test zur qualitativen Bestimmung von Gluten auf Oberflächen, in Reinigungs-/Prozesswasser und in Lebensmitteln

Immuno-chromatographic test for the qualitative determination of gluten on surfaces, in cleansing/process water and in food

Geprüft als / approved as

AOAC *Official Methods*SM (2015.16)
for processed/non-processed corn products

AOAC *Performance Tested Methods*SM (101702)
for surfaces and cleansing waters



In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)



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

RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003) ist ein immunchromatographischer Test zur qualitativen Bestimmung von Gluten-Kontaminationen auf Oberflächen, in Reinigungs-/Prozesswasser (CIP-Wasser) und in Lebensmitteln.

Der Test ist AOAC Proficiency Tested Method (PTM 101702) für Oberflächen und Reinigungs-/Prozesswasser^[1] und Official Method of Analysis (OMA 2015.16) der AOAC für auf Mais basierende Lebensmittel nach Ethanol- bzw. Cocktail (patented)-Extraktion^[2].

Das Testkit enthält 25 Teststreifen für jeweils eine Bestimmung. Für die Durchführung des Wischtests sind alle Reagenzien im Testkit enthalten. Die Auswertung erfolgt visuell.

Zeitbedarf:	Probennahme Wischtest	ca. 1 min
	Probenvorbereitung für:	
	10 CIP-Wasser-Proben*	ca. 5 min
	10 Rohwaren.....	ca. 15 min
	10 prozessierte Lebensmittel (R7006)....	ca. 120 min
	10 prozessierte Lebensmittel (R7080).....	ca. 35 min
	Testdurchführung (Inkubationszeit)	5 min

*CIP = Clean-In-Place (Spülwasser aus Reinigungsprozess)

Nachweisgrenze:	Oberflächen.....	ca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
	Rohwaren	ca. 4,4 mg/kg Gluten*
	Prozessierte Lebensmittel	ca. 6,3 mg/kg Gluten**
	CIP-Wasser (ohne Reiniger)	ca. 10 ng/ml Gluten
	CIP-Wasser (mit Reiniger).ca.	50 - 100 ng/ml Gluten

*mit ethanolischer Extraktion **mit Cocktail (patented) Extraktion

In Abhängigkeit von der untersuchten Matrix und der gewählten Extraktionsmethode können Abweichungen von den hier genannten Werten auftreten.

Spezifität:	Der eingesetzte monoklonale Antikörper R5 erkennt die Gliadinfraktionen aus Weizen und verwandte Prolamine aus Roggen und Gerste.
-------------	--

Die Kreuzreaktivitäten der in diesem Test 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 Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 11. Grenzen der Methode).

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Gliadin/Gluten

RIDA®QUICK Gliadin (single packaged) (Art. Nr. R7004)

RIDA®QUICK Gliadin (ready to swab) (Art. Nr. R7005)

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021)

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. Nr. R7041)

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

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

Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)

RIDA® Extraction solution (colorless) (Art. Nr. R7098)

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

SureFood® Allergen Gluten (Art. Nr. S3606)

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

1. Verwendungszweck

RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003) ist ein immunchromatographischer Test im Teststreifenformat zur qualitativen Bestimmung von Gluten

- auf Oberflächen (Wischtest zur Hygienekontrolle in Produktion und Labor),
- in Reinigungs-/Prozesswasser (CIP-Wasser),
- in Lebensmitteln nach einer Extraktion mit Ethanol, Cocktail (patented) oder Cocktail ECO.

Der Test wurde zum Nachweis geringer Glutenkonzentrationen entwickelt und erkennt Kontaminationen auch unterhalb 10 mg/kg Gluten. Die Sensitivität des Nachweises hängt von der untersuchten Matrix und der Extraktionsmethode ab.

Im Rahmen der AOAC-RI Validierung des Tests für die Untersuchung von Oberflächen und Reinigungs-/Prozesswasser^[1] wurden rostfreier Stahl, Keramikfliesen, Plastik und Silikon bzw. Wasser ohne und mit kommerziellen Reinigungslösungen getestet.

Die Extraktion von maisbasierten Rohwaren mit Ethanol und von hitze-prozessierten, maisbasierten Lebensmitteln mit dem Cocktail (patented) sind Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis^[2].

Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits für das jeweilige Lebensmittel 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 13. Weitere Applikationen) zur Verfügung stellen.

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 führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Die Codex Alimentarius Kommission hat den Grenzwert für glutenfreie Lebensmittel auf 20 mg/kg Gluten festgesetzt^[3]. Dieser Grenzwert wurde auch von vielen nationalen Gesetzgebungen übernommen. Der Prolamingehalt von Gluten (z. B. Gliadin in Weizen) wird darin auf 50 % festgelegt.

Die offizielle Typ I-Methode zur Glutenbestimmung des Codex Alimentarius^[4] ist ein ELISA unter Verwendung des R5-Antikörpers in Kombination mit einem speziellen Extraktionsmedium, dem Cocktail (patented) (Mendéz Methode)^[5]. Der RIDASCREEN® Gliadin ELISA (Art. Nr. R7001) erfüllt diese Anforderung und zeigte 2020 in einer weiteren internationalen Vergleichsstudie die umfassende Eignung zur Untersuchung von Lebensmitteln unterschiedlichster Produktgruppen und Prozessierungsgrade^[6, 7].

Der RIDA®QUICK Gliadin Teststreifen basiert auf dem gleichen R5-Antikörper und zeigt daher eine gute Übereinstimmung mit der offiziellen Methode, dem R5-ELISA RIDASCREEN® Gliadin. R-Biopharm AG ist die einzige Firma, die den R5-Antikörper in immunchromatografischen Tests verwenden darf.

3. Testprinzip

Das Prinzip des Tests im Streifenformat ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion und basiert auf dem monoklonalen R5-Antikörper, der die Gliadinfraktion aus Weizen sowie Prolamine aus Roggen und Gerste erkennt. Der Streifen enthält im unteren Bereich rote Latexpartikel-R5-Antikörper-Konjugate (Latex-Konjugate). Die Testbande enthält immobilisierten R5-Antikörper. Der Streifen wird senkrecht in einen Laufpuffer gestellt, der die aufgearbeitete Probe enthält. Nach dem Prinzip der Chromatographie läuft die Flüssigkeit (Laufpuffer und Probe) im Streifen nach oben. Die Latex-Konjugate werden durch die Flüssigkeit gelöst und passieren mit dieser die Testbande. Bei Anwesenheit des Analyten bildet sich ein Sandwich aus immobilisiertem R5-Antikörper, Gliadinen/Prolaminen und Latex-Konjugat, der die Testbande rot erscheinen lässt. Die Auswertung erfolgt visuell.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 25 Bestimmungen durchgeführt werden. Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Test strip Teststreifen		Gebrauchsfertig	25 Stück
Test tube Reaktionsröhrchen		Gebrauchsfertig	30 Stück
Disposable pipet Einmalpipetten			25 Stück
Buffer Puffer	Transparent	Gebrauchsfertig	60 ml
Evaluation card Auswertekarte			1 Stück

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x g) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. 50 ml Zentrifugenröhrchen von Greiner Art. Nr. 227261)
- Optional: Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 µm)
- Schüttler
- Wasserbad (50 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Messpipetten
- Messzylinder

5.2 Reagenzien

Für die Analyse von Rohwaren und prozessierten Lebensmitteln werden unterschiedliche Reagenzien empfohlen (siehe Kapitel 9.5).

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Magermilchpulver (MMP, Lebensmittelqualität) für soja-, tannin- oder polyphenolhaltige Lebensmittel
- 60 %ige Ethanollösung (150 ml Ethanol p.a. mit 100 ml dest. Wasser mischen)
- 80 %ige Ethanollösung (120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml dest. Wasser mischen)
- Cocktail (patented) (R7006 / R7016)
- Alternativ: Cocktail ECO (R7080)

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.

Der Cocktail (patented) enthält 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

Den Test bei 2 - 8 °C lagern. Die Teststreifen und Komponenten des Testkits nicht einfrieren.

Sobald der Behälter mit den Teststreifen einmal geöffnet wurde, diesen gut verschlossen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) lagern.

Die Teststreifen sind feuchtigkeitsempfindlich und müssen unbedingt vor Feuchtigkeit geschützt werden. Feuchte Teststreifen können das Ergebnis negativ beeinflussen. Deshalb die Teststreifen erst unmittelbar vor dem Einsatz im Test und nach Erreichen der Raumtemperatur aus der Teststreifenverpackung nehmen.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Fehlen der Kontrollbande oder unvollständige Test- bzw. Kontrollbande.
- Trüber oder flockiger Puffer.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeine Hinweise

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.

- Bei der Analyse sollte die Extraktion und die Testdurchführung in getrennten Räumen durchgeführt werden.
- Bei Verwendung des Cocktail (patented) wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da er β -Mercaptoethanol enthält.

9.2 Wischtest von Oberflächen

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 500 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- Mit dem unteren Ende (Applikationsfeld; siehe auch Kapitel 10. Abb. 2) eines trockenen Teststreifens eine Fläche von 10 x 10 cm mit einer Kreuzschraffur-Technik in allen Richtungen (siehe Abb. 1) gründlich abwischen.

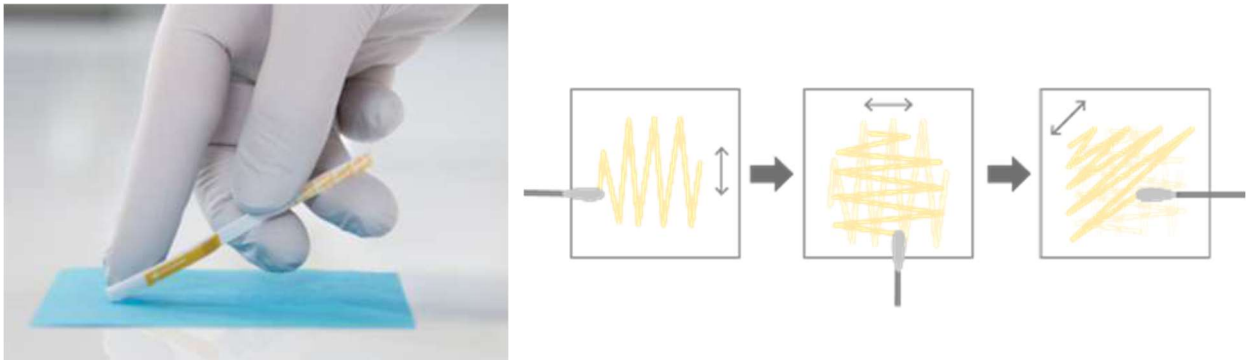


Abb. 1: Direkte Probennahme von Oberflächen mit RIDA®QUICK Gliadin.

- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (\pm 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.3 Analyse von CIP-Wasser ohne Reinigungsmittel

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 250 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- 250 μ l des Spülwassers in das Reaktionsröhrchen geben (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette) und vorsichtig mischen.
- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).

- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (± 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.4 Analyse von CIP-Wasser mit Reinigungsmitteln

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 500 μ l des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit einer mitgelieferten Einmalpipette).
- 50 μ l des Spülwassers (entspricht 3 Tropfen aus der mitgelieferten, senkrecht gehaltenen Einmalpipette) in das Reaktionsröhrchen pipettieren und vorsichtig mischen.
- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (± 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

9.5 Extraktion von Lebensmitteln

Im Rahmen der AOAC OMA 2015.16 Validierung^[2] wurden nicht-prozessierte Maisproben mit einer 60 % Ethanol-Extraktion und prozessierte Maisproben mit der Cocktail (patented)-Extraktion validiert.

In Abhängigkeit von der Extraktionsmethode ist bei einigen Inhaltsstoffen die Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Magermilchpulver (MMP) nötig, um unerwünschte Störreaktionen zu vermeiden.

Inhaltsstoffe in Lebensmitteln	Ethanol Extraktion	Cocktail (patented) / Cocktail ECO Extraktion
Soja	1 g Magermilchpulver	–
Tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel (z. B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Buchweizen, Hirse, Gewürze)	1 g Magermilchpulver	0,25 g Magermilchpulver

9.5.1 Extraktion mit Ethanol – *empfohlen für Rohware*

Eine ausreichend große Menge der Probe gut homogenisieren (mind. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. 50 ml einer flüssigen Probe gut mischen).

- **Flüssige Proben:** 1 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei soja-, tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 1 g MMP zugeben) und 9 ml 60 % Ethanol hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Weiche und feste Lebensmittel:** 1 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei soja-, tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 1 g MMP zugeben) und 10 ml 60 % Ethanol hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- Mind. 30 s gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Zentrifugieren: 10 min / mind. 2.500 x g / Raumtemperatur (20 - 25 °C).
- Alternativ: Probe absetzen lassen und / oder filtrieren.

Zusätzlich zu Rohwaren kann die Ethanolextraktion prinzipiell für eine schnelle Analyse auch bei anderen Proben angewendet werden. **Dieses Vorgehen ist jedoch nicht Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis.** Es ist zu beachten, dass die Effektivität der Extraktion mit Ethanol besonders bei hitzeprozessierten Proben reduziert sein kann^[5]. Die Eignung der Ethanolextraktion für das jeweilige Probenmaterial ist daher vom Anwender zu verifizieren. Für eine bessere Extraktion von Gluten aus hitzeprozessierten Proben wurde von der Arbeitsgruppe von Enrique Mendéz der Cocktail (patented) entwickelt^[8], der grundsätzlich für alle Arten von Lebensmitteln verwendet werden kann. Als schnellere und umweltfreundlichere Alternative wurde von R-Biopharm zudem der Cocktail ECO entwickelt, der eine vergleichbare Effektivität der Extraktion aufweist.

9.5.2 Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016) – *empfohlen für hitze-prozessierte Lebensmittel und bei unbekannter Verarbeitung*

Eine ausreichend große Menge der Probe gut homogenisieren (mind. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. 50 ml einer flüssigen Probe gut mischen).

- **Flüssige Lebensmittel:** 0,25 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.

- **Weiche und feste Lebensmittel:** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Fleisch- und Wurstwaren:** Gluten kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich verteilt sein. Deshalb sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Probe homogenisiert wird: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Haferproben:** Gluten kann in Hafer sehr ungleich verteilt sein und die Proben sind schwer zu homogenisieren; deshalb 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 Cocktail (patented) Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren.
- 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 unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 4 Wochen).

9.5.3 Extraktion mit Cocktail ECO (R7080) – *empfohlen für hitze- prozessierte Lebensmittel und bei unbekannter Verarbeitung*

Für eine schnellere Probenaufarbeitung kann als Alternative auch der umweltfreundlichere Cocktail ECO verwendet werden. Dieses Vorgehen ist nicht Bestandteil der AOAC Official Method of Analysis. Gegenüber der Extraktion mit Cocktail (patented) erreicht der Cocktail ECO eine Extraktionseffizienz von etwa 70 - 110 %.

Eine ausreichend große Menge der Probe gut homogenisieren (mind. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. 50 ml einer flüssigen Probe gut mischen). Die notwendige Menge an gebrauchsfertigem Cocktail ECO ist gemäß der Produktinformation herzustellen.

- **Flüssige Lebensmittel:** 0,25 ml der homogenisierten Probe in ein Gefäß geben (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Weiche und feste Lebensmittel:** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Fleisch- und Wurstwaren:** Gluten kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich verteilt sein. Deshalb sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Probe homogenisiert wird: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen (bei tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln 0,25 g MMP zugeben) und 2,5 ml Cocktail ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Haferproben:** Gluten kann in Hafer sehr ungleich verteilt sein und die Proben sind schwer zu homogenisieren; deshalb 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 ECO hinzugeben; Gefäß verschließen und gut mischen.

Bitte alle Cocktail ECO Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubieren.
- 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 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen.
- Probe filtrieren oder für 5 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 5 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 unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln aufbewahrt werden (Haltbarkeit ca. 2 Wochen).

9.6 Testdurchführung für die Analyse von Lebensmitteln

- So viele Reaktionsröhrchen aufstellen, wie Proben zu analysieren sind.
- 500 µl des Puffers in die Reaktionsröhrchen vorlegen (z. B. mit den mitgelieferten Einmalpipetten).
- 50 µl des nach Kapitel 9.5.1 - 9.5.3 hergestellten Probenextraktes (entspricht 3 Tropfen aus der mitgelieferten, senkrecht gehaltenen Einmalpipette) in das Reaktionsröhrchen pipettieren und vorsichtig mischen.
- Den Teststreifen mit dem Pfeil nach unten in das Reaktionsröhrchen geben und darauf achten, dass der Streifen nur mit dem Applikationsfeld in der Flüssigkeit eintaucht (Pfeilmarkierung auf dem Streifen).
- Den Teststreifen nach genau 5 Minuten (\pm 10 s) entnehmen und das Ergebnis mit Hilfe der Auswertekarte ablesen.

10. Auswertung

Die rechte Bande im Ergebnisfeld ist die rote Testbande (siehe Abb. 2). Die Probe enthält Gluten, wenn die Testbande sichtbar ist.

Die linke Bande im Ergebnisfeld ist die blaue Kontrollbande (siehe Abb. 2). Sie muss nach jedem Testlauf sichtbar sein.

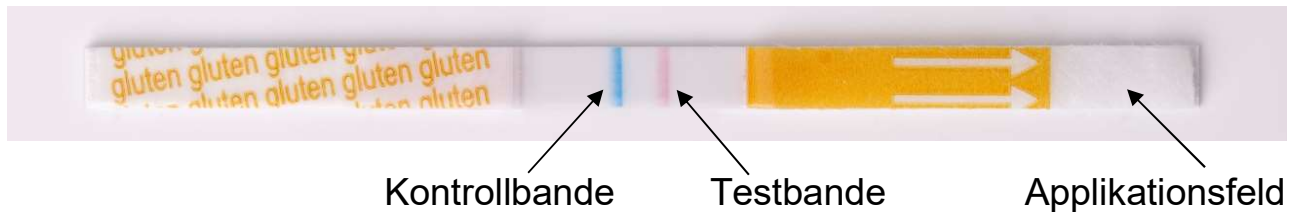


Abb. 2: RIDA®QUICK Gliadin Teststreifen.

Positives Ergebnis: zwei vollständige, farbige Banden

Die Probe ist positiv, wenn im Ergebnisfeld zwei vollständige, farbige Banden (die blaue Kontrollbande und die rote Testbande) vollständig sichtbar sind. Bei Wischtests können vollständige Banden ungleichmäßiger Intensität auftreten. Dies wird durch eine inhomogene Glutenverteilung auf der Oberfläche oder aufgrund unterschiedlicher Wischprozeduren verursacht. Im Allgemeinen gilt: je höher die Konzentration des Analyten ist, umso stärker ist die rote Farbe der Testbande.

Wischttest:	> ca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
Rohware:	> ca. 4,4 mg/kg Gluten*
Prozessierte Lebensmittel:	> ca. 6,3 mg/kg Gluten**
CIP-Wasser (ohne Reiniger):	> ca. 10 ng/ml Gluten
CIP-Wasser (mit Reiniger):	> ca. 50 - 100 ng/ml Gluten

*ethanolische Extraktion

**Cocktail (patented) Extraktion

Negatives Ergebnis: nur eine vollständige, blaue Bande

Die Probe ist negativ, wenn im Ergebnisfeld nur die blaue Kontrollbande vollständig sichtbar ist.

Wischttest:	< ca. 1,6 - 3 µg Gluten/100 cm ²
Rohware:	< ca. 4,4 mg/kg Gluten*
Prozessierte Lebensmittel:	< ca. 6,3 mg/kg Gluten**
CIP-Wasser (ohne Reiniger):	< ca. 10 ng/ml Gluten
CIP-Wasser (mit Reiniger):	< ca. 50 - 100 ng/ml Gluten

*ethanolische Extraktion

**Cocktail (patented) Extraktion

Ungültiges Ergebnis: keine Kontrollbande oder unvollständige Banden

Wenn nach der Testdurchführung keine blaue Kontrollbande bzw. eine inkomplette Kontroll- oder Testbande sichtbar ist, bedeutet dies, dass das Ergebnis ungültig ist und der Test mit einem neuen Streifen wiederholt werden muss. Bei wiederholtem ungültigem Ergebnis überprüfen Sie bitte das Haltbarkeitsdatum des Testkits und kontrollieren den Inhalt auf sichtbare Zeichen eines Reagenzienverfalls (siehe Kapitel 8.).

11. Grenzen der Methode

Der Test wurde zum Nachweis geringer Glutenkonzentrationen (Kontaminationen) entwickelt. Bei hohen Konzentrationen tritt kein Überladungseffekt (Overload- oder Hook-Effekt) ein. Bei sehr hohen Konzentrationen (> 10.000 mg/kg Gluten) kann es jedoch zu einem Verschmieren der roten Testbande kommen.

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Die Nachweisgrenze ist abhängig von der Probenart und der Extraktionseffizienz bzw. von der Beschaffenheit der Oberfläche und der Art der Kontamination.

Eine inhomogene Verteilung von Gluten im Lebensmittel und eine nicht ausreichende Probenmenge können Ursache für ein negatives Ergebnis sein.

Spülwasser mit Hypochlorit-haltigen Reinigern können nicht untersucht werden. Dieser Reiniger zerstört Gluten sehr schnell durch Oxidation. Der Streifentest kann die möglicherweise zurückbleibenden Gluten-Fragmente nicht erkennen.

Grundsätzlich schließt ein negatives Testergebnis nicht aus, dass eine Glutenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Getreidekomponenten, wie z. B. Stärke, in einer Probe enthalten sein können. Ergebnisse sollten entsprechend kommentiert werden.

Es wird empfohlen, die Probenextraktion mit Ethanol für Lebensmittel zu verwenden, die nicht erhitzt wurden. Bei hitzeprozessierten Lebensmitteln kann die Effizienz der Extraktion reduziert sein. Die Eignung der Extraktionsmethode für das jeweilige Lebensmittel ist vom Anwender zu verifizieren.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine zudem verändert und / oder fragmentiert vorliegen. Dies kann die Wiederfindung oder die Kreuzreaktivität beeinflussen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Lebensmittel wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im Validierungsbericht beschrieben.

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 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.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte (ausgelöst z. B. durch Polyphenole) sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Durch die Zugabe von Fremdprotein (z. B. Magermilchpulver) während der Extraktion oder der Testdurchführung können Matrixeffekte gegebenenfalls unterdrückt werden.

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

12. Empfehlung

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 zu befolgen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen; hierfür sind Gluten-freie und Gluten-haltige (dotierte) Proben zu verwenden (z. B. R7012).

- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Die Extraktionseffizienz von Ethanol und Cocktail ECO (R7080) mit dem Cocktail (patented) (R7006 / R7016) zu vergleichen.
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen. Ein Beispiel für eine Dotierung ist in dem Validierungsbericht angegeben.
- Zur Abklärung unerwarteter Ergebnisse die Probe mit dem RIDASCREEN® Gliadin ELISA (R7001) oder mittels PCR (z. B. SureFood®) zu untersuchen.
- Zur Quantifizierung eines positiven Ergebnisses den RIDASCREEN® Gliadin ELISA (R7001) einzusetzen.

Zur Aufbewahrung der Teststreifen zu Dokumentationszwecken muss der obere mit „Gluten“ beschriftete Teil zusammen mit den Testbanden abgetrennt werden.

13. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für prozessierte Lebensmittel mit der RIDA® Extraction solution (colorless) (R7098) - **nur nach Validierung**.
- Probenaufarbeitung für polyphenolhaltige Rohware mit Fischgelatine.

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

Literatur

- [1] Lacorn M. et al.: The Validation of the RIDA®QUICK Gliadin for AOAC Research Institute. J AOAC Int. 2018; 101(5):1548-1557.
- [2] Lacorn M. et al.: Determination of Gluten in Processed and Nonprocessed Corn Products by Qualitative R5 Immunochromatographic Dipstick: Collaborative Study, First Action 2015.16., J AOAC Int. 2016; 99(3):730-737.
- [3] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. CXS 118-1979. Adopted in 1979. Amended in 1983 and 2015. Revised in 2008.
- [4] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Recommended Methods of Analysis and Sampling. CXS 234-1999. Adopted in 1999. Amended in 2021. Pg. 21.







- [5] Valdés I. et al.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003; 15(5):465-74.
- [6] Immer U., Haas-Lauterbach S.: Gliadin as a measure of gluten in foods containing wheat, rye, and barley-enzyme immunoassay method based on a specific monoclonal antibody to the potentially celiac toxic amino acid prolamin sequences: collaborative study. J AOAC Int. 2012; 95(4):1118-1124.
- [7] Lacorn M. et al.: 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. 2022; 105(2):442-455.
- [8] Garcia E. et al.: Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005 May; 17(5):529-39.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-01-16	Vorgängerversion
2023-02-23	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none"> – Generelle sprachliche Überarbeitung – Änderung der Entsorgungsklausel im Kapitel 6. – Kapitel 8. Anzeichen für Reagenzienverfall (neu) – Kapitel 9.5 Spezifizierung der Verwendung unterschiedlicher Extraktionsverfahren – Ausarbeitung der Kapitel 10., 11. und 12. – Kapitel Literatur, Versionsübersicht, Symbolerklärung (neu) – Haftungsausschluss erneuert

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

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

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.

RIDA®QUICK Gliadin

Brief information

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003) is an immunochromatographic test for the qualitative determination of gluten-contamination on surfaces, in cleansing waters (CIP waters) and in foods.

The test has been approved as AOAC Proficiency Tested Method (PTM 101702) for swabbing and cleansing waters^[1] and as AOAC Official Method of Analysis (OMA 2015.16) for corn based food matrices using ethanol or Cocktail (patented) extraction^[2].

The test kit contains 25 test strips, each of which can be used for one analysis. All reagents required for the swab test are contained in the test kit. Results are evaluated visually.

Time requirement: sampling for swab test..... approx. 1 min
Sample preparation for:
10 CIP water samples* approx. 5 min
10 raw materials approx. 15 min
10 processed foods (R7006) approx. 120 min
10 processed foods (R7080) approx. 35 min
Test implementation (incubation time) 5 min
*CIP = Clean-In-Place (rinse water from cleaning process)

Detection limit: Surfaces approx. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm²
Raw material approx. 4.4 mg/kg gluten*
Processed food approx. 6.3 mg/kg gluten**
CIP water (without cleansing agent) approx. 10 ng/mL gluten
CIP water (with cleansing agent) approx. 50-100 ng/mL gluten
*with ethanol extraction **with Cocktail (patented) extraction

Deviation may occur from the above mentioned values depending on investigated matrices and chosen extraction method.

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

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 spiking experiments (see chapter 11. Limits of the method).

Additional information can be found in the product's validation report.

Related products and accessories for gluten / gliadin determination

RIDA®QUICK Gliadin (single packaged) (Art. No. R7004)

RIDA®QUICK Gliadin (ready to swab) (Art. No. R7005)

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021)

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041)

RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051)

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

Cocktail ECO (Art. No. R7080)

RIDA® Extraction solution (colorless) (Art. No. R7098)

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

SureFood® Allergen Gluten (Art. No. S3606)

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

1. Intended use

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003) is an immunochromatographic assay in test strip format for the qualitative determination of gluten

- on surfaces (swab test for hygiene control in production and laboratories),
- in cleansing waters (CIP water),
- in foods after extraction with ethanol, with Cocktail (patented) or with Cocktail ECO.

The test has been developed for the detection of low amounts of gluten and detects gluten contaminations even below 10 mg/kg. Sensitivity of detection varies with investigated matrices and chosen extraction methods.

For the AOAC-RI validation of the assay for testing of surfaces and CIP waters^[1], stainless steel, sealed ceramic, plastic and silicone rubber were validated or waters without and with commercial cleansing agents respectively.

Corn-based raw materials with ethanol extraction and heat-processed corn-based foods with the Cocktail (patented) extraction are part of the AOAC Official Method of Analysis approval^[2].

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 the respective food. For detailed results and further information on validation data with other food matrices please refer to our validation report. Further applications are regularly validated in our laboratories, which we publish in our application notes (see chapter 13. Further applications).

2. General information

The use of wheat flour and gluten in foodstuff is extremely common because of their useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavor. 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.

The Codex Alimentarius Commission has stipulated the limit value for gluten-free food at 20 mg/kg gluten^[3]. This threshold has also been adopted by many national legislations. The prolamin content of gluten (e.g. gliadin in wheat) is set to be 50 %.

The official type I method for gluten determination of the Codex Alimentarius^[4] is an ELISA, which uses the R5 antibody in combination with a special extraction buffer, the Cocktail (patented) (Méndez method)^[5]. The RIDASCREEN® Gliadin ELISA (Art. No. R7001) fulfils this requirement and showed in an additional international collaborative study in 2020 its broad applicability for investigation of foods from different product groups and of different processing levels^[6, 7].

The RIDA®QUICK Gliadin test strips also use the R5 antibody and show a good correlation with the official method the RIDASCREEN® Gliadin ELISA. R-Biopharm AG is the only company that is allowed to use the R5 antibody in immunochromatographic test strips.

3. Test principle

The principle of the test in strip format is an antigen-antibody reaction based on the monoclonal R5-antibody, which is specific for the detection of gliadin from wheat and prolamins from rye and barley. In the lower area, the strip

contains red latex particle-R5-antibody-conjugates (latex conjugates). The test band contains immobilized R5 antibody. The strip is placed in a running buffer containing a prepared sample. Following the chromatographic principle, the liquid (running buffer and sample) moves upwards inside the strip. Latex conjugates are solved by the liquid and pass together with it the test band. If the analyte is present, a sandwich is formed consisting of immobilized R5 antibody, gliadin and red latex-conjugate coloring the test band red. Results are read visually.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for max. 25 determinations. Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Volume
Test strip		Ready to use	25 pieces
Test tube		Ready to use	30 pieces
Disposable pipet			25 pieces
Buffer	Transparent	Ready to use	60 mL
Evaluation card			1 piece

5. Materials required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale
- 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)
- Optional: filter paper (pore size 8 - 12 µm)
- Shaker
- Water bath (50 °C / 122 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder

5.2 Reagents

Different reagents are recommended for analysis of raw materials and processed food (see chapter 9.5).

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Skimmed milk powder (SMP, food quality) for soy, tannin and polyphenol containing food
- 60 % ethanol solution (mix 150 mL ethanol p.a. with 100 mL dist. water)
- 80 % ethanol solution (mix 120 mL ethanol p.a. with 30 mL dist. water)
- Cocktail (patented) (R7006 / R7016)
- Alternatively: Cocktail ECO (R7080)

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. Please refer to the component safety information in the material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

The Cocktail (patented) 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 the test strips or any test kit components.

Once the test strip container has been opened, store the container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

The test strips are sensitive to moisture and must be absolutely protected against it. Moist test strips can have a negative impact on the result. For this reason, remove the test strips from packaging only after having reached room temperature and immediately prior to use in the test.

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- A missing control band or an incomplete test or control band.
- A turbid or flaked buffer.

9. Test implementation

9.1 General information

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.
- For the analysis, the extraction and the test procedure should be carried out in separate rooms.
- When using the Cocktail (patented), it is recommended to work under a chemical hood, because it contains β -Mercaptoethanol.

9.2 Swab test on surfaces

- Take as many test tubes as surfaces to be analyzed.
- Place 500 μ L of buffer in the test tube (e.g. using the disposable pipette provided).
- Swab the lower end (application area; see also chapter 10. fig. 2) of a dry test strip thoroughly in a cross-hatch technique over a sampling area of 10 x 10 cm (see fig. 1).

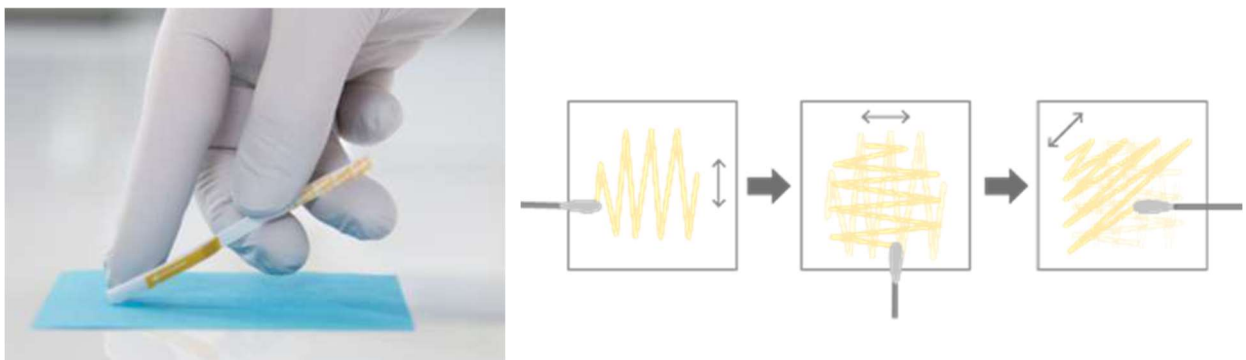


Fig. 1: Direct swabbing of surfaces with RIDA®QUICK Gliadin.

- Place the strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (\pm 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.3 Analysis of CIP water without cleansing agent

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 250 μ L of buffer in the test tubes (e.g. using a disposable pipette provided).
- Place 250 μ L of cleansing water in the test tube (e.g. using a disposable pipette provided) and mix gently.
- Place a test strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (\pm 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.4 Analysis of CIP water with cleansing agent

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 500 μ L of buffer in the test tube (e.g. using the disposable pipette provided).
- Place 50 μ L of cleansing water in the test tube (equivalent to 3 drops from the supplied disposable pipette held vertically) and mix gently.
- Place a test strip into the test tube with the arrow pointing down and do not immerse the strip beyond the maximum line (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (\pm 10 s) and read the result using the evaluation card.

9.5 Extraction of foods

For AOAC OMA 2015.16 validation^[2] non-processed corn samples were analyzed using the ethanol extraction and processed corn samples using the Cocktail (patented) extraction.

Depending on the extraction method, the addition of skimmed milk powder (SMP) is necessary for some ingredients to avoid unwanted disturbing reactions.

Food ingredient	Ethanol extraction	Cocktail (patented) / Cocktail ECO extraction
Soy	1 g skimmed milk powder	–
Tannin- and polyphenol containing food (e.g. chocolate, coffee, cacao, chestnut flour, buckwheat, millet, spices)	1 g skimmed milk powder	0.25 g skimmed milk powder

9.5.1 Extraction with ethanol – *recommended for raw materials*

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 mL of a liquid sample respectively).

- **Liquid food samples:** pipet 1 mL of the homogenized sample into a vial (add 1 g of SMP in case of soy, tannin and polyphenol containing samples) and add 9 mL of 60 % ethanol; close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 1 g of the homogenized sample (add 1 g of SMP in case of soy, tannin and polyphenol containing samples) and add 10 mL of 60 % ethanol; close the vial and mix well.
- Shake well for at least 30 sec (e.g. vortex).
- Centrifuge: 10 min / at least 2,500 x g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Alternatively: let the sample settle down and / or filtrate.

Principally, ethanol extraction can also be used for fast analysis of other samples than raw materials. **However, this procedure is not part of the AOAC Official Method of Analysis.** Please notice, that the efficiency of ethanol extraction can be reduced especially with heat-processed samples^[5]. Hence, users have to verify suitability of ethanol extraction for the particular sample material. The group of Enrique Mendéz has developed the Cocktail (patented) for improved extraction of gluten from heat-processed samples^[8]. It can generally be used for all kind of foods. As a faster and more environmental-friendly alternative, R-Biopharm has developed the Cocktail ECO, which shows a comparable extraction efficiency.

9.5.2 Extraction with Cocktail (patented) (R7006 / R7016) – *recommended for heat-processed food and in case of unknown treatment*

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 mL of a liquid sample respectively).

- **Liquid food samples:** pipet 0.25 mL of the homogenized sample into a vial (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Meat and sausages:** uneven gluten distribution is typical for these matrices; therefore, ensure to homogenize a sufficient sample amount: weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) into a vial and add 2.5 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.
- **Oat samples:** uneven gluten distribution is typical for oats; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, homogenize 200 g and carry out the extraction with at least the fourfold amount of sample and reagents: weigh 1 g of the homogenized sample into a vial and add 10 mL of Cocktail (patented); close the vial and mix well.

Please further extract all Cocktail (patented) samples as described in the following:

- Incubate 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) close the vial and mix well (for oat samples, add 30 mL 80 % ethanol accordingly).
- 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 undiluted sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed tube at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark (shelf life approx. 4 weeks).

9.5.3 Extraction with Cocktail ECO (R7080) – *recommended for processed food and in case of unknown treatment*

For a faster sample preparation, the more environmental-friendly Cocktail ECO can be used as alternative. This procedure is not part of the AOAC Official Method of Analysis. The Cocktail ECO has an extraction efficiency of approx. 70 - 110 % compared to Cocktail (patented).

Homogenize well a sufficient amount of sample (grind at least 50 g thoroughly to powder and mix well or mix well 50 mL of a liquid sample respectively). Prepare the necessary amount of Cocktail ECO according to the corresponding product information.

- **Liquid food samples:** pipet 0.25 mL of the homogenized sample into a vial (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.
- **Soft and hard food samples:** weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) and add 2.5 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.
- **Meat and sausages:** uneven gluten distribution is typical for these matrices; therefore, ensure to homogenize a sufficient sample amount: weigh 0.25 g of the homogenized sample (add 0.25 g of SMP in case of tannin and polyphenol containing samples) into a vial and add 2.5 mL of the Cocktail ECO; close the vial and mix well.
- **Oat samples:** uneven gluten distribution is typical for oats; furthermore, the samples are difficult to homogenize; therefore, homogenize 200 g and carry out the extraction with at least the fourfold amount of sample and reagents: weigh 1 g of the homogenized sample into a vial and add 10 mL of Cocktail ECO; close the vial and mix well.

Please further extract all Cocktail ECO samples as described in the following:

- Incubate for 10 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) close the vial and mix well (for oat samples, add 30 mL 80 % ethanol accordingly).

- Shake for 10 min upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Filter sample or centrifuge for 5 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 5 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 undiluted sample extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) can be stored in a well-sealed tube at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark (shelf life approx. 2 weeks).

9.6 Test procedure for food analysis

- Take as many test tubes as samples to be analyzed.
- Place 500 µL of the buffer into each test tube (e.g. using the disposable pipettes provided).
- Add 50 µL of the extracts prepared according to chapter 9.5.1 - 9.5.3 to the test tubes (e.g. using the provided disposable pipettes, 50 µL correspond to 3 drops from a vertically hold pipette) and mix carefully.
- Place one test strip into the test tube with the arrow pointing down and take care that the strip immerses only with the application area (arrow mark on strip).
- Take out the strip after exactly 5 min (\pm 10 s) and read the result using the evaluation card.

10. Evaluation

The right line in the result area is the red test band (see fig. 2). The sample contains gluten, if the test band becomes visible.

The left line in the result area is the blue control band (see fig. 2). It must be present after each test procedure.

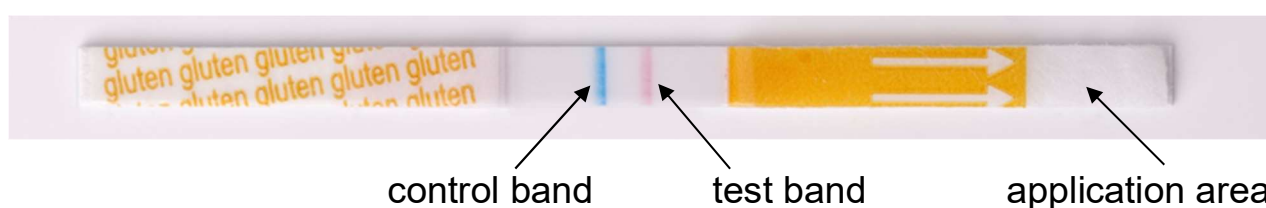


Fig. 2: RIDA®QUICK Gliadin test strip.

Positive result: two complete colored bands

The sample is positive if two complete colored bands (the blue control band and the red test band) are visible within the result area. In the case of swabbing, complete test bands with non-uniform intensity may occur due to an inhomogeneous gluten distribution on the surface or different swabbing procedures. Principally, the test band's red color is stronger with higher analyte concentrations.

Swab test:	> approx. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm ²
Raw material:	> approx. 4.4 mg/kg gluten*
Processed food:	> approx. 6.3 mg/kg gluten**
CIP water (without cleansing agent):	> approx. 10 ng/mL gluten
CIP water (with cleansing agent):	> approx. 50 - 100 ng/mL gluten

*ethanol extraction

**Cocktail (patented) extraction

Negative result: only one complete blue band

The sample is negative if only the blue test band is visible within the result area.

Swab test:	< approx. 1.6 - 3 µg gluten/100 cm ²
Raw material:	< approx. 4.4 mg/kg gluten*
Processed food:	< approx. 6.3 mg/kg gluten**
CIP water (without cleansing agent):	< approx. 10 ng/mL gluten
CIP water (with cleansing agent):	< approx. 50 - 100 ng/mL gluten

*ethanol extraction

**Cocktail (patented) extraction

Invalid result: no control band or incomplete bands

If the blue control band is not visible after a run or an incomplete control or test band is visible, the test result is not valid and the test must be repeated with a new test strip. If the result is invalid again, check the expiry date of the test kit and control the content for visible sign of reagent deterioration (see chapter 8.).

11. Limits of the method

The test has been developed for the detection of low amounts of gluten (contamination). No high-dose-hook-effect is observed at high concentrations. However, the red test band may smear at very high gluten concentrations (> 10,000 mg/kg gluten).

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

The limit of detection depends on sample type and extraction efficiency or the properties of the swabbed surface and the kind of contamination respectively.

Inhomogeneous gluten distribution inside a sample and an inadequate sample size may cause a negative result.

Cleansing water containing hypochlorite cannot be analyzed. This cleansing agent destroys gluten very quickly by oxidation. The test strip is not able to detect potentially remaining gluten fragments.

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

It is recommended to use ethanol extraction with foods, which have not been heated. Extraction efficiency may be reduced with heat-processed samples. Kit users need to verify suitability of an extraction method for particular foods.

Furthermore, proteins may have been altered and / or fragmented in processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.). This may have an impact on recovery or cross-reactivity.

For evaluation of the cross-reactivity only one exemplary sample was analyzed, other samples may show a different result. All cross-reactivities and exemplary analyzed matrices are described in the validation report.

Cross reactivities are side reactions of the used antibody 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, food processing may induce cross-reactivity in single cases or cause its loss.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive results, but may also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects (caused by e.g. polyphenols) are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments.

Addition of foreign protein (e.g. skimmed milk powder) during extraction or test procedure may suppress matrix effects.

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 interlaboratory comparisons.

12. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in the standards EN 15633-1 and 15842.
- To carry along test controls for quality control. Gluten-free and gluten-containing (spiked) samples should be used (e.g. R7012).
- To adjust the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction in case of extremely acidic or basic samples.
- To compare the extraction efficiency of ethanol and Cocktail ECO (R7080) with the Cocktail (patented) (R7006 / R7016).
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure. An example of a spike experiment is given in the validation report.
- To clear unexpected results, use the RIDASCREEN® Gliadin ELISA (R7001) or run a PCR (e.g. SureFood®).
- To use the RIDASCREEN® Gliadin ELISA (R7001) for quantification of a positive result.

For storing the test strip for documentation, cut off the upper part of the strip marked with "Gluten" together with the test bands.

13. Further applications

- Sample preparation for processed food with the RIDA® Extraction solution (colorless) (R7098) - **only after validation**.
- Sample preparation for polyphenol containing raw material using fish gelatine.

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

Literature









- [1] Lacorn M. et al.: The Validation of the RIDA®QUICK Gliadin for AOAC Research Institute. J AOAC Int. 2018; 101(5):1548-1557.
- [2] Lacorn M. et al.: Determination of Gluten in Processed and Nonprocessed Corn Products by Qualitative R5 Immunochromatographic Dipstick: Collaborative Study, First Action 2015.16., J AOAC Int. 2016; 99(3):730-737.
- [3] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. CXS 118-1979. Adopted in 1979. Amended in 1983 and 2015. Revised in 2008.
- [4] FAO Codex Alimentarius International Food Standards: Recommended Methods of Analysis and Sampling. CXS 234-1999. Adopted in 1999. Amended in 2021. Pg. 21.
- [5] Valdés I. et al.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003; 15(5):465-74.
- [6] Immer U., Haas-Lauterbach S.: Gliadin as a measure of gluten in foods containing wheat, rye, and barley-enzyme immunoassay method based on a specific monoclonal antibody to the potentially celiac toxic amino acid prolamin sequences: collaborative study. J AOAC Int. 2012; 95(4):1118-1124.
- [7] Lacorn M. et al.: 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. 2022; 105(2):442-455.
- [8] Garcia E. et al.: Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005 May; 17(5):529-39.

Version overview

Version number	Chapter and title
2018-01-16	Previous version
2023-02-23	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– General linguistic revision– Modification of the disposal clause in chapter 6– Chapter 8. Indication of instability or deterioration of reagents (new)– Chapter 9.5 specification of usability of different extraction methods– Revision of chapter 10., 11. and 12.– Chapter literature, version overview, explanation of symbols (new)– Disclaimer renewed

Explanation of symbols

General symbols:

	Follow the instructions for use
	Batch number
	Expiry date (YYYY-MM)
	Storage temperature
	Article number
	Number of test determinations
	Manufacturing date (YYYY-MM)
	Manufacturer + address

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),

Jochen Hirsch, Ute Salzbrenner,

Dr. Hans Frickel, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321