



RIDASCREEN[®] Total Gluten

REF R7041

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gluten

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gluten

Approved as AOAC Official Method of Analysis (OMA) First Action
Status 2018.15

In vitro Test

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



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

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

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® Total Gluten (Art. Nr. R7041) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von intaktem (nicht hydrolisiertem) Gluten in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Der ELISA RIDASCREEN® Total Gluten ist anerkannt als AOAC Official Method of Analysis – First Action (2018.15)^[1].

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).....50 min

Standardmaterial: Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist ein Gesamtglutenextrakt aus vier kommerziellen Weizenmehlen. Die Ergebnisse mit diesem Standardmaterial sind rückführbar auf die Haferprobe von General Mills beschrieben in AOAC SMPR® 2017.021.

Nachweisgrenze: 4 mg/kg Gluten
(Matrix-abhängig)

Bestimmungsgrenze: 5 mg/kg Gluten

Spezifität: Der eingesetzten monoklonalen Antikörper erkennen Gliadine aus Weizen und vergleichbare Prolamine aus Roggen und Gerste, High-Molecular-Weight (HMW) Glutenin-Subunits (GS) aus Weizen und HMW-Secaline aus Roggen sowie Low-Molecular-Weight (LMW)-GS aus Weizen (siehe auch Kapitel 2. Allgemeines).

Es sind **keine** Kreuzreaktivitäten bekannt.

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 Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13. Grenzen der Methode).

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 Gluten / Gliadin

| | |
|--|----------------------------------|
| RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG Cocktail (patented) | (Art. Nr. RA0041) |
| Cocktail ECO | (Art. Nr. R7006 / R7016) |
| RIDA® Extraction Solution (colorless) | (Art. Nr. R7080) |
| Set of 3 processed Gliadin Assay Controls | (Art. Nr. R7098) |
| RIDASCREEN® Gliadin | (Art. Nr. R7012) |
| RIDASCREEN®FAST Gliadin | (Art. Nr. R7001) |
| RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive | (Art. Nr. R7002) |
| RIDASCREEN® Gliadin competitive | (Art. Nr. R7051) |
| RIDA®QUICK Gliadin | (Art. Nr. R7021) |
| SureFood® ALLERGEN Gluten | (Art. Nr. R7003 / R7004 / R7005) |
| SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals | (Art. Nr. S3606) |
| | (Art. Nr. S7006) |

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. Nr. R7041) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von intaktem (nicht hydrolisiertem) Gluten aus glutenhaltigem Getreide (Weizen, Roggen und Gerste) in Hafer und Haferprodukten (Haferanteil > 50 %). Der Test ist AOAC Official Method of Analysis – First Action (2018.15).

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung validiert: Weizen in Hafer, Roggen in Hafer, Gerste in Hafer,

Hafer-basierte Kekse, Hafer-basierter Porridge, Hafermehl, Haferflocken, Hafergrütze und Hafermüsli. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Haferprodukte geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits auf diese Produkte zu überprüfen. Detaillierte Ergebnisse zu Validierungsdaten entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

Für die Analyse von haferfreien Lebensmittelproben und von Proben mit geringem Haferanteil (< 50 %) im RIDASCREEN® Total Gluten ELISA wurde eine Applikation erstellt (nicht Bestandteil des AOAC Approvals). Hierfür ist die Verwendung eines zusätzlichen Reagenzes notwendig (RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG, Art. Nr. RA0041). Weitere Informationen zur Verwendung des Reagenzes finden Sie in der Applikation „Analyse von Lebensmittelproben ohne oder mit geringem Hafergehalt im RIDASCREEN® Total Gluten“. Es wird empfohlen, Proben mit unbekanntem Haferanteil ebenfalls entsprechend dieser Applikation zu analysieren.

Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15. Weitere Applikationen) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Traditionell werden die Getreideproteine entsprechend ihrer Löslichkeit unterteilt (Osborne Fraktionierung):

| Löslich in | Fraktion |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Wasser | Albumine (keine Glutenproteine) |
| 0,5 M NaCl | Globuline (keine Glutenproteine) |
| 60 % Ethanol | Prolamine (Glutenproteine) |
| Unlöslich in 60 % Ethanol | Gluteline (Glutenproteine) |

Leider ist jedoch eine Unterteilung entsprechend der Löslichkeit kein genaues Kriterium, da es immer zu Co-Löslichkeit und Co-Präzipitation kommt. Weiterhin spielen Faktoren wie die Temperatur eine große Rolle. Insbesondere die Unterteilung der Prolamine und Gluteline, die zusammen als Glutenproteine bezeichnet werden, ist anhand der Löslichkeit nur schwer möglich. Daher ist die moderne Unterteilung der Glutenproteine in verschiedene Proteinfamilien entsprechend der elektrophoretischen Mobilität und der Aminosäuresequenzen wesentlich genauer.

Durch große Sequenzhomologien zwischen den Glutenproteinen sowohl innerhalb einer Getreidespezies als auch zwischen den Getreidespezies und durch die Kombination von vier verschiedenen monoklonalen Antikörpern ist mit dem RIDASCREEN® Total Gluten die Detektion fast aller Glutenproteine möglich:

| Weizen | | | |
|------------------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| Proteinfamilie | Fraktion | Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein* | Hauptsächliche Detektion |
| α/β-Gliadine | Hauptsächlich Prolamine | 33 % | R5 Antikörper |
| γ-Gliadine | Hauptsächlich Prolamine | 27 % | R5 Antikörper |
| ω1,2-Gliadine | Hauptsächlich Prolamine | 4 % | R5 Antikörper |
| ω5-Gliadine | Hauptsächlich Prolamine | 3 % | R5 Antikörper (schwach) |
| LMW-Glutenin-Subunits | Hauptsächlich Gluteline | 22 % | LMW 1 & 2 Antikörper |
| HMW-Glutenin-Subunits | Hauptsächlich Gluteline | 11 % | HMW Antikörper |

| Roggen | | | |
|-----------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| Proteinfamilie | Fraktion | Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein* | Hauptsächliche Detektion |
| ω-Secaline | Hauptsächlich Prolamine | 18 % | R5 Antikörper |
| γ-40k-Secaline | Prolamine und Gluteline | 25 % | R5 Antikörper |
| γ-75k-Secaline | Prolamine und Gluteline | 48 % | R5 Antikörper |
| HMW Secaline | Hauptsächlich Gluteline | 9 % | HMW Antikörper |

| Gerste | | | |
|-------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| Proteinfamilie | Fraktion | Mittlerer Anteil an Gesamt-glutenprotein* | Hauptsächliche Detektion |
| B-Hordeine | Hauptsächlich Prolamine | 27 % | R5 Antikörper |
| C-Hordeine | Hauptsächlich Prolamine | 36 % | R5 Antikörper |
| γ-Hordeine | Hauptsächlich Prolamine | 32 % | R5 Antikörper |
| D-Hordeine | Hauptsächlich Gluteline | 5 % | Keine Detektion |

* Deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung in unterschiedlichen Sorten des jeweiligen Getreides sowie der Erntejahre möglich. Angaben aus Wieser et al. Celiac Disease and Gluten (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, Seite 107.

Weizenmehl und Gluten werden häufig wegen ihrer Hitzestabilität und aufgrund ihrer nützlichen Eigenschaften bezüglich Konsistenz, Feuchtigkeitsspeicherung und Geschmack bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius (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 Antikörpern gegen Glutenproteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet in der Probe vorhandenes Gluten 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 Peroxidase-gekoppelten Antikörper-Lösung (Konjugat). 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 Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Lösung, die proportional zur Gluten-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als mg/kg Gluten 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 | Gebrauchsfertig | | 110 ml |
| Standard 1* Standard 1 | Transparent | Gebrauchsfertig | 0 mg/kg | 1,3 ml |
| Standard 2* Standard 2 | Transparent | Gebrauchsfertig | 5,0 mg/kg | 1,3 ml |
| Standard 3* Standard 3 | Transparent | Gebrauchsfertig | 10,0 mg/kg | 1,3 ml |
| Standard 4* Standard 4 | Transparent | Gebrauchsfertig | 20,0 mg/kg | 1,3 ml |
| Standard 5* Standard 5 | Transparent | Gebrauchsfertig | 40,0 mg/kg | 1,3 ml |
| Standard 6* Standard 6 | Transparent | Gebrauchsfertig | 80,0 mg/kg | 1,3 ml |
| Wash buffer Waschpuffer | Braun | Konzentrat | 10x | 100 ml |
| Conjugate Konjugat | Rot | Gebrauchsfertig | | 11 ml |
| Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro | Braun | Gebrauchsfertig | | 13 ml |
| Stop solution Stopp-Lösung | Gelb | Gebrauchsfertig | | 14 ml |

* Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 1000, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So kann die Glutenkonzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

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 (Art. Nr. Z9996FF)

5.2. Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- Gluten-freies Magermilchpulver (Lebensmittelqualität) (MMP)
- 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. Testdurchführung)) 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.).

Für den Umgang mit Ethanol wird auf die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers verwiesen.

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.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen 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

- Eine bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 1,2 ($E_{450\text{ nm}} < 1,2$) 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 Gluten-Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40 - 60 % Ethanol oder 40 - 60 % 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 1:1000 verdünnen.

- Bei Proben, die während der Aufarbeitung gelatinieren, versuchen, diese mit einem sauberen Spatel zu homogenisieren.
- Die Proben lichtgeschützt lagern.

9.1. Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016) für Hafer und Haferprodukte (offizielle AOAC Methode)

Die Glutenverteilung in Haferproben kann sehr inhomogen sein. Zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren, deshalb mindestens 200 g Probe zerkleinern und gut homogenisieren.

- 1 g der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben, das Gefäß verschließen und gut mischen (z. B. Vortexer).
- Auf eine einheitliche Suspendierung der Probe achten!
- 30 ml 80 % Ethanol (siehe Kapitel 5.2.) zugeben, das Gefäß gut verschließen und gut mischen (z. B. Vortexer).
- Auf eine einheitliche Suspendierung der Probe achten!

Bei sehr inhomogenen Proben kann die Probeneinwaage erhöht werden (> 1 g). In diesem Fall müssen die Volumina an Cocktail (patented) und 80 % Ethanol entsprechend erhöht werden. Auf die Auswahl eines entsprechend großen Gefäßes achten (z. B. Nalgene Flasche 250 ml).

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad extrahieren.
- 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 zu filtrieren.
- Die Extrakte (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. 2 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 min im Test einzusetzen.
- Falls nach einer ersten Testung höhere Verdünnungen der Extrakte notwendig werden (Proben mit Extinktionswerten (E_{450nm}) > Standard 6), sollte hierfür folgender Puffer verwendet werden, um die Zusammensetzung des Puffers gleich zu halten:
 - Cocktail (patented) 1 %
 - 80 %ige Ethanollösung 3 %
 - Puffer 96 %
 z. B. 50 µl Cocktail (patented), 150 µl 80 %ige Ethanollösung, 4.800 µl Puffer

9.2. Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016) und Magermilchpulver (MMP) für tannin- und polyphenolhaltige Haferprodukte (z. B. mit hohem Anteil an Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Teffmehl, Buchweizen, Hirse oder Gewürzen)

Die Glutenverteilung in Haferproben kann sehr inhomogen sein. Zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren, deshalb mindestens 200 g Probe zerkleinern und gut homogenisieren.

- 1 g der homogenisierten Probe in ein neues Gefäß überführen, 1 g MMP zugeben und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben. Das Gefäß verschließen und gut mischen (z. B. Vortexer).
- Auf eine einheitliche Suspendierung der Probe achten!
- 30 ml 80 % Ethanol (siehe Kapitel 5.2.) zugeben, Gefäß verschließen und gut mischen (z. B. Vortexer).
- Auf eine einheitliche Suspendierung der Probe achten!

Bei sehr inhomogenen Proben kann die Probeneinwaage erhöht werden (> 1 g). In diesem Fall müssen die Volumina an Cocktail (patented) und 80 % Ethanol sowie die Menge Magermilchpulver entsprechend erhöht werden. Auf die Auswahl eines entsprechend großen Gefäßes achten (z. B. Nalgene Flasche 250 ml).

- 40 min bei 50 °C im Wasserbad extrahieren.
- 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 $> 10.000 \times g$ 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 Extrakte (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. 2 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 min im Test einzusetzen.
- Falls nach einer ersten Testung höhere Verdünnungen der Extrakte notwendig werden (Proben mit Extinktionswerten (E_{450nm}) $>$ Standard 6), sollte hierfür das Extrakt nochmals frisch 1:25 mit Puffer verdünnt werden. Anschließend den so verdünnten Probenextrakt mit der folgenden Mischung weiter verdünnen, um die Zusammensetzung des Puffers gleich zu halten:
 - Cocktail (patented) 1 %
 - 80 %ige Ethanollösung 3 %
 - Puffer 96 %z. B. 50 µl Cocktail (patented), 150 µl 80 %ige Ethanollösung, 4.800 µl Puffer

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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 müssen vor dem Einsatz im Test 1:25 (1+24) mit Puffer verdünnt werden (z. B. 960 µl Puffer + 40 µl Probe). Der finale Verdünnungsfaktor ist 1.000.

Die verdünnten Probenextrakte sofort (innerhalb von 30 min) 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 drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei 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-Kanalpipette 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. Probenvorbereitung extrahierten und nach Kapitel 10.2. Testdurchführung verdünnten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 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 Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 20 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 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 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 Extinktion 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 (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 1.000. Da ein Probenverdünnungsfaktor von 1.000 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4. Packungsinhalt), kann die Glutenkonzentration direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall aber erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss 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 zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen der AOAC Official Method of Analysis entspricht. Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 empfehlen ebenfalls die Durchführung von Doppelbestimmungen.

12. Interpretation der Ergebnisse

Das Ergebnis des Tests wird in mg Gluten pro kg Lebensmittel angegeben und gibt somit eine Proteinkonzentration an.

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.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 6 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450\text{ nm}}$) 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. 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.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, die in Normen wie EN 15633-1 und EN 15842 aufgeführt sind (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.
- Bei der Durchführung des Tests ist die angegebene Temperatur von 20 - 25 °C einzuhalten. Abweichungen hiervon können die Wiederfindung des Analyten beeinflussen.
- 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** (R7021), analysiert werden.
- Proben, die während der Vorbereitung gelieren, mit einem sauberen Spatel homogenisieren.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

- „Analyse von Lebensmittelproben ohne oder mit geringem Hafergehalt im RIDASCREEN® Total Gluten“ mittels RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG (RA0041)

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

Literatur

[1] Lacorn et al. (2019) Quantification of Wheat, Rye and Barley Gluten in Oat and Oat Products by ELISA RIDASCREEN® Total Gluten: Collaborative Study, First Action 2018.15. *J AOAC Int.*, **102**:5, p. 1535 - 1543.

Versionsübersicht

| Versionsnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|----------------|---|
| 2018-11-12 | Freigabeversion |
| 2023-07-18 | Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: <ul style="list-style-type: none">– Generelle sprachliche Überarbeitung– Aufnahme AOAC-OMA Zertifizierung– Ausarbeitung Kapitel 5.1.– Änderung der Entsorgungsklausel in Kapitel 6.– Ausarbeitung Kapitel 11. und Erstellung Kapitel 12., 13., 14.– Ergänzung im Kapitel 11. Auswertung (verschoben aus Kapitel „Empfehlungen zur Gewährleistung einer hohen analytischen Sicherheit“)– Aufnahme Applikation für die Analyse von haferfreien Lebensmittelproben mittels Additive TG (Kapitel 1. und 15.) |

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.

RIDASCREEN® Total Gluten

Brief information

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of intact (non-hydrolyzed) gluten in food validated for the method (see chapter 1. Intended use).

The ELISA RIDASCREEN® Total Gluten is approved as AOAC Official Method of Analysis – First Action (2018.15)^[1].

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).....50 min

Standard material: The RIDASCREEN® standard material is a total gluten extract from four commercial wheat flours. The results with this standard are traceable to the oat samples from General Mills described in the AOAC SMPR® 2017.021.

Limit of detection: 4 mg/kg (ppm) gluten
(matrix-dependent)

Limit of quantification: 5 mg/kg (ppm) gluten

Specificity: The used monoclonal antibodies detect gliadins from wheat and corresponding prolamins from rye and barley, high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits (GS) from wheat and HMW-secalins from rye as well as low-molecular-weight (LMW)-GS from wheat (see also chapter 2. General).

There are **no** known cross reactivities.

Further information are 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. Limits of the method).

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

| | |
|--|----------------------------------|
| RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG Cocktail (patented) | (Art. No. RA0041) |
| Cocktail ECO | (Art. No. R7006 / R7016) |
| RIDA® Extraction Solution (colorless) | (Art. No. R7080) |
| Set of 3 processed Gliadin Assay Controls | (Art. No. R7098) |
| RIDASCREEN® Gliadin | (Art. No. R7012) |
| RIDASCREEN®FAST Gliadin | (Art. No. R7001) |
| RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive | (Art. No. R7002) |
| RIDASCREEN® Gliadin competitive | (Art. No. R7051) |
| RIDA®QUICK Gliadin | (Art. No. R7021) |
| SureFood® ALLERGEN Gluten | (Art. No. R7003 / R7004 / R7005) |
| SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals | (Art. No. S3606) |
| | (Art. No. S7006) |

1. Intended use

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of intact (non-hydrolyzed) gluten from gluten-containing cereals (wheat, rye and barley) in oat and oat products (oat content > 50 %). The test is AOAC Official Method of Analysis – First Action (2018.15).

Due to the large number of different food products, the following samples were examined representatively for different product groups within the scope of the test development: wheat in oats, rye in oats, barley in oats, oat-based cookies, oat-based porridge, oat flour, oat flakes, oat groats and oat cereals. It can be assumed, that the test is also suitable for the analysis of other oat

foods; this is to be checked by the user before applying the test kit to these products. For detailed results on validation data, please refer to the validation report.

For the analysis of oat-free food samples and samples with low oat content (< 50 %) in the RIDASCREEN® Total Gluten ELISA an application note has been prepared (not part of the AOAC approval). For this purpose, the use of an additional reagent is necessary (RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG, Art. No. RA0041). Further information on the use of the reagent can be found in the application note "Analysis of food samples with no or low oat content in RIDASCREEN® Total Gluten". It is recommended to analyze samples with unknown oat content also according to this application note.

Further applications are regularly validated in our laboratories, which we make available in our application notes (see chapter 15. Further application notes).

2. General

Traditionally, cereal proteins are subdivided according their solubility (Osborne fractionation):

| Soluble in | Fraction |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Water | Albumins (non gluten proteins) |
| 0.5 M NaCl | Globulins (non gluten proteins) |
| 60 % Ethanol | Prolamins (gluten proteins) |
| Insoluble in 60 % Ethanol | Glutelins (gluten proteins) |

Unfortunately, the subdivision according to solubility is not an accurate criterion, since co-solubilization and co-precipitation occur frequently. Furthermore, additional factors such as temperature can have an influence on the result. Especially, the subdivision into prolamins and glutelins, which form together the gluten proteins, according their solubility is very difficult. Therefore, the modern subdivision of the gluten proteins into protein families according to their electrophoretic mobility and their amino acid sequences is much more accurate.

Due to high sequence homologies between gluten proteins within one cereal species and between different species and due to the combination of four different monoclonal antibodies, the RIDASCREEN® Total Gluten enables the detection of almost all gluten proteins:

| Wheat | | | |
|------------------------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
| Protein family | Fraction | Mean content of gluten protein* | Antibody detection |
| α/β-gliadins | Mainly prolamins | 33 % | R5 antibody |
| γ-gliadins | Mainly prolamins | 27 % | R5 antibody |
| ω1,2-gliadins | Mainly prolamins | 4 % | R5 antibody |
| ω5-gliadins | Mainly prolamins | 3 % | R5 antibody (weak) |
| LMW-glutenin-subunits | Mainly glutelins | 22 % | LMW 1 & 2 antibody |
| HMW-glutenin-subunits | Mainly glutelins | 11 % | HMW antibody |

| Rye | | | |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Protein family | Fraction | Mean content of gluten protein* | Antibody detection |
| ω-secalins | Mainly prolamins | 18 % | R5 antibody |
| γ-40k-secalins | Prolamins and glutelins | 25 % | R5 antibody |
| γ-75k-secalins | Prolamins and glutelins | 48 % | R5 antibody |
| HMW secalins | Mainly glutelins | 9 % | HMW antibody |

| Barley | | | |
|-------------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
| Protein family | Fraction | Mean content of gluten protein* | Antibody detection |
| B-hordeins | Mainly prolamins | 27% | R5 antibody |
| C-hordeins | Mainly prolamins | 36% | R5 antibody |
| γ-hordeins | Mainly prolamins | 32% | R5 antibody |
| D-hordeins | Mainly glutelins | 5% | No detection |

* Significant differences between different cultivars of the respective cereal and harvest years possible. Data from Wieser et al. Celiac Disease and Gluten (2014) Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, page 107.

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 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.

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 antibodies against gluten proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, gluten 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 antibodies conjugated to peroxidase is added. These conjugates bind to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugates are then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the substrate/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 gluten concentration in the sample, is measured photometrically at 450 nm and expressed as mg/kg gluten.

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 | Ready to use | | 110 mL |
| Standard 1* | Transparent | Ready to use | 0 mg/kg | 1.3 mL |
| Standard 2* | Transparent | Ready to use | 5.0 mg/kg | 1.3 mL |
| Standard 3* | Transparent | Ready to use | 10.0 mg/kg | 1.3 mL |
| Standard 4* | Transparent | Ready to use | 20.0 mg/kg | 1.3 mL |
| Standard 5* | Transparent | Ready to use | 40.0 mg/kg | 1.3 mL |
| Standard 6* | Transparent | Ready to use | 80.0 mg/kg | 1.3 mL |
| Wash buffer | Brown | Concentrate | 10x | 100 mL |
| Conjugate | Red | Ready to use | | 11 mL |
| Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro | Brown | Ready to use | | 13 mL |
| Stop solution | Yellow | Ready to use | | 14 mL |

* The dilution factor 1,000 from the sample preparation has already been considered when labeling the standards. Therefore, the gluten concentration of samples can directly be read from the standard curve.

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 μm)
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 μL and 200 - 1000 μL 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 μL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)

5.2. Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- Gluten-free skim milk powder (food quality) (SMP)
- 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. Test procedure)). 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.).

Regarding the handling of ethanol, please refer to the safety instructions of the respective manufacturer.

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 reddish substrate/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 reddish substrate/chromogen 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 - 60 % ethanol or 40 - 60 % 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 1:1000.
- Try to homogenize with a clean spatula if samples gelatinizing during preparation.
- The samples should be stored protected against light.

9.1. Extraction with Cocktail (patented) (R7006 / R7016) for oat and oat products (official AOAC method)

The gluten distribution in oat samples can be very inhomogeneous. Furthermore, the samples are difficult to homogenize. Therefore, grind and homogenize well at least 200 g.

- Weigh in 1 g of homogenized sample to a new vial, add 10 mL of Cocktail (patented), close the vial and mix well (e.g. vortexer).
- Pay attention to obtain a homogeneous suspension!
- Add 30 mL 80 % ethanol (see chapter 5.2.), close the vial and mix well (e.g. vortexer).
- Pay attention to obtain a homogeneous suspension!

The weighted sample can be further increased for very inhomogeneous samples (> 1 g). In this case, the volume of Cocktail (patented) and 80 % ethanol must be increased accordingly. Choose a sufficient big vial (e.g. Nalgene bottle 250 mL).

- Extract for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath.
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Filter or centrifuge sample 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 new vial.

- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract.
- 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 approx. 2 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 min.
- If further dilutions are required (samples with absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6), the following buffer should be used to keep the composition of the buffer constant:
 - Cocktail (patented) 1 %
 - 80 % ethanol solution 3 %
 - Buffer 96 %
 e.g. 50 µL Cocktail (patented), 150 µL 80 % ethanol solution, 4,800 µL buffer

9.2. Extraction with Cocktail (patented) (R7006 / R7016) and skim milk powder (SMP) for tannin- and polyphenol-containing oat products (e.g. oat products with high content of chocolate, coffee, cocoa, chestnut flour, teff flour, buckwheat, millet or spices)

The gluten distribution in oat samples can be very inhomogeneous. Furthermore, the samples are difficult to homogenize. Therefore, grind and homogenize well at least 200 g.

- Weigh in 1 g of homogenized sample to a new vial, add 1 g SMP and 10 mL of Cocktail (patented), close the vial and mix well (e.g. vortexer).
- Pay attention to obtain a homogeneous suspension!
- Add 30 mL 80 % ethanol (see chapter 5.2.), close the vial and mix well (e.g. vortexer).
- Pay attention to obtain a homogeneous suspension!

The weighted sample can be further increased for very inhomogeneous samples (> 1 g). In this case, the volume of Cocktail (patented) and 80 % ethanol as well as the amount of skim milk powder must be increased accordingly. Choose a sufficient big vial (e.g. Nalgene bottle 250 mL).

- Extract for 40 min at 50 °C (122 °F) in a water bath.
- Shake for 1 h upside down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
- Filter or centrifuge sample 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 new 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 °C) (shelf life approx. 2 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 min.
- If further dilutions are required (samples with absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) > standard 6), the extract should be freshly diluted again 1:25 with buffer for this purpose. Then further dilute the sample extract with the following buffer to keep the composition of the buffer constant:
 - Cocktail (patented) 1 %
 - 80 % ethanol solution 3 %
 - Buffer 96 %
 e.g. 50 µL Cocktail (patented), 150 µL 80 % ethanol solution, 4,800 µL buffer

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

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 prepared extracts must be diluted 1:25 (1+24) with buffer before usage (e.g. 960 µL buffer + 40 µL sample). The final dilution factor is 1,000.

Use the diluted sample extracts immediately (within 30 min) 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 three strips (24 wells) at a time. If more than three 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. Sample preparation and diluted according to chapter 10.2. Test procedure) in duplicate to the wells and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °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 conjugate (see chapter 10.1.) to each well and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °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 100 μL of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 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 (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The evaluation should be done by use of the 4-parameter function.

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 certificate of analysis (CoA).

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 1,000. Hence, a dilution factor of 1,000 is already taken into account with the standard concentrations (see chapter 4. Reagents provided), the gluten concentration can directly be read from the standard curve.

The assay can be also evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. However, the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors) is increased in this case. In addition, a higher fluctuation of the results is to be expected for individual determinations. In the RIDASOFT[®] Win.NET software, a separate evaluation must be created for this. The evaluation of single determinations is not available by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. It should be noted that this is not in accordance with the AOAC Official Method of Analysis. Standards such as EN 15633-1 and EN 15842 also recommend performing duplicate determinations.

12. Interpretation of results

The test result is calculated in mg gluten per kg of food and thus indicates the protein concentration.

Results between LOD and LOQ indicate a low allergen 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 gluten components, such as lipids, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

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.

14. Recommendation

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).
- To pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- To 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, to adjust the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction may be necessary.
- When carrying out the test, the specified temperature of 20 - 25 °C (68 - 77 °F) must be observed. Deviations hereof may influence the recovery of the analyte.
- 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 (R7021)**.
- Try to homogenize samples gelatinizing during preparation with a clean spatula.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- “Analysis of food samples without or with low oat content in RIDASCREEN® Total Gluten“ with RIDASCREEN® Total Gluten Additive TG (RA0041)

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. (2019) Quantification of Wheat, Rye, and Barley Gluten in Oat and Oat Products by ELISA RIDASCREEN® Total Gluten: Collaborative Study, First Action 2018.15. *J AOAC Int.*, **102**:5, p. 1535 - 1543.

Version overview

| Version number | Chapter and title |
|----------------|--|
| 2018-11-12 | Release version |
| 2023-07-18 | Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none"> – General linguistic revision – Inclusion of AOAC-OMA certification – Revision of chapter 5.1. – Modification of the disposal clause in chapter 6. – Revision of chapter 11. and creation of chapters 12., 13., 14. – Addition in chapter 11. Evaluation (moved from chapter "Recommendations to ensure high analytical safety") – Inclusion of application note for the analysis of oat-free food samples by using Additive TG (RA0041) (chapter 1. and 15.) |

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. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321