

r-biopharm®



RIDASCREEN®EASY Gluten

REF RAE7071

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gluten (Gliadin) und verwandten Prolaminen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gluten (gliadin) and corresponding prolamins

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 46 °F)



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®EASY Gluten (Art. Nr. RAE7071) ist ein R5-basierter Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Gluten aus Weizen, Roggen und Gerste in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 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, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Standardmaterial:	PWG-Gliadin in gepufferter, wässriger Lösung; angegeben in mg/kg Gluten (Weizen); siehe auch: http://www.wgpat.com/handling.html
Nachweisgrenze: (Matrix-abhängig)	0,8 mg/kg Gluten (gemittelt über Weizen, Roggen, Gerste)
Bestimmungsgrenze:	3 mg/kg Gluten; RSD _i 16,6 % (gemittelt über Weizen, Roggen, Gerste)
Spezifität:	Der eingesetzte monoklonale Antikörper R5 erkennt die Gliadin-Fractionen aus Weizen und aus durch Kreuzung der Gattung Triticum (Weizen) erzeugten Varietäten sowie verwandte Prolamine aus Roggen und Gerste. Der Test erkennt die glutenhaltigen Getreide Einkorn und Khorasan-Weizen mit einer Wiederfindung zwischen ca. 35 % bis 50 %. Andere glutenhaltige Getreide wie Weizen (<i>Triticum aestivum</i>), Roggen, Gerste, Dinkel, Emmer, Triticale und Hartweizen werden innerhalb der AOAC-Vorgaben mit 50 % bis 200 % wiedergefunden. Es wurde bei 108 getesteten Lebensmitteln keine Kreuzreaktion festgestellt.

Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

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. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite <https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte und Zubehör für den Nachweis von Gluten / Gliadin

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)
RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003 / R7004 / R7005)
RIDA®QUICK Gluten quant. (Art. Nr. RAL7073)
Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006 / R7016)
RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098)
RIDASCREEN®EASY Extraction Tablets (Art. Nr. RAA0008)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. Nr. R7012)
SureFood® ALLERGEN Gluten (Art. Nr. S3606)
SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. Nr. S3301)
SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals (Art. Nr. S7006)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®EASY Gluten (Art. Nr. RAE7071) ist ein auf dem R5-Antikörper basierender Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Kontaminationen durch Prolamine aus Weizen (Gliadine), Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden stellvertretend folgende Produkte im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Backware, Sauce, schokoladenhaltiges Dessert und Gewürze. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender vor Verwendung des Testkits durch entsprechende Experimente zu überprüfen.

Detaillierte Ergebnisse zu den untersuchten Lebensmitteln, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht.

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. Der Prolamingehalt (z. B. Gliadin) von Gluten wird per Definition mit 50 % festgelegt (CODEX STAN 118-1979) ^[1]. Für die Umrechnung einer gemessenen Gliadin-Konzentration in Gluten wird deshalb ein Faktor 2 verwendet. Die neuere Forschung hat aber gezeigt, dass der tatsächliche Umrechnungsfaktor in Weizen etwa 1,5 beträgt ^{[2] [3] [4]}. Der RIDASCREEN® EASY Gluten ist nicht gegen Gliadin kalibriert, sondern gegen ein exemplarisches Weizenmehl ^[2] und gibt das Ergebnis direkt in Gluten an. Der Umrechnungsfaktor entfällt somit. Hierdurch werden im Vergleich zu einem Test, der den Gluten-Gehalt mittels Faktor 2 aus einer gemessenen Gliadin-Konzentration berechnet, niedrigere Werte für den Gluten-Gehalt bestimmt, die in besserer Übereinstimmung mit neueren Forschungsergebnissen sind.

Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führen kann. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

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

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

Der Grenzwert von 20 mg/kg Gluten wurde in viele nationale Gesetzgebungen übertragen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen R5 Antikörpern gegen die Gliadin- bzw. Prolamin-Komponenten von Gluten beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet in der Probe vorhandenes Gliadin bzw. verwandte Prolamine 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 R5 Antikörper-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Eine Substrat- und Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben und inkubiert. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung, die proportional zur 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
Extraction tablets Extraktionstabletten	Weiß	Gebrauchsfertig		50 Stück
Standard 1* Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	3 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	6 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	12 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	24 mg/kg	1,3 ml
Standard 6* Standard 6	Transparent	Gebrauchsfertig	48 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	50 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Gebrauchsfertig		11 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		13 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 500**, der sich aus der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Probenvorbereitung ergibt. So kann die Gluten-Konzentration der Probe 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 mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (60 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 μm)
- Messpipetten

- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes Wasser (dest. Wasser) oder deionisiertes Wasser
- 60 % Ethanol (z. B. Zugabe von 150 ml Ethanol p. A. (99 %) zu 100 ml dest. Wasser)
- Gegebenenfalls zusätzlich benötigte Extraktionstabletten:
RIDASCREEN®EASY Extraction Tablets (Art. Nr. RAA0008)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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

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

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

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren. Beachten Sie auch die folgenden Hinweise zu den Extraktionstabletten.

Für die Entnahme von Extraktionstabletten den Behälter erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser an den Tabletten zu vermeiden. Die Extraktionstabletten können im verschlossenen Behälter bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auch bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden.

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.

Die Extraktionstabletten und der Waschpuffer sind nicht chargenspezifisch. Sie können auch bei RIDASCREEN®EASY Allergen ELISA mit anderer Chargennummer verwendet werden. Darüber hinaus ist ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrats/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Absorption kleiner 1,2 ($A_{450\text{ nm}} < 1,2$) für Standard 6

9. Probenvorbereitung

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA®QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005) auf Gluten-Kontamination überprüfen.

Die Proben bis zu Aufarbeitung kühl und lichtgeschützt lagern.

Hinweis zu den Extraktionstabletten:

Die RIDASCREEN®EASY Allergen ELISA enthalten anstatt eines flüssigen Extraktionspuffers eine Tablette mit allen für die Extraktion benötigten Chemikalien. Die Tablette wird zu jeder Probe gegeben. Anschließend wird eine definierte Menge 60 %igen Ethanol zugegeben und die Probe bis zum Zerfallen der Tablette durch Mischen suspendiert. Der 60 %ige Ethanol sollte auf 60 °C vorgewärmt sein. Dies erleichtert den Zerfall und gewährleistet, dass die optimale Temperatur für die Extraktion sofort gegeben ist. **Achtung:** Der 60 %ige Ethanol sollte nicht mehr als dreimal erwärmt oder über einen längeren Zeitraum bei 60 °C aufbewahrt werden. Ethanol ist leicht flüchtig, wodurch sich die Konzentration der Ethanolösung verändert. Verwendete Gefäße immer gut verschlossen halten bzw. nach dem Öffnen sofort wieder verschließen.

Die Probenextrakte müssen wegen des hohen Ethanolgehaltes vor dem Einsatz im ELISA 1:50 mit Puffer verdünnt werden. Für die Herstellung des Verdünnungspuffers wird zu einer Extraktionstablette 20 ml vorgewärmtes dest. Wasser (60 °C) gegeben und die Probe bis zum Zerfallen der Tablette durch Mischen suspendiert. Die Tablette enthält unlösliche, inerte Zusätze, die zum Pressen der Tabletten benötigt werden. Diese werden üblicherweise mit den festen Bestandteilen der Probe während der Zentrifugation sedimentiert. Für die Herstellung des Verdünnungspuffers sind diese Bestandteile durch Filtration oder Zentrifugation (5 min bei 2.500 x g) abzutrennen. Im Falle einer Zentrifugation empfiehlt es sich, den Überstand in ein neues Gefäß zu dekantieren. Es ist zu beachten, dass der gebrauchsfertige Puffer nur eine eingeschränkte Haltbarkeit aufweist und die Wirksamkeit abnimmt. Der Puffer muss deshalb täglich frisch hergestellt werden.

9.1 Probenaufarbeitung

60 %igen Ethanol in einem Wasserbad auf 60 °C vorwärmen.

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g homogenisierte Probe (bzw. 1 ml von flüssigen Proben) in ein ausreichend großes Reagenzröhrchen (siehe Kapitel 5.1) einwiegen, eine Extraktionstablette und 10 ml des vorgewärmten 60 %igen Ethanols zugeben.
- Das Röhrchen verschließen und 30 s intensiv mischen (z. B. vortexen) bis die Extraktionstablette vollständig zerfallen ist und sich eine homogene Suspension gebildet hat.
- 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren.
- 5 min bei mindestens 2.500 x g zentrifugieren.
(Alternativ bzw. bei Proben, die langsam sedimentieren:
2 ml des Extraktes in ein frisches Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min zentrifugieren (> 10.000 x g)).
- Die Extrakte zusätzlich filtrieren, wenn durch die Zentrifugation kein partikelfreier Überstand erreicht wird.

Anmerkung

Der partikelfreie Extrakt ist in einem gut verschlossenen Gefäß bis zu zwei Wochen im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Der Extrakt muss vor der Testung im ELISA 1:50 (siehe Kapitel 10.2) verdünnt werden.

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10-fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1 + 9) mit destilliertem Wasser verdünnt werden (z. B. 50 ml Pufferkonzentrat + 450 ml dest. Wasser).

Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 20 - 25 °C oder von 3 Monaten bei 2 - 8 °C.

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

10.2 Testdurchführung

Die Extrakte (Überstand der Zentrifugation oder Filtrat) müssen vor der Testung im ELISA 1:50 (z. B. 40 µl + 1960 µl) mit Probenverdünnungspuffer (siehe Kapitel 9. Probenvorbereitung; Hinweis zu den Extraktionstabletten) verdünnt werden. Die verdünnten Extrakte weisen eine Haltbarkeit von ca. 24 Stunden bei 20 - 25 °C auf.

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist zu 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 durch das Pipettieren zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und hiervon werden dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanalpipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Probenextrakte in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der verdünnten Extrakte als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 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 dreimal wiederholen (insgesamt vier Waschzyklen).
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 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. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend

wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere dreimal wiederholen (insgesamt vier 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 mischen. Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung sollte mittels 4-Parameter-Funktion erfolgen. Diese ermöglicht auch oberhalb von Standard 6 die Berechnung von Ergebnissen mittels Extrapolation. Ergebnisse, die deutlich größer als der Standard 6 sind, sind aber mit einer erhöhten Messunsicherheit versehen.

Proben mit Absorptionswerten (A_{450nm}), die größer Standard 6 sind, können zur exakten Bestimmung des Gluten-Gehaltes höher verdünnt und nochmals bestimmt werden. Hierfür sollte der unverdünnte Extrakt genommen und mit frisch hergestelltem Verdünnungspuffer (siehe Kapitel 9; Hinweis zu den Extraktionstabletten) entsprechend hoch verdünnt werden. Der zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat (Analysezertifikat, CoA) entnommen werden, das über den QR-Code auf dem Testkit erhältlich ist. Da die Extinktionswerte im Labor von den auf dem Zertifikat genannten abweichen können, wird empfohlen, die Verhältnisse der Standards zueinander mit denen auf dem Zertifikat zu vergleichen. Hierfür werden die B/B_{max} -Werte (das Verhältnis der Extinktionswerte der Standards zum höchsten Standard) miteinander verglichen. Diese sollten im aktuellen Testlauf ähnlich zu den Verhältnissen der Standards auf dem Zertifikat sein.

Der Test ist gegen Gluten kalibriert. Das Ergebnis gibt deshalb die Menge an Gluten in mg pro kg Lebensmittel an (**Gluten in mg/kg**).

Beim Arbeiten nach der vorliegenden Gebrauchsanweisung werden die Proben während der Extraktion und der Testdurchführung 1:500 verdünnt. Der Probenverdünnungsfaktor von 500 ist bei den Konzentrationsangaben der

Standards bereits berücksichtigt (siehe Kapitel 4). Die Konzentration an Gluten in der Probe kann deshalb 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. In der RIDASOFT® Win.NET Food&Feed Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in den Standards EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

12. Interpretation der Ergebnisse

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

Ergebnisse zwischen LoD (Limit of Detection) und LoQ (Limit of Quantification) können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Je nach untersuchter Matrix können auch unterhalb des LoQ noch Werte mit ausreichender Präzision ($VK < 30\%$) ermittelt werden. Grundsätzlich sind Werte in diesem Bereich aber aufgrund der höheren Schwankungsbreite des Tests mit einer größeren Unsicherheit versehen. Wenn die Präzision des Tests mit einer bestimmten Probenmatrix nicht validiert wurde, sollten Ergebnisse unterhalb des Messbereichs deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ "< LoQ" angegeben werden. Weitere Informationen hierzu können Sie dem aktuellen Validierungsbericht entnehmen.

Ein Ergebnis unterhalb der LoD schließt nicht aus, dass eine Gluten-Kontamination 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.

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 im Falle von Wiederholungsuntersuchungen 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 konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

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

Durch die Verwendung von 60 %igem Ethanol während der Extraktion werden unspezifische Reaktionen mit Soja unterdrückt. Allerdings zeigte ein Soja-Drink während der Validierung des Tests eine unspezifische Reaktion mit ca. 4 mg/kg Gluten. Diese unspezifische Reaktion kann durch Verwendung von

70 %igem Ethanol unterhalb von Standard 1 gedrückt werden. Für die Untersuchung von Soja-Drinks wird deshalb eine Extraktion mit 70 %igem Ethanol anstelle des 60 %igen Ethanols empfohlen.

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 Test verwendeten Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln auch erst in Erscheinung treten oder aber verloren gehen.

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

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

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

14. 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 (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen) zu befolgen.

- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Zur Qualitätskontrolle Testkontrollen mitzuführen. Hierfür sind Gluten-freie und Gluten-haltige (dotierte) Proben zu verwenden (z. B. Art. Nr. R7012).
- Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen. Ein Beispiel für eine Dotierung ist im Validierungsbericht angegeben.
- Bei stark sauren oder basischen Proben kann es notwendig sein, den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood®) durchzuführen.
- Bei der Herstellung von Lebensmitteln wie z. B. Bier und Sauerteig werden Proteine fragmentiert. Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für **fragmentierte Proteine** vermindert. Daher sollten diese Proben mit einem kompetitiven ELISA, wie dem **RIDASCREEN® Gliadin competitive** (Art. Nr. R7021), analysiert werden.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

Weitere Applikationen sind auf Anfrage erhältlich.

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

Literatur









- [1] Lacorn, M., Dubois, T., Weiss, T., Zimmermann, L., Schinabeck, T. M., Loos-Theisen, S. & Scherz, K.. (2022). Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01, J. AOAC Int (publication in progress).
- [2] Schall, E., Scherf, K.A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R.E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020). Characterisation and comparison of selected wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their blends to develop a gluten reference material. Food Chem. 313, 126049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [3] Wieser, H., Koehler, P. & Konitzer, K. (2014). Celiac Disease and Gluten: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, Seite 107.
- [4] Wieser, H. & Koehler, P. (2009). Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? Eur. Food Res. Technol. 229, 9-13.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2024-08-27	Freigabeversion

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

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

Patent-Hinweis:

Das Extraktionsmittel im vorliegenden Produkt enthält Sulfite. Verfahren zur Überprüfung eines Lebensmittels unter Nutzung eines sulfithaltigen Extraktionsmittels und/oder entsprechende Detektions-Kits sind Gegenstand der nachfolgend genannten Patente von MORINAGA & Co., Ltd.: European Patent EP 2 224 239 B1, Australian Patent AU 2008 330 507 B2, United States Patent US 8 859 212 B2, Japanese Patent JP 5 451 854 B2. Der Patentinhaber hat der R-Biopharm AG eine Lizenz zur Nutzung und zum Verkauf von Produkten, die die geschützte Technologie verwenden, in den genannten Regionen erteilt.

Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellerseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDASCREEN®EASY Gluten

Brief information

RIDASCREEN®EASY Gluten (Art. No. RAE7071) is an R5-based sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of gluten from wheat, rye, and barley in food validated for the method (see chapter 1).

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

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) . approx. 20 min test implementation (incubation time) 30 min
Standard material:	PWG-Gliadin in buffered, aqueous solution; expressed as mg/kg gluten (wheat); for more information: http://www.wgpat.com/handling.html
Limit of detection: (depending on matrix)	0.8 mg/kg (ppm) gluten (average of wheat, rye, barley)
Limit of quantification:	3 mg/kg (ppm) gluten; RSD _i 16.6 % (average of wheat, rye, barley)
Specificity:	The monoclonal antibody R5 reacts with the gliadin fractions from wheat and corresponding prolamins from rye and barley. The test kit detects the gluten containing cereals einkorn and khorsan-wheat with recovery rates of approx. 35 % to 50 %. Other gluten containing cereals such as wheat (<i>triticum aestivum</i>), rye, barley, spelt, emmer, triticale, and durum wheat show recovery rates within the AOAC specifications of 50 % to 200 %. No cross-reaction was detected in 108 tested foods. Further information can be found 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).

To increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website

<https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/>.

Related product and accessories for gluten / gliadin determination

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)
RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003 / R7004 / R7005)
RIDA®QUICK Gluten quant. (Art. No. RAL7073)
Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)
RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)
RIDASCREEN®EASY Extraction Tablets (Art. No. RAA0008)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. No. R7012)
SureFood® Allergen 4plex Cereals (Art. No. S7006)
SureFood® Allergen Gluten (Art. No. S3606)
SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. No. S3301)

1. Intended use

RIDASCREEN®EASY Gluten (Art. No. RAE7071) is an R5-based sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of contaminations by prolamins from wheat (gliadins), rye (secalins), and barley (hordeins) in foods. Due to the large number of different foods, the following products were examined representatively within the scope of the test development: baked good, sauce, chocolate containing dessert, and spices.

It can be assumed that the test is also suitable for the analysis of other foodstuffs; this is to be checked by the user himself.

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report.

2. General information

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common because of their heat stability and useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavour. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley. The prolamin content (e.g. gliadin) of gluten is per definition generally assumed to be 50 % (CODEX STAN 118-1979) ^[1]. Hence, a factor of 2 is used for calculation of gluten from a measured gliadin concentration. However, recent research has shown that the real conversion factor from gliadin to gluten is approx. 1.5 ^{[2], [3], [4]}. The RIDASCREEN®EASY Gluten is not calibrated against gliadin, but against an exemplary wheat flour ^[2] and indicates the result in gluten. Therefore, the calculation factor is omitted. Hereby, lower values are determined being in better agreement with new research findings for the gluten content in comparison to an assay, which calculates the gluten content from a measured gliadin concentration by the factor 2.

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 Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten” (CODEX STAN 118/1979) two categories for labelling of food according to the gluten content 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.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific R5 antibodies against the gliadin and prolamin components of gluten. By adding the standard or sample solution to the wells, gliadin or related prolamins present in the sample will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Following the washing step, a solution containing R5 antibody conjugated to peroxidase is added. This conjugate is bound to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue end product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. 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
Extraction tablets	White	Ready to use		50 pcs.
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 mL
Standard 2*	Transparent	Ready to use	3 mg/kg	1.3 mL
Standard 3*	Transparent	Ready to use	6 mg/kg	1.3 mL
Standard 4*	Transparent	Ready to use	12 mg/kg	1.3 mL
Standard 5*	Transparent	Ready to use	24 mg/kg	1.3 mL
Standard 6*	Transparent	Ready to use	48 mg/kg	1.3 mL
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	50 mL
Conjugate	Red	Ready to use	11x	11 mL
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		13 mL
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 mL

*) The concentration values of the standards already consider the **dilution factor of 500** coming from sample extraction as described in this IFU. 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 with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C / 140 °F; for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 μm)
- Graduated pipettes
- Measuring 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 Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- 60 % ethanol (e.g. add 150 mL reagent grade ethanol (99 %) to 100 mL dist. water)
- If further extraction tablets are needed: RIDASCREEN®EASY Extraction Tablets (Art. No. RAA0008)

6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

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 microtiter strips (coated microtiter plate and pre-plate if necessary, see chapter 10.2). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

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 (36 - 46 °F). Do not freeze any test kit components. Consider also the following advice for the extraction tablets.

To avoid moisture at the extraction tablets, open the container only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). The extraction tablets can be also stored in the closed container at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) until the expiry date printed on the label.

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 (36 - 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).

The extraction tablets and the wash buffer are not lot-specific. They can be used also with EASY allergen ELISA of different lot numbers. Beyond that, do not interchange other 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 before and after each sample preparation.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.
- Check for gluten contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA[®]QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005).

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

Note about extraction tablets:

The RIDASCREEN[®]EASY Allergen ELISA contain extraction tablets with all needed chemicals for extraction instead of a liquid extraction buffer concentrate. A tablet is added to each sample. Then, a defined volume of 60 % ethanol is added and the sample will be suspended by mixing until the tablet is decomposed. The 60 % ethanol should be pre-heated to 60 °C (140 °F). This eases decomposition and guarantees the ideal extraction temperature from the beginning. **Caution:** Do not heat the 60 % ethanol solution more than 3 times or store it for longer times at 60 °C (140 °F) as the ethanol can evaporate. Use vials with a tight-closing lid and close the vial immediately after usage.

Due to their high ethanol content, sample extracts must be diluted 1:50 with buffer before testing in ELISA. One extraction tablet is solved in 20 mL of pre-heated (60 °C / 140 °F) dist. water for preparation of the dilution buffer. Tablets contain insoluble, inert additives, which are needed for tablet pressing. The additives sediment usually with sample particles during centrifugation. For preparation of the dilution buffer, the additives must be separated by filtration or centrifugation (5 min at 2,500 x g). In case of centrifugation, it is recommended to decant the supernatant into a fresh vial. The prepared dilution buffer has a limited stability and its efficacy declines. Hence, the buffer must be freshly prepared each day.

9.1 Sample extraction

Preheat 60 % ethanol solution in a water bath to 60 °C (140 °F).

Homogenize a representative, adequately big amount of a solid sample (e.g. 50 g; grind it thoroughly to powder and mix well) or mix well a sample in case of liquid foods.

- Weigh 1 g of the homogenized sample (or 1 mL from a liquid sample) into a sufficiently large vial (see chapter 5.1.), add one extraction tablet and 10 mL of preheated 60 % ethanol solution.
- Close vial and mix thoroughly for 30 s (e.g. vortexer) until the extraction tablet is fully decomposed and a homogeneous suspension has formed.
- Incubate for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath.
- Centrifuge for 5 min at a minimum of 2500 x *g*.
(Alternatively, or for samples that sediment slowly:
Transfer 2 mL of the extract into a fresh vial and centrifuge at high speed (> 10,000 x *g*) for 10 min in a microcentrifuge.)
- Filter extract additionally if no particle-free supernatant is obtained by centrifugation.

Note

The particle-free extract can be stored in a tightly closed vial in the dark at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) up to two weeks. Extracts must be diluted 1:50 (see chapter 10.2) before testing in ELISA.

10. Test procedure

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 10-fold concentrate. Before use, the buffer must be diluted 1:10 (1 + 9) with dist. water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL dist. water).

The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for 4 weeks or for 3 months at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Components should be stored immediately at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

For ELISA testing, the extracts (supernatant of centrifugation step or filtrate) must be diluted 1:50 (e.g. 40 μL + 1960 μL) with sample dilution buffer (see 9. Sample preparation; note about extraction tablets). The diluted extracts have a shelf life of approx. 24 hours at 20 - 25 °C (68 - 77 °F).

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps.

Do not use more than three microtiter plate 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 due to pipetting. 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, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore, cover the microtiter plates.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and sample extracts to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 μL of each standard or diluted extract in duplicate to the wells and incubate for 10 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 three more times (a total of four wash cycles).
4. Add 100 μL of the conjugate to each well and incubate for 10 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 in a row) 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 three more times (a total of four wash cycles).
6. Add 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 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

7. Add 100 μL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter function. This enables result calculation even above standard 6 by extrapolation. However, results being significantly higher than standard 6 show a higher uncertainty.

For exact determination of the gluten content, samples with an absorption ($A_{450\text{nm}}$) > standard 6 can be higher diluted and measured again. For a higher dilution, the undiluted extract should be diluted adequately with freshly prepared dilution buffer (see chapter 9: Note on extraction tablets). The additional dilution factor must be considered when calculating the result.

It must be clarified that all quality criteria are met for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the quality assurance certificate (certificate of analysis, CoA), which is available via the QR code on the test kit. As the absorbance values in the laboratory may differ from those stated on the certificate, it is recommended to compare the ratios of the standards to each other with those on the certificate. For this purpose, the B/B_{max} values (the ratio of the absorbance values of the standards to the highest standard) are compared with each other. In the current test run, these should be similar to the ratios of the standards on the certificate.

The test is calibrated against gluten. The result therefore indicates the amount of gluten in mg per kg of food (**gluten in mg/kg**).

When working according to these instructions for use, the samples are diluted 1:500 during extraction and ELISA procedure. The sample dilution factor of 500 is already considered in the concentration data of the standards (see chapter 4*). The concentration of gluten protein in the sample can therefore be read directly from the standard curve.

The assay can also be evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET Food & Feed software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not consistent with the standards EN 15633-1 and EN 15842. It should be

noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

12. Result interpretation

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 gluten contamination.

Results between LoD (Limit of Detection) and LoQ (Limit of Quantification) indicate a low gluten concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision ($CV < 30\%$). However, values in this range are generally subject to greater uncertainty due to the higher fluctuation range of the test. If the precision of the test has not been validated with a specific sample matrix, therefore, results below the measuring range should not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the current validation report.

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

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. $\pm 1\%$.

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.

By using 60 % ethanol during extraction, unspecific reactions with soy are suppressed. However, a soy drink used during the assay's validation showed a non-specific reaction with the system of approx. 4 mg/kg gluten. This non-specific reaction can be suppressed below standard 1 by using 70 % ethanol. For investigation of soy drinks, extraction with 70 % ethanol instead of 60 % ethanol is therefore recommended.

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 used antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as the actual analyte. Therefore, cross reactivities may also appear after food processing in single case or are lost.

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

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

The main epitope of the R5 antibody is the amino acid sequence QQFPF which is part of many celiac-toxic sequences. The sequence occurs repeatedly in the

prolamins from wheat, rye and barley. However, rye and barley contain a higher number of replicates of this sequence, which leads to an overestimation of rye and barley compared to the wheat standard.

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).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Gluten-free and gluten-containing (spiked) samples should be used (e.g. Art. No. R7012).
- To do spike experiments to ensure an accurate and correct test procedure. An example of a spiking experiment is given in the validation report.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjustment of the sample's pH value to neutral (pH 6.5 to 7.5) prior to extraction may be necessary.
- To perform a PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- During the production of foods such as beer or sourdough, proteins are fragmented. In sandwich ELISAs, **protein fragments** lead to a reduced recovery. Such samples should be analyzed with a competitive ELISA like the **RIDASCREEN® Gliadin competitive** (Art. No. R7021).
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

Further application notes are available on request.

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., Dubois, T., Weiss, T., Zimmermann, L., Schinabeck, T. M., Loos-Theisen, S. & Scherz, K. (2022). Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01, J. AOAC Int (publication in progress).
- [2] Schall, E., Scherf, K.A., Bugyi, Z., Hajas, L., Török, K., Koehler, P., Poms, R.E., D'Amico, S., Schoenlechner, R., & Tömösközi, S. (2020). Characterisation and comparison of selected wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their blends to develop a gluten reference material. Food Chem. 313, 126049.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126049>.
- [3] Wieser, H., Koehler, P. & Konitzer, K. (2014). Celiac Disease and Gluten: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. Elsevier Inc. Amsterdam, ISBN 978-0-12-420220-7, page 107.
- [4] Wieser, H. & Koehler, P. (2009). Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? Eur. Food Res. Technol. 229, 9-13.

Version overview

Version number	Chapter and title
2024-08-27	Release version

Explanation of symbols

General symbols:

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

Patent Marking:

The extraction means in this product contains sulfite. Food inspection methods using a sulfite-containing extractant as in this product and/or corresponding detection kits are subject to the following patents of MORINAGA & Co., Ltd.: European Patent EP 2 224 239 B1, Australian Patent AU 2008 330 507 B2, United States Patent US 8 859 212 B2, Japanese Patent JP 5 451 854 B2. The patent holder has granted R-Biopharm AG a license to use, and sell products that employ, said protected technology in the above-mentioned territories.

Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code (“BGB”) R-Biopharm AG provides a limited warranty (“Gewährleistung”) against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.
ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm’s own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
 - a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
 - b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
 - c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
 - d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG’s liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG’s sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser’s expenses, losses, or damages from loss of good will, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements (“Gewährleistung”) implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpretation is not intended.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

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

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,

Dr. Frank Vitzthum

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321