



RIDASCREEN[®] Gliadin competitive

REF R7021

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Peptidfragmenten der Gliadine und verwandten Proteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of peptide fragments of gliadins and corresponding proteins

**Approved as AOAC Official Method of Analysis (OMA)
Final Action Status 2015.05**

In vitro Test

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolamin-Peptidfragmenten aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1. Verwendungszweck).

Der R7021 RIDASCREEN® Gliadin competitive ist:

- offizielle AACCI Methode (38-55.01) für Bier, Stärkesirup und Sauerteig
- geprüfte AOAC Official Method of Analysis (AOAC-OMA) Final Action Status (2015.05)
- geprüfte ASBC Methode (Beer-49)

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Das Testkit ist ausreichend für maximal 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren und extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben).....ca. 30 min
Testdurchführung (Inkubationszeit).....40 min

Standardmaterial: Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist ein Hydrolysat (Gemisch aus Weizen, Roggen, Gerste; Gessendorf et al. (2009) Anal Bioanal Chem, 395: 1721-1728)

Nachweisgrenze: 2,3 mg/kg Gliadin bzw. 4,6 mg/kg Gluten*
(Matrix-abhängig) 1,9 - 2,6 mg/kg Gliadin
*Mittelwert

Bestimmungsgrenze: 5 mg/kg Gliadin bzw. 10 mg/kg Gluten

Spezifität: Der monoklonale R5 Antikörper erkennt potentiell toxische Peptid-Sequenzen der Gliadine aus Weizen und der verwandten Prolamine aus Roggen und Gerste. 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. 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 oder gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Gliadin / Gluten

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001)
RIDASCREEN® Total Gluten (Art. Nr. R7041)
RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. Nr. R7051)
RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)
RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003, R7004, R7005)
RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098)
Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006, R7016)
RIDA® Cocktail ECO (Art. Nr. R7080)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. Nr. R7012)
SureFood® ALLERGEN (real-time PCR) Gluten (Art. Nr. S3106)
SureFood® ALLERGEN QUANT (real-time PCR) Gluten (Art. Nr. S3206)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaminpeptidfragmenten aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in fermentierten oder hydrolysierten Lebensmitteln, die als "glutenfrei" deklariert sind. Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden im Rahmen der Testentwicklung folgende Proben repräsentativ für verschiedene Produktgruppen untersucht: glutenfreies Bier, Reiskorn, Maismehl, Sauerteig und Zuckerrübensirup. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist, dies ist vom Anwender vor Anwendung des Testkits auf diese Produktkategorie zu überprüfen.

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

2. Allgemeines

Weizenmehl und Gluten werden häufig in Nahrungsmitteln eingesetzt, um z. B. die Textur, das Zurückhalten von Feuchte und den Geschmack zu verbessern. Als Gluten bezeichnet man das Proteingemisch aus Prolaminen und Glutelinen, welches in Weizen, Roggen und Gerste vorkommt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führen kann. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

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

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

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

Bei der Lebensmittelverarbeitung, wie z. B. Fermentation oder Hydrolyse, werden intakte Prolamin-Moleküle teilweise oder vollständig zu Peptidfragmenten abgebaut. Diese können aber auch weiterhin für Zöliakiepatienten gefährlich sein.

Einzelne, kleine Peptidsequenzen (Motifs) können im Sandwich-Format nicht mehr erfasst werden, da mindestens zwei Epitope für einen Sandwich-ELISA notwendig sind. Dagegen können mit dem kompetitiven Format auch Peptidfragmente mit einem Epitop erfasst werden.

Für das Standardmaterial im RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) wurden Weizen, Roggen und Gerste durch Pepsin und Trypsin verdaut, die Peptidfragmente nach Proteinbestimmung gemischt und lyophilisiert. Der Proteingehalt wurde nach Dumas bestimmt. Das Testergebnis kann daher auf die Prolaminkonzentration und somit auf die im Codex Alimentarius festgelegten Grenzwerte bezogen werden. Das Ergebnis wird in mg/kg (ppm) Gliadin angegeben. Der Hydrolysestandard wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Köhler (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) hergestellt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Gliadin beschichtet. Zugegeben werden Standards (Hydrolysatgemisch aus Weizen, Roggen und Gerste) bzw. Proben und eine Peroxidase gekoppelte anti-Gliadin-Antikörper-Lösung (Konjugat mit monoklonalem R5-Antikörper). Freies und immobilisiertes Gliadin konkurrieren um die Gliadin-Antikörper-Bindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundener Enzym-markierter Antikörper wird anschließend in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe und Inkubation der Substrat/Chromogen-Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterstreifen. Das gebundene Enzymkonjugat 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 umgekehrt proportional zur Gliadin bzw. Prolamin-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen und als ng/ml Gliadin angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	Weiß	Konzentrat	5x	60 ml
Standard 1* Standard 1	Transparent	Gebrauchsfertig	0 ng/ml	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	Transparent	Gebrauchsfertig	10,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	Transparent	Gebrauchsfertig	30,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	Transparent	Gebrauchsfertig	90,0 ng/ml	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	Transparent	Gebrauchsfertig	270,0 ng/ml	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	Braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	Rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	Braun	Gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	Gelb	Gebrauchsfertig		14 ml

*Die Standards enthalten ein Hydrolysat aus Weizen-, Roggen- und Gerstenprolaminen. Abweichend vom AOAC OMA Approval 2015.05 sind die Konzentrationen der Standards in Gliadin angegeben. Für die Umrechnung von Gliadin in Gluten, wird der Faktor 2 verwendet (Definition Codex Alimentarius).

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
- Reagenzröhrchen
- Schüttler / Rotator
- 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
- Für die Extraktion von Proben wie z. B. Stärke und Sirup wird eine 60%ige Ethanollösung benötigt: d.h. 150 ml Ethanol p.a. mit 100 ml dest. Wasser gut mischen
- Zur Extraktion von polyphenolhaltigen Proben (z. B. Bier, Hopfen): flüssige Fischgelatine (Serva, Art. Nr. 22156 oder Sigma, Art. Nr. G-7765, beide 45 % Feststoffanteil)
- 1 M Natriumhydroxidlösung

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.

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

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

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

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

9. Probenvorbereitung

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

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich mit 60 % Ethanol reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA®QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003, R7004, R7005) auf Gliadinkontamination prüfen.

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

Für die Extraktion von Proben wie z. B. Stärke und Sirup wird eine **60%ige Ethanollösung** benötigt: Dafür z. B. 150 ml Ethanol p.a. mit 100 ml destilliertem Wasser gut vermischen.

Für die Extraktion von polyphenolhaltigen Proben (z. B. Bier, Malz, Hopfen) muss eine Ethanollösung (**60 %**) hergestellt werden, die **10 %** flüssige Fischgelatine enthält (**Fischgelatine-Ethanollösung**). Dafür müssen z. B. 30 ml dest. Wasser in einen 100 ml Messzylinder gefüllt werden. 10 g flüssige Fischgelatine zugeben und gut verrühren. 60 ml Ethanol p.a. zugeben und gut mischen. Den pH-Wert mit einer pH Elektrode und 1 M NaOH-Lösung auf 8,5 einstellen und mit dest. Wasser bis auf 100 ml auffüllen. Die Fischgelatine löst sich nicht komplett in 60 % Ethanol, sondern verbleibt als Suspension. Daher die benötigte Menge für die Probenaufarbeitung unter Rühren entnehmen. Die Fischgelatine-Ethanollösung hat eine Haltbarkeit von 2 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C).

9.1. Extraktion

In dem RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) können nur Proben eingesetzt werden, die mit der Ethanol-Extraktion aufgearbeitet wurden (der Cocktail (patented) sollte nicht verwendet werden).

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

- **Feste Lebensmittel (z. B. Stärke, Stärkesirup):** 1 g der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 10 ml 60 % Ethanollösung (siehe Kapitel 5.2.) versetzen und das Gefäß verschließen.
- **Polyphenolhaltige feste Lebensmittel (z. B. Hopfen und Malz):** 1 g der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 10 ml 60 % Ethanollösung, die 10 % flüssige Fischgelatine enthält (siehe Kapitel 9.), versetzen und das Gefäß verschließen.
- **Flüssige Lebensmittel (z. B. Sojasauce):** 1 ml der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 9 ml 60 % Ethanollösung (siehe Kapitel 9.) mischen, das Gefäß verschließen und gut mischen.
- **Bier:** 1 ml der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen, mit 9 ml 60 % Ethanollösung, die 10 % flüssige Fischgelatine enthält (siehe Kapitel 9.), versetzen und das Gefäß verschließen.

Bitte alle Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- Mindestens 30 Sekunden gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Weitere 10 min über Kopf schütteln oder rotieren auf einem Rotator.
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2.500 x g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zentrifugieren.
(Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x g zentrifugieren).
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Der Extrakt (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) kann bis zur Verwendung im Test unverdünnt in einem gut verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln (Haltbarkeit ca. 4 Wochen) aufbewahrt werden.
- Die hergestellten Extrakte (Überstand des Zentrifugationsschritts bzw. das Filtrat) müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit verdünntem Puffer verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2.).

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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

Das **Konjugat (Antikörper Enzym Konjugat)** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit dest. Wasser mischen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 1 ml dest. Wasser + 100 µl Konzentrat, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen). Es ist darauf zu achten, dass das Wasser nicht mit Gliadin kontaminiert ist.

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vor der Verdünnung durch Erwärmen (Wasserbad 37 °C) zu lösen. Anschließend das Konzentrat gut mischen. Das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Konzentrat). Der verdünnte Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei Raumtemperatur (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 1:50 (1+49) mit verdünntem Puffer (siehe Kapitel 10.1. Testvorbereitung) verdünnt werden (z. B. 980 µl verdünnter Puffer + 20 µl Probe).

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

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 in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 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.
3. Je 50 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1.) in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. 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).
5. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen (brauner Verschluss) in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.

6. 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 10 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 (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich. Die Auswertung kann mittels 4-Parameter- oder Cubic-Spline-Funktion erfolgen. Eine einmal gewählte Auswertemethode sollte beibehalten und nicht zwischen den beiden Funktionen gewechselt werden. Aufgrund der verwendeten Mathematik kann mittels Cubic-Spline-Funktion keine Konzentration außerhalb des Messbereichs ($<$ Standard 2 bzw. $>$ Standard 5) berechnet werden. Die 4-Parameter-Funktion ermöglicht auch die Berechnung von Werten zwischen Standard 1 und Standard 2 (siehe auch Kapitel 13. Grenzen der Methode).

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

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

12. Interpretation der Ergebnisse

Die Gliadinkonzentration in ng/ml, die aus der Standardkurve abgelesen wird, muss weiter mit dem Verdünnungsfaktor von 500 multipliziert werden. Dieser Faktor von 500 ist bereits in der RIDASOFT® Win.NET Software voreingestellt.

Bei der RIDASOFT® Win.NET Software (ab Version 1.93) wird das Testergebnis in mg/kg Gliadin und in mg/kg Gluten angegeben. Insgesamt werden Gliadin, Secalin und Hordein vom R5 Antikörper erfasst.

Rechenbeispiel

Aus der Standardkurve werden 50 ng/ml (ppb) Gliadin abgelesen. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 500, erhält man 25000 ng/ml Gliadin (entsprechend 25 mg/kg (ppm) Gliadin). Um den Glutengehalt zu berechnen, muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Dies ergibt eine Konzentration von 50 mg/kg Gluten.

Für die Umrechnung von Gliadin in Gluten wird der Faktor 2 verwendet (Definition Codex Alimentarius). Dieser Faktor ist jedoch stark abhängig von der zu analysierenden Probe, insbesondere bei Stärken (je nach Auswaschungsgrad werden Gluteline aufkonzentriert; in diesem Fall ist der Faktor größer 2 und die Glutenkonzentration entsprechend höher).

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. Stärke, 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 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 Lebensmittelmatrixen 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 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 im Tests verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln auch erst in Erscheinung treten oder aber verloren gehen.

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.

Hitzebehandelte Proben, die mit Ethanol extrahiert werden, können eine reduzierte Wiederfindung zeigen. Deshalb sollten hitzebehandelte Proben mit dem Cocktail (patented) extrahiert und anschließend im Sandwich-ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001) analysiert werden. Cocktail (patented) Extrakte können jedoch nicht im kompetitiven ELISA analysiert werden. Daher kann aufgrund der ethanolischen Extraktion im RIDASCREEN® Gliadin competitive ELISA bei erhitzten Proben eine Unterbestimmung vorliegen. Im Sandwich-ELISA RIDASCREEN® Gliadin hingegen kann wegen der Hydrolyse der Probe eine Unterbestimmung vorliegen. Proben, die sowohl hitzebehandelt als auch hydrolysiert sind, stellen demnach eine besondere analytische Herausforderung dar. In diesen Fällen wird die Analyse in beiden ELISA empfohlen. Aufgrund dieser Problematik sind die Ergebnisse beider Tests vorsichtig zu interpretieren und aus Risikogesichtspunkten sollte der höhere Wert verwendet werden.

Die untenstehende Tabelle zeigt die Schwankungsbreite bei der Analyse von hydrolisierten Proben (weitere Ergebnisse zur Leistungsfähigkeit der Methode sind publiziert bei J. AOAC. Int. 98:1346-1354, 2015).

Symbol	Beer			Starch syrup		Sourdough	
	gluten-free	15 mg/kg prolamin	50 mg/kg prolamin	gluten-free	naturally contaminated	35 mg/kg prolamin	75 mg/kg prolamin
Total number of laboratories	13	12	11	13	13	13	13
Total number of replicates	26	24	22	26	26	26	26
Overall mean	1.2	13.1	59.7	0.7	5.3	24.2	72.8
Recovery (%)		87	119			69	97
Repeatability SD* s(r) (mg/kg)	1.2	4.0	18.6	1.0	0.9	5.6	14.2
Reproducibility SD* s(R) (mg/kg)	1.5	4.8	18.6	1.5	1.8	6.3	20.0
Repeatability rel. SD* (%) RSD(r)	97.9	30.2	31.2	157.2	16.3	23.1	19.5
Reproducibility rel. SD* (%) RSD(R)	126.1	36.9	31.2	236.1	34.4	25.9	27.5
Horrat value	8.1	3.4	3.6	13.8	2.8	2.6	3.3

Der Pepsin / Trypsin Verdau, der als Kalibrator in diesem Test verwendet wird, ist nicht für alle Hydrolyse-Prozesse repräsentativ. Es wird empfohlen, dass Anwender die Leistungsfähigkeit der Methode für ihre spezifischen Prozesse bestätigen.

Der Test kann möglicherweise nicht alle fermentierten und / oder hydrolysierten Formen von Gluten messen oder erkennen. Bei der Hydrolyse können auch größere Bruchstücke ohne Epitop für den verwendeten R5 Antikörper entstehen, die möglicherweise eine Gefahr für Zöliakie-Patienten darstellen.

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.
- Zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR (z. B. SureFood®) durchzuführen.
- Bei der Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt® / Bolt™) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

15. Weitere Applikationen

- Analyse von Gluten oder β -Lactoglobulin in ergänzenden Enzymen und unprozessierten Lebensmittel, die diese enthalten.
- Empfindlichere Analyse mit RIDASCREEN® Gliadin competitive.

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2016-09-21	Freigabeversion
2021-07-01	– Generelle Sprachliche Überarbeitung – Kapitel 1, 6, 8, 11, 12, 13, 14
2022-05-06	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: – Kapitel 10.2. Testdurchführung: Fehler aus Version 2021-07-01 mit „insgesamt vier Waschzyklen“ wieder zurück auf „insgesamt drei Waschzyklen“ korrigiert

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® Gliadin competitive

Brief information

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of prolamine peptide fragments from wheat (gliadin), rye (secalin) and barley (hordein) in foods validated for the method (see chapter 1. Intended use).

Der R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin competitive is:

- official AACCI method (38-55.01) for beer, starch syrup and sourdough
- validated AOAC official method of analysis (AOAC-OMA) Final Action Status (2015.05)
- validated ASBC method (Beer-49)

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. 30 min
test implementation (incubation time).....40 min

Standard material: The RIDASCREEN® standard material is a hydrolysate (mixture of wheat, rye and barley; Gessendorf et al. (2009) Anal Bioanal Chem, 395: 1721-1728)

Limit of detection: 2.3 mg/kg (ppm) Gliadin* or to 4.6 mg/kg (ppm) Gluten*
(matrix-dependent) 1.9 - 2.6 mg/kg (ppm) Gliadin
*mean value

Limit of quantification: 5 mg/kg (ppm) Gliadin or to 10 mg/kg (ppm) Gluten

Specificity: The R5 monoclonal antibody recognizes potentially toxic peptide sequences of gliadins from wheat and related prolamins from rye and barley. 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 spiking 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 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 products for gluten / gliadin determination

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001)

RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041)

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

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003, R7004, R7005)

RIDA® Extraction Solution (Art. No. R7098)

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

RIDA® Cocktail ECO (Art. No. R7080)

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

SureFood® ALLERGEN (real-time PCR) Gluten (Art. No. S3106)

SureFood® ALLERGEN QUANT (real-time PCR) Gluten (Art. No. S3206)

1. Intended use

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) is a competitive enzyme immunoassay test developed for the quantitative determination of prolamine peptide fragments from wheat (gliadin), rye (secalin) and barley (hordein) in fermented or hydrolysed food, which are declared as “gluten-free”. Due to the large number of different food products, the following samples were examined as representative for different food product categories within the scope of the test development: gluten-free beer, rice beer, maize flour, sourdough and sugar beet syrup. It can be assumed that the assay is also suitable for the analysis of other foods, however, this must be verified by the user before applying the test kit to that food category.

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

2. General

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common to improve e.g. texture, moisture retention and flavour. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley. Coeliac disease is a permanent intolerance to gluten that results in damage of 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 exist:

- 1) Food products, which contain less than 20 mg/kg (ppm), 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 (ppm).

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).

During food processing like e.g. fermentation or hydrolysis intact prolamin molecules are partly or completely degraded to small peptide fragments. However, these can still be dangerous for celiac patients.

Single, small peptide sequences (motifs) cannot be detected by a sandwich ELISA format, because at least two epitopes are necessary for a sandwich ELISA. In contrast, the competitive format can also be used to detect peptide fragments with one epitope.

For the standard material used in the RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) wheat, rye and barley were digested by pepsin and trypsin, the peptide fragments were mixed and lyophilized after protein determination. The protein content was determined according to Dumas. The assay can be related to the prolamin concentration and therefore to the limit values stipulated by the Codex Alimentarius. The result is expressed in mg/kg gliadin. The hydrolyzed standard was produced by the working group of Prof. Dr. Köhler (German Research Centre for Food Chemistry).

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with gliadin. Standards (hydrolysate mixture of wheat, rye and barley), respectively sample solutions and peroxidase labeled anti-gliadin antibodies (conjugate with monoclonal R5-antibodies) are added. Free and immobilized gliadin compete for the gliadin antibody-binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed by a washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution which is inversely proportional to the gliadin respectively prolamin concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm and expressed as ng/ml (ppb) gliadin.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Buffer	White	Concentrate	5x	60 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 ng/ml	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	10.0 ng/ml	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	30.0 ng/ml	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	90.0 ng/ml	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	270.0 ng/ml	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*The standards contain a hydrolysate of wheat, rye and barley prolamins. Contrary to the AOAC-OMA Approval 2015.05, the concentrations of the standards are given in gliadin. To convert gliadin into gluten the factor of 2 used (definition Codex Alimentarius).

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
- Vials
- Shaker / rotator
- 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
- For the extraction of samples like starch and syrup, a 60 % ethanol solution is required: transfer e.g. 150 ml ethanol p.a. with 100 ml distilled water and mix well
- For extraction of polyphenol containing samples (e.g. beer, malt, hops): liquid fish gelatine (Serva, Art. No. 22156 or Sigma, Art. No. G-7765, both 45 % solids content)
- 1 M sodium hydroxide solution

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 microtiter strips (coated microtiter 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 and pre-flush the tip before pipetting standard or sample extract.

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The 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 the standard 1

9. Preparation of Samples

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne grain dust and unclean laboratory equipment can lead to gliadin contamination in the test. Therefore, please notice the following recommendations:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation with 60 % ethanol.
- 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 (Art. No. R7003, R7004, R7005).

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

For the extraction of samples like starch and syrup, a **60 % ethanol solution** is required. For this purpose, add e.g. 150 ml ethanol p.a. to 100 ml dist. water and mix well.

For the extraction of polyphenol containing samples like beer, malt and hops, an ethanol solution (60 %) containing 10 % liquid fish gelatin is required (**fish gelatin ethanol solution**) must be prepared. For this purpose, fill e.g. 30 ml dist. water in a 100 ml graduated cylinder. Add 10 g of liquid fish gelatin and mix well. Add 60 ml ethanol p.a. and mix well. Adjust the pH value to 8.5 with a pH electrode and 1M NaOH solution and fill up to 100 ml with dist. water. The fish gelatin cannot be dissolve completely in 60 % ethanol but remains as a suspension. Therefore, take the required volume for the sample preparation while stirring. The fish gelatin ethanol solution can be stored for 2 weeks at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

9.1. Extraction

For the RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) only samples extracted with ethanol should be tested (the Cocktail (patented) should not be used).

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

- **Solid food (e.g. starch and starch syrup):** transfer 1 g of homogenized sample to a new vial, add 10 ml 60 % ethanol solution (see chapter 9.) and mix well.
- **Polyphenol-containing solid food (e.g. malt and hops):** transfer 1 g of homogenized sample, add 10 ml 60 % ethanol solution, containing 10 % liquid fish gelatin (see chapter 9.) and mix well.
- **Liquid food (e.g. soy sauce):** mix well 1 ml of the homogenized sample with 9 ml 60 % ethanol solution (see chapter 9.).
- **Beer:** mix well 1 ml of the homogenized sample with 9 ml 60 % ethanol solution, containing 10 % liquid fish gelatin (see chapter 9.).

Please further extract all samples as described in the following:

- Mix vigorously for at least 30 sec (e.g. vortexer).
- Shake well up side down or rotate on a rotator for further 10 min.
- Filter sample or centrifuge for 10 min at $> 2,500 \times g$; if possible 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 ($> 10,000 \times g$) for 10 min in a microcentrifuge).
- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extract (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. 4 weeks) until used in the test.
- For use in the test, extracts (supernatant from centrifugation step or filtrate) must be diluted with diluted buffer (for dilution see chapter 10.2.).

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The yellow stained **buffer** is provided as a 5fold concentrate. On the day of test performance, the required aliquot must be diluted 1:5 (1+4) with dist. water (i.e. 12 ml dist. water + 3 ml concentrate, sufficient for the dilution of 10 samples). The diluted buffer is stable for 1 day. Make sure, that the buffer is not contaminated with gliadin from the sample.

The **conjugate (antibody enzyme conjugate)** (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the antibody solution should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in dist. water (e.g. 1 ml dist. water + 100 µl conjugate concentrate, sufficient for 2 microtiter strips). Take care, that the water is not contaminated with gliadin.

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer concentrate has to be diluted 1:10 (1+9) with dist. water (e.g. 900 ml dist. water + 100 ml buffer concentrate). Prior dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath 37 °C (99 °F). The diluted wash buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks.

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

10.2. Test procedure

The prepared extracts prepared must be diluted 1:50 (1+49) with diluted buffer (see chapter 10.1. Test preparation) before usage (e.g. 980 µl diluted buffer + 20 µl sample).

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

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. Add 50 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.
3. Add 50 µl of the diluted conjugate (see chapter 10.1.) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. 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).
5. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. Add 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 10 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

A special software, **RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the 4-parameter or cubic spline function. Once an evaluation method has been selected, it should be retained and not be switched between the two functions. Due to its mathematical background, the cubic spline function cannot calculate concentrations outside the measuring range (< standard 2 and > standard 5). The 4-parameter function enables the calculation of values between standard 1 and standard 2 (refer to chapter 13. Limits of the method).

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

The assay can be also evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not consistent with standards like EN 15633-1 and EN 15842. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

12. Result Interpretation

The gliadin concentration in ng/ml is read from the standard curve and must be further multiplied by the dilution factor of 500. This factor of 500 is set by default in the RIDASOFT® Win.NET software.

The RIDASOFT® Win.NET software (Version 1.93 or newer) indicates the results in gliadin and gluten. The R5 antibody detects gliadin, secalin and hordein.

Calculation example:

From the standard curve, a concentration of 50 ng/ml (ppb) gliadin is obtained. Multiplying by the recommended dilution factor 500 leads to 25000 ng/kg gliadin, corresponding to 25 mg/kg (ppm) gliadin. To calculate the gluten content, it is necessary to multiply by factor 2, which results in 50 mg/kg (ppm) gluten.

To convert gliadin into gluten the factor of 2 is used (definition Codex Alimentarius). This factor depends strongly on the analyzed sample, especially washed starches may contain a higher proportion of glutelins. In this case, the factor is bigger than 2 and the gluten concentration accordingly higher.

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 cereal components, such as starch, 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 ± 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 spiking 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.

Heat-treated samples extracted with ethanol may show reduced recovery. For such samples, the extraction should be carried out with Cocktail (patented) followed by analysis in the sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001). However, Cocktail (patented) extracts cannot be analyzed in the competitive ELISA. Therefore, due to the ethanolic extraction in the RIDASCREEN® Gliadin competitive ELISA, there may be an under-determination in heated samples. In the Sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin, on the other hand, under-determination may be present due to hydrolysis of the sample. Samples that are both heat-treated and hydrolyzed thus pose a particular analytical challenge. In these cases, analysis in both ELISA is recommended. Due to this problem, the results of both tests should be interpreted cautiously and from a risk perspective, the higher value should be used.

The table below shows the range of variation for the analysis of hydrolyzed samples (further method performance results are published in J. AOAC. Int. 98:1346-1354, 2015):

Symbol	Beer			Starch syrup		Sourdough	
	gluten-free	15 mg/kg prolamin	50 mg/kg prolamin	gluten-free	naturally contaminated	35 mg/kg prolamin	75 mg/kg prolamin
Total number of laboratories	13	12	11	13	13	13	13
Total number of replicates	26	24	22	26	26	26	26
Overall mean	1.2	13.1	59.7	0.7	5.3	24.2	72.8
Recovery (%)		87	119			69	97
Repeatability SD* s(r) (mg/kg)	1.2	4.0	18.6	1.0	0.9	5.6	14.2
Reproducibility SD* s(R) (mg/kg)	1.5	4.8	18.6	1.5	1.8	6.3	20.0
Repeatability rel. SD* (%) RSD(r)	97.9	30.2	31.2	157.2	16.3	23.1	19.5
Reproducibility rel. SD* (%) RSD(R)	126.1	36.9	31.2	236.1	34.4	25.9	27.5
Horrat value	8.1	3.4	3.6	13.8	2.8	2.6	3.3

The pepsin / trypsin digest used as a calibrator in this assay does not represent all hydrolysis processes. It is recommended, that users confirm method performance for their specific processes.

The test may not measure or detect all fermented and / or hydrolyzed forms of gluten. Hydrolysis may also produce larger fragments without an epitope for the R5 antibody used, which may pose a risk to celiac patients.

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 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, adjust the sample's pH value (pH 6.5 to 7.5) to neutral prior to extraction may be necessary.
- To perform a PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the results.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt® / Bolt™) are used.

15. Further application notes

- Analysis of gluten or β -lactoglobulin in supplemental enzymes and unprocessed food containing them.
- More sensitive analysis with RIDASCREEN® Gliadin competitive.

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

Version overview

Version number	Chapter and title
2016-09-21	Release version
2021-07-01	<ul style="list-style-type: none">– General linguistic revision– Chapter 1, 6, 8, 11, 12, 13, 14
2022-05-06	Current version Changes made: <ul style="list-style-type: none">– Chapter 10.2. test procedure: Mistake from version 2021-07-01 with "total of four wash cycles" corrected back to "total of three wash cycles"

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),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321