

RIDASCREEN[®] Gliadin

Art. No. R7001

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa dei frammenti peptidici delle gliadine e delle prolamine corrispondenti



Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Per informazioni:

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Ordini

(0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA[®] e RIDASCREEN[®]
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN[®] Gliadin

Introduzione

RIDASCREEN[®] Gliadin (Art. No. R7001) è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di prolamine di frumento (gliadina), segale (secalina) e orzo (ordeina) negli alimenti dichiarati privi di glutine.

Il kit ELISA R5 RIDASCREEN[®] Gliadin è:

- riconosciuto come AOAC-OMA (2012.01) e AACCI 38.50.01
- certificato da AOAC-RI (120601)
- metodo ufficiale (tipo 1) del Codex Alimentarius.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio immunoenzimatico - inclusi gli standard - sono contenuti nel kit. Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard). Per la quantificazione è richiesto un lettore colorimetrico per micropiastra.

Preparazione campioni: omogeneizzazione ed estrazione

Materiale standard: Il materiale standard RIDASCREEN[®] è calibrato per lo standard del Prolamin Working Group.

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni).....ca. 2h
esecuzione del test (tempo d'incubazione)..1h e 30min

Limite di rilevabilità: 0.5 mg/kg (ppm) di gliadina corrispondenti a 1 mg/kg (ppm) di glutine

Limite di quantificazione: 2.5 mg/kg (ppm) di gliadina, corrispondenti a 5 mg/kg (ppm) di glutine

Specificità: L'anticorpo monoclonale R5 reagisce con le frazioni di gliadina del frumento e con le prolamine correlate di segale e orzo.

La cross-reattività degli anticorpi utilizzati è stata determinata per le materie prime (ad esempio, farina di mais). In alimenti composti o trattati (ad esempio il pane di

mais) le cross-reattività potrebbero essere diverse. Le sostanze interferenti (ad esempio polifenoli) possono essere rilevate con prove di contaminazione.

Al fine di aumentare la qualità della valutazione durante l'esecuzione di metodi ELISA, è disponibile la nostra guida Good ELISA Practice (GEP) che elenca gli standard minimi e le procedure concernenti le condizioni generali di utilizzo dei kit per analisi di R-Biopharm AG e di esecuzione dei test ELISA. Il manuale può essere recuperato, stampato e scaricato dal sito web <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Articoli correlati

RIDASCREEN® FAST Gliadin (Art. Nr.: R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr.: R7021)

Cocktail Solution (brevettata) (R7006/R7016)

RIDA® Extraction Solution (incolore) (R7098)

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

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

SureFood® Allergen QUANT Gluten (S3206)

SureFood® Allergen Gluten (S3106)

1. Scopo

RIDASCREEN® Gliadin è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle contaminazioni di prolamine da frumento (gliadine), segale (secalina), e orzo (ordeina) in prodotti grezzi come le farine (grano saraceno, riso, mais, avena, teff) e le spezie nonché in alimenti trasformati quali tagliatelle, prodotti pronti, prodotti da forno, salumi, bevande e gelati.

Tutti i campioni dovrebbero essere estratti con la Cocktail Solution (brevettata) (Art. No. R7006/R7016, metodo ufficiale R5-Mendez).

2. Generale

L'utilizzo di farina di frumento e di glutine negli alimenti è estremamente comune, a causa della stabilità termica di questi ingredienti e agli utili effetti da essi esercitati sulla consistenza, la ritenzione dell'umidità e il sapore. Il glutine è una miscela di prolamine e gluteline presente in frumento, segale e orzo.

La celiachia è un'intolleranza permanente al glutine che causa danni all'intestino tenue ma è reversibile se il glutine viene eliminato dalla dieta.

Secondo il Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979), in base al contenuto di glutine, esistono attualmente due categorie di etichettatura dei prodotti alimentari:

1. Alimenti che contengono meno di 20 mg/kg possono essere etichettati come " **privi di glutine** ".
2. Alimenti " **a basso contenuto di glutine** " possono avere un contenuto di glutine da 20 fino a 100 mg/kg.

3. Principio

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono coattati con anticorpi specifici R5 anti-gliadine. Aggiungendo gli standard e le soluzioni campione nei pozzetti, la gliadina presente viene immobilizzata dagli anticorpi specifici di cattura. Ne risulta un complesso antigene-anticorpo. I componenti dei campioni non legati dagli anticorpi vengono rimossi durante il lavaggio. Viene quindi aggiunto l'anticorpo coniugato R5 con perossidasi. Questo anticorpo coniugato si lega al complesso antigene-anticorpo, dando luogo alla formazione di un complesso anticorpo-antigene-anticorpo (sandwich). L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Successivamente vengono aggiunti ai pozzetti ed incubati il substrato enzimatico (urea-perossidasi) e il cromogeno (tetrametilbenzidina). L'enzima coniugato legato converte il cromogeno incolore in un prodotto blu. L'aggiunta dello stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di gliadina nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 analisi (incluse le analisi degli standard). In particolare:

Componente	Colore Tappo	Formato		Volume
Micropiastra	-	Pronta all'uso		96 pozzetti
Soluzione Tampone	Bianco	Concentrato	5x	60 ml
Standard 1	Trasparente	Pronto all'uso	0 ng/ml gliadina	1.3 ml
Standard 2	Trasparente	Pronto all'uso	5 ng/ml gliadina	1.3 ml
Standard 3	Trasparente	Pronto all'uso	10 ng/ml gliadina	1.3 ml
Standard 4	Trasparente	Pronto all'uso	20 ng/ml gliadina	1.3 ml
Standard 5	Trasparente	Pronto all'uso	40 ng/ml gliadina	1.3 ml
Standard 6	Trasparente	Pronto all'uso	80 ng/ml gliadina	1.3 ml
Tampone di lavaggio	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Coniugato	Rosso	Concentrato	11x	1.2 ml
Substrato	Verde	Pronto all'uso		7 ml

Cromogeno	Blu	Pronto all'uso		7 ml
Soluzione di stop	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- centrifuga con provette per centrifuga in vetro (es. Brand 10742512)
- agitatore
- macinino da laboratorio, pestello e mortaio, ultra-turrax oppure omogenizzatore
- bagnetto termostato (50°/122°F)
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20-200 µl e 200-1000 µl

5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata
- latte scremato in polvere senza glutine (qualità alimentare)
- **Cocktail Solution (brevettata)** (Art. No. R7006 / R7016, 105 ml / 1000 ml) e **soluzione di etanolo (80%)**: mescolare ad esempio 120 ml di etanolo p.a. con 30 ml di acqua distillata e agitare accuratamente

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite rigorosamente.

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per le informazioni sulla pericolosità delle sostanze contenute, consultare le schede di sicurezza (MSDS) appropriate per questo prodotto, disponibili online all'indirizzo <http://www.r-biopharm.com>

7. Conservazione

Conservare il kit a 2-8°C (35-46°F). Non congelare alcun componente del kit.

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa e conservata a 2-8°C (35 - 46 °F).

Il cromogeno incolore è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità del prodotto decade alla data di scadenza del kit riportata in etichetta.

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione del cromogeno prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori a 0.8 unità di assorbanza ($A_{450\text{nm}} < 0.8$) per lo standard 6

9. Preparazione dei campioni

9.1. Indicazioni preliminari

Polvere di cereale presente nell'aria e attrezzatura da laboratorio sporca possono portare alla contaminazione dell'analisi con gliadina. Pertanto, indossare i guanti durante l'analisi e prima di iniziare il test:

- pulire superfici, contenitori di vetro, macinini e altre attrezzature con etanolo o 2-propanolo al 40% (vedi par. 5.2.)
- eseguire l'estrazione dei campioni in un locale isolato da quello dove verrà svolto il test ELISA
- verificare la contaminazione dei reagenti e dell'attrezzatura con le strips RIDA[®]QUICK Gliadin (cod. R7003/R7004/R7005)
- Si raccomanda di lavorare **sotto cappa chimica**, in quanto la Cocktail Solution (brevettata) contengono β -mercaptoetanololo.
- Il β -mercaptoetanololo può interferire con l'ELISA, diluire pertanto i campioni **almeno 1:500** (si raccomanda una diluizione 1:500 per campioni contenuti circa 20 mg/kg di glutine e una diluizione 1:2500 per campioni contenuti circa 100 mg/kg di glutine).

9.2. Estrazione con cocktail solution (brevettata) (Art. No. R7006/R7016, metodo ufficiale AOAC)

Omogeneizzare bene un quantitativo sufficiente (almeno 5 g o 5 ml) di campione (ridurre in polvere e miscelare accuratamente, oppure miscelare bene la soluzione)

- campioni alimentari liquidi**: pipettare 0.25 ml di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail Solution (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene

- **altri campioni alimentari (ad esempio conteneti soia o quinoa):** pesare 0.25 g di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail Solution (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene
- **campioni alimentari contenenti tannini e polifenolo (ad esempio. cioccolato, caffè, cacao, farina di castagne, grano saraceno, miglio e spezie):** pesare 0.25 g di campione omogeneizzato, aggiungere 0.25 g di latte scremato in polvere e aggiungere 2.5 ml di Cocktail Solution (brevettata), chiudere la provetta e miscelare
- **carne e insaccati:** in queste matrici la gliadina può non essere distribuita in modo uniforme, pesare pertanto 50 g di campione e omogeneizzarli. Pesare 0.25 g di campione omogeneizzato e aggiungere 2.5 ml di Cocktail Solution (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene
- **campioni di avena:** la gliadina può non essere distribuita in modo uniforme, inoltre, questi campioni sono difficili da omogeneizzare. Pertanto omogeneizzare 200g di campione ed eseguire l'estrazione con almeno il quadruplo dei reagenti: pesare 1 g di campione omogeneizzato e aggiungere 10 ml di Cocktail Solution (brevettata), chiudere la provetta e miscelare bene

Continuare quindi l'estrazione di tutti i campioni con la seguente procedura:

- incubare per 40 min a 50 °C (122 °F)
- lasciare raffreddare il campione e poi miscelarlo con 7.5 ml di etanolo all'80% (vedi par. 5.2) (per campioni d'avena: 30 ml di etanolo all'80%)
- chiudere la provetta e agitare per inversione oppure mediante agitatore rotante per 1 ora a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F)
- centrifugare per 10 minuti ad almeno 2500 g e a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) e/o filtrare l'estratto (in alternativa centrifugare ad alta velocità per 10 min 2 ml di estratto in una apposita provetta utilizzando una microcentrifuga)
- trasferire il surnatante in un provetta con tappo a vite
- diluire il campione almeno 1:12.5 (1+11.5 / 80 µl+ 920 µl) con il diluente del campione diluito (vedi par. 10.1.): la diluizione finale è almeno 500
- utilizzare **immediatamente** 100 µl per pozzetto nell'analisi.

Osservazioni:

Il surnatante ottenuto dopo la centrifugazione o il filtrato possono essere conservati in un flacone ben chiuso, al buio e a temperatura ambiente (20 – 25 ° C / 68 – 77 ° F) fino a otto settimane.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) prima dell'uso.

Il **diluente del campione** è fornito concentrato (5X). Diluire 1:5 (1+4) con acqua distillata solamente la quantità necessaria per l'esecuzione del test (esempio 3 ml di concentrato + 12 ml di acqua distillata, sufficiente per la diluizione di 10 campioni). Porre attenzione affinché il diluente non sia contaminato da gliadina

L'**anticorpo coniugato con enzima** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato (11X). Dal momento che l'enzima coniugato ha una stabilità limitata, è consigliabile ricostituire solo la quantità necessaria ad effettuare il test. Prima di pipettare l'enzima, agitarlo accuratamente. Ricostituire l'enzima coniugato diluendolo 1:11 (1+10) con acqua distillata (es. 200 µl di coniugato concentrato + 2 ml di acqua distillata, sufficiente per 2 strips). Porre attenzione affinché l'acqua non sia contaminata da gliadina.

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10X. Prima dell'uso il tampone deve essere diluito 1:10 (1+9) con acqua distillata (ad esempio 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Prima della diluizione sciogliere eventuali cristalli mediante riscaldamento a 37°C (99°F) in un bagnetto termostatico. Il tampone di lavaggio diluito è stabile a 20 – 25 °C (68 – 77 °F) per 4 settimane

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Seguire accuratamente la procedura di lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino tra i vari passaggi operativi.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard e ai campioni.
2. Pipettare 100 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
3. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per 3 volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido. Riempire i pozzetti con 250 µl di soluzione di lavaggio diluita (vedi par. 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte.
4. In ogni pozzetto pipettare 100 µl di enzima coniugato diluito (vedi par. 10.1.) e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per 3 volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido.

Riempire i pozzetti con 250 μ l di soluzione di lavaggio diluita (par. 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte.

6. In ogni pozzetto pipettare 50 μ l di substrato e 50 μ l di cromogeno. Agitare leggermente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Pipettare 100 μ l di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente agitando la piastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per l'elaborazione dei test ELISA RIDASCREEN® è disponibile il software denominato RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996). Il calcolo deve essere fatto per mezzo di una funzione spline cubica.

Il grafico della curva standard è riportato sul Certificato di Controllo di Qualità allegato ad ogni kit. Per il controllo della qualità può essere utilizzato il set di controlli per la gliadina (Art. Nr. R7012).

In accordo al certificato, valori di assorbanza ($A_{450 \text{ nm}}$) più elevati rispetto allo standard zero, possono essere il risultato di un insufficiente lavaggio o di una contaminazione da gliadina.

I campioni con valori di assorbanza ($A_{450 \text{ nm}}$) maggiori dello standard 6 dovrebbero essere diluiti ulteriormente e analizzati nuovamente.

La concentrazione in ng/ml (ppb) di gliadina viene letta dalla curva di calibrazione del software RIDA®SOFT Win e moltiplicata ulteriormente almeno per il fattore di diluizione 500. Tale risultato va ulteriormente moltiplicato per 2 per ottenere la concentrazione di glutine (le gliadine rappresentano in generale il 50% delle proteine presenti nel glutine, Codex Definition). Il RIDA®SOFT Win (versione 1.93 o più recente) indica i risultati in gliadina e glutine.

Esempio:

Il valore di assorbanza di un campione riportato sulla curva di calibrazione corrisponde a 10 ng/ml di gliadina.

Moltiplicando tale valore per il fattore di diluizione 500 si arriva a 5000 ng/ml, corrispondenti a 5 mg/kg (ppm) di gliadina, ovvero allo 0,0005% di gliadina. Per calcolare il contenuto di glutine, moltiplicare ulteriormente per il fattore 2: si ottengono 10 mg/kg di glutine, ovvero lo 0,001% di glutine. Questo campione si può pertanto considerare privo di glutine, perché la concentrazione di glutine è inferiore a 20 mg/kg.

In generale:

I campioni risultati negativi potrebbero ancora contenere una contaminazione di allergene al di sotto del limite di rilevazione del test, o potrebbero contenere altri componenti allergenici come ad esempio lipidi.

A causa del gran numero di tipi di alimenti, non si possono escludere effetti matrice. In alimenti processati (ad esempio il trattamento termico, disidratazione, ecc), le proteine possono essere modificate o frammentate, questo può avere un impatto sul recupero / reattività crociata.

Per la valutazione della reattività crociata è stato analizzato solo un campione di esempio, altri campioni possono fornire un risultato diverso. Tutte le reattività crociate e matrici di esempio analizzate sono descritte nel rapporto di validazione.

Raccomandazioni:

Al fine di assicurare un elevato rendimento analitico:

- Ogni campione deve essere analizzato in duplicato
- Utilizzare anche campioni senza glutine e con glutine (addizionati) come controllo
- A causa del gran numero di tipi di alimenti, non si possono escludere effetti matrice. Per garantire un risultato preciso si consigliano prove di recupero
- Confermare i risultati con PCR (ad esempio SureFood[®] Allergen QUANT Gluten, Art.No. S3201)
- Nella produzione di alimenti come birra o lievito naturale, le proteine sono frammentate. Nei test ELISA a sandwich, frammenti di proteine portano ad un recupero ridotto, tali campioni devono essere analizzati con un test ELISA competitivo come il RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021).
- Per ulteriori informazioni riguardo l'utilizzo dell'automazione ChemWell[®] o GEMINI contattare sales@rbiopharm.de.

Ulteriori note applicative:

- Preparazione del campione per alimenti processati con la RIDA[®] Extraction Solution (incolore) (Codice R7098.) - **Solo dopo validazione.**
- Preparazione delle materie prime con etanolo.
- Preparazione di materie prime contenenti polifenoli (ad esempio cioccolato, caffè, cacao, grano saraceno) con gelatina di pesce ed etanolo.

Il rapporto di validazione contenete ulteriori informazioni è disponibile presso il rivenditore locale o presso R-Biopharm AG.

I dati corrispondono al nostro attuale stato della tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti ed il loro utilizzo. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo di questo prodotto.