



RIDASCREEN® Глиадин

Арт. No. R7001

Иммуноферментный метод для количественного
определения глиадина и родственных проламинов



Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



RIDA® и RIDASCREEN®

являются зарегистрированными торговыми марками R-Biopharm AG.

Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG имеет сертификат ISO 9001.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDASCREEN® Глиадин

Описание

Тест-система Ridascreen® Глиадин (арт. R7001) предназначена для количественного определения проламинов пшеницы (глиадина), ржи (секалина), ячменя (гордеина), конопляного чая и семян конопли методом иммуноферментного анализа в продуктах питания, заявленных как не содержащих глютен.

Тест-набор Ridascreen® Глиадин был исследован институтом международной ассоциации химиков-аналитиков AOAC по программе проверки функционирования методов и сертифицирован с выдачей лицензии AOAC (120601). Ridascreen® Глиадин является также официальным методом (тип 1) Кодекса алиментариус (продовольственного кодекса, разработанного при участии Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН и Всемирной организации здравоохранения). Все реактивы для проведения ИФА, включая градуировочные растворы, содержатся в тест-наборе. Один тест-набор рассчитан на проведение 96 определений (включая градуировочные растворы). Для оценки результатов необходим микропланшетный фотометр.

Пробоподготовка:	гомогенизация, экстракция
Стандартный материал:	RIDASCREEN® стандартный материал откалиброван по стандарту рабочей группы Prolamin
Время выполнения:	Подготовка проб (10 проб).....ок. 2 ч Выполнение теста (время инкубации).....1,5 ч
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу)	0,06 – 1,24 мг/кг (ppm) глиадина 0,5 мг/кг глиадина, соответствует 1 мг/кг глютена
Предел количественного определения:	2,5 мг/кг глиадина, соответствует 5 мг/кг глютена
Диапазон измерений:	2,5-40 мг/кг
Специфичность:	Используемые моноклональные антитела R5 распознают фракцию глиадина в пшенице и родственные проламины ржи и ячменя.

Для повышения качества оценки при выполнении процедур ИФА мы дополнительно ссылаемся на наше Руководство по надлежащей практике ИФА (GEP) в соответствующей версии. В них перечислены минимальные стандарты, касающиеся базовых условий при использовании тест-наборов R-Biopharm AG

и проведении ИФА-анализа. Руководство можно найти, распечатать и загрузить с веб-сайта официального дистрибьютора:

ООО «Неотест», РФ	https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	
ОДО «КомПродСервис», РБ	https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	

Сопутствующие товары

Cocktail (patented) (Art. No. R7006 / R7016)
 RIDA® Cocktail ECO (Art. No. R7080)
 RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)
 RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003 / R7004 / R7005)
 RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)
 RIDASCREEN®FAST Gliadin sensitive (Art. No. R7051)
 RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021)
 RIDASCREEN® Total Gluten (Art. No. R7041)
 Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. No. R7012)
 SureFood® Allergen 4plex Cereals (Art. No. S7006)
 SureFood® Allergen Gluten (Art. No. S3606)

1. Применение

Тест-система Ridascreen® Глиадин для иммуноферментного анализа предназначена для количественного определения контаминации проламинами пшеницы (глиадином), ржи (секалином), ячменя (гордеином) таких продуктов, как мука (гречишная, рисовая, кукурузная, овсяная и пр.), специи, а также обработанных продуктов питания (макароны, готовые продукты, выпечка, колбасные изделия, напитки, мороженое).

Подготовка проб должна выполняться с применением коктейля (арт. 7006/R7016, официальный метод R5-Мендес).

2. Общая информация

Пшеничная мука и глютен часто используются благодаря их физико-химическим свойствам в качестве загустителей при обработке продуктов питания. Глютенom обозначают смесь белков проламинов и глютелинов, присутствующую в пшенице, ржи, ячмене.

Целиакия – непереносимость глютена, приводящая к повреждению тонкого кишечника. Симптомы целиакии обратимы при соблюдении безглютеновой диеты.

Согласно Кодексу алиментариус (CODEX STAN 118/1979) существуют две степени, в соответствии с которыми осуществляется маркировка продуктов питания по содержанию в них глютена:

1. Безглютеновыми продуктами являются продукты питания, содержание глютена в которых не превышает предела в 20 мг/кг.

2. Продукты, обозначенные как продукты с очень низким содержанием глютена, могут содержать более 20 мг/кг, но не более 100 мг глютена /кг.

Все образцы следует экстрагировать с помощью Коктейля (запатентованного) (арт. R7006/R7016, официальный метод R5-Mendez).

Более быстрая пробоподготовка с использованием более экологичного Коктейля ЕСО (арт. R7080) удобна для скрининга образцов. Коктейль ЕСО имеет эффективность экстракции примерно 70 – 110 % по сравнению с Коктейлем (арт. R7006/R7016).

3. Принцип метода

Основой теста является реакция антиген-антитело. Лунки микротитровального планшета сенсibilизированы специфичными антителами к глиадину. Глиадин, содержащийся в растворах проб либо градуировочных растворах, связывается с антителами, образуя комплекс антиген-антитело. Несвязанные антитела удаляются из лунок планшета на стадии промывки и вносятся ферментно маркированные антитела. Конъюгат антител связывается с комплексом антиген-антитело, результатом чего является образование комплекса антитело-антиген-антитело (сэндвич). После удаления несвязанных ферментно маркированных антител во время промывки планшета в его лунки дозируется субстрат и хромоген. Связанный с антителами фермент окрашивает бесцветный хромоген в голубой цвет. Добавление стоп-реагента меняет цвет раствора на желтый. Оптическая плотность измеряется при 450 нм, она пропорциональна концентрации глиадина в пробе.

4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 анализов, включая стандартные образцы. Каждый тестовый набор содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат	Объём	
Микротитрационный планшет	-	Готов к использованию		96 лунок
Буфер	Бесцветный	Концентрат	5х	60 мл
Стандарт 1	Бесцветный	Готов к использованию	0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 2	Бесцветный	Готов к использованию	5,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 3	Бесцветный	Готов к использованию	10,0 нг/мл	1,3 мл

Стандарт 4	Бесцветный	Готов к использованию	20,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 5	Бесцветный	Готов к использованию	40,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 6	Бесцветный	Готов к использованию	80,0 нг/мл	1,3 мл
Промывочный буфер	Коричневый	Концентрат	10х	100 мл
Конъюгат	Красный	Концентрат	11х	1,2 мл
Субстрат	Зелёный	Готов к использованию		7 мл
Хромоген	Синий	Готов к использованию		7 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование:

- Перчатки
- Весы (диапазон измерения не менее 50 г и точность $\pm 0,01$ г)

Лабораторная мясорубка / кофемолка, ступка, ультратурракс или гомогенизатор

- Центрифуга (не менее 2500 x g) + центрифужные пробирки (например, 50 мл центрифужные пробирки от Greiner Art. № 227261)

- Шейкер

- Водяная баня (50 °C; диапазон колебаний см. инструкции производителя водяной бани)

- фильтр (размер пор 8 - 12 мкм)

- Градуированные пипетки

- Градуированный цилиндр

- Микропипетки с переменным объемом 20 - 200 мкл и 200 - 1000 мкл

- При необходимости: дополнительный микротитровальный планшет (например, MTP от Thermo Fisher Scientific арт. № 95029390 или с низким связыванием от Greiner арт. № 655901)

- При необходимости: 8-канальная пипетка на 100 мкл

- Спектрофотометр для микротитровальных планшетов (450 нм)

- Дополнительно: RIDASOFT® Win.NET (арт. Z9996FF)

5.2. Реактивы:

- дистиллированная или деионизированная вода;

- сухое обезжиренное молоко, не содержащее глютена (качество – для пищевых целей);

- коктейль (арт. R7006/R7016, 105 мл/1000 мл) для подготовки проб;

- раствор этанола (80%) для экстрагирования проб с использованием коктейля (120 мл этанола развести 30 мл дистиллированной воды).

6. Меры предосторожности для пользователей

К проведению анализа допускается только специально обученный персонал. Необходимо строго соблюдать инструкцию по использованию набора. Стоп-раствор содержит в своем составе 1Н серную кислоту (R36/38, S226). В данном наборе могут содержаться и другие опасные вещества. Дополнительные рекомендации по работе с опасными веществами можно найти в соответствующих паспортах безопасности для данной продукции (MSDS), которые доступны на сайте www.r-biopharm.com.

7. Инструкции по хранению

Реагенты хранить при температуре 2 - 8 °С. Компоненты тест-системы ни в коем случае не замораживать.

Не требуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом фольгированном пакете при температуре 2 - 8 °С.

Раствор хромогена светочувствителен, поэтому при работе с ним следует избегать воздействия прямых солнечных лучей.

По истечении срока годности (смотри внешнюю этикетку теста) фирма не несет гарантии по качеству.

Замена отдельных реагентов на реагенты из наборов других партий не допускается.

8. Признаки непригодности реагентов

- Голубая окраска раствора красновато окрашенного субстрата/хромогена до внесения в лунки;
- Оптическая плотность меньше 1,2 ($E_{450nm} < 1,2$) для градуировочного раствора 6.

9. Подготовка образцов

9.1 Подготовка к проведению теста

Пыль зерновых, содержащаяся в воздухе, загрязненное лабораторное оборудование могут привести к контаминации глиадином. Поэтому обязательны перчатки во время проведения теста. Перед проведением теста необходимо:

- очистить поверхности, стеклянную посуду, мельницы и другое оборудование с помощью 80% этанола или 2-пропанола (см. п 5.2.);
- подготовка проб и постановка ИФА должны осуществляться в разных помещениях

- реагенты и оборудование проверить на наличие контаминации глиадином с помощью тест-полосок RIDASCREEN®QUICK Gliadin (Арт.: R7003/R7004/R7005);
- рекомендуется работать под вытяжкой, поскольку коктейль и RIDA® раствор для экстрагирования содержат β-меркаптоэтанол;
- β-меркаптоэтанол может оказывать отрицательное влияние на проведение ИФА, поэтому необходимо разведение проб минимум в пропорции 1:500 (рекомендация 1:500 для проб, содержащих прим. 20 мг/кг глютена, и 1:2500 для проб, содержащих прим. 100 мг/кг глютена).

9.2 Экстрагирование с применением коктейля (арт. R7006/R7016, официальный метод АОАС)

Хорошо гомогенизировать достаточный объем пробы (минимум 5 г либо 5 мл) (тщательно растолочь, мелко размолоть и хорошо перемешать твердую пробу либо хорошо перемешать раствор).

- **жидкие продукты питания:** к 0,25 мл гомогенизированной пробы добавить 2,5 мл раствора коктейля, закрыть пробирку, тщательно перемешать;
- **иные продукты питания** (напр., содержащие сою и пшено): к 0,25 г гомогенизированной пробы добавить 2,5 мл раствора коктейля, закрыть пробирку, тщательно перемешать;
- **пробы, содержащие танин и полифенол** (напр., шоколад, кофе, какао, мука каштанов, квиноа, гречиха, специи): к 0,25 г гомогенизированной пробы добавить 0,25 г сухого молока и 2,5 мл раствора коктейля, закрыть пробирку, тщательно перемешать;
- **мясные и колбасные изделия:** распределение глиадина в этих продуктах может быть очень неравномерным, поэтому следует отобрать и гомогенизировать 50 г пробы. К 0,25 г гомогенизированной пробы добавить 2,5 мл раствора коктейля, закрыть пробирку, тщательно перемешать;
- **овес:** глиадин может распределяться неравномерно, кроме того, образцы трудно гомогенизировать. Поэтому гомогенизируйте 200 г, затем проведите экстракцию, по крайней мере, с четырехкратным количеством реагентов, например: взвесьте 1 г гомогенизированного образца и добавьте 10 мл коктейля, закройте пробирку и хорошо перемешайте.

Все пробы экстрагировать, как описано далее:

- инкубировать 40 минут при 50°C;
- пробу охладить (1-3 мин), добавить 7,5 мл 80% раствора этанола (см. п.5.2) (для образцов овса: 30 мл 80% раствора этанола);
- закрыть пробирку, экстрагировать на ротаторе в течение 1 часа при комнатной температуре (20-25°C);

- центрифугировать 10 мин при >2500g (20-25°C) и/или профильтровать экстракт (либо 2 мл экстракта можно центрифугировать при высокой скорости в течение 10 мин с использованием микроцентрифуги);
- перенести надосадочную жидкость в закручивающуюся пробирку;

Примечания. Супернатант, полученный после центрифугирования или фильтрации, может храниться в плотно закрытом флаконе в темноте при комнатной температуре (20-25 ° C) до восьми недель.

Для использования в тесте экстракты (супернатант этапа центрифугирования или фильтрации) должны быть разбавлены буфером (о разбавлении см. главу 10.2.). На сайте разбавленные экстракты образцов имеют ограниченный срок хранения и должны быть использованы в тесте в течение 30 минут.

9.3 Экстрагирование с применением раствора этанола

Экстракция с этанолом должна использоваться только для необработанных продуктов. Рекомендуемый коэффициент разбавления 1:500. Если продукт (например, шоколад, кофе, какао, каштановая мука, квиноа или гречка) содержит танины и полифенолы, рекомендуется пробоподготовка с использованием рыбьего желатина. Также рекомендуется сравнить эффективность экстракции этанолом с эффективностью экстракции Коктейлем (запатентованным) (арт. №. R7006/ R7016)).

Необходимые реагенты:

- дистиллированная или деионизированная вода;
- раствор этанола (60%): добавить 150 мл этанола к 100 мл дистиллированной воды, хорошо встряхнуть;
- для образцов, содержащих сою: сухое обезжиренное молоко.

Процедура:

- хорошо гомогенизируйте достаточное количество (не менее 5 г или 5 мл) образца (тщательно измельчите его, хорошо перемешайте);
- пробы жидкости: смешать 1 мл образца с 9 мл раствора этанола 60% (для соевого молока добавить дополнительно 1 г сухого обезжиренного молока);
- твердые образцы: взвесить 1 г репрезентативного образца и добавить 10 мл 60 % раствора этанола (для образцов содержащих сою, добавить дополнительно 1 г сухого обезжиренного молока);
- хорошо перемешайте на вортексе в течение как минимум 30 секунд;
- далее встряхивайте переверачиванием в течение 10 минут при комнатной температуре;
- центрифугируйте: 10 мин/не менее 2500 g/при комнатной температуре (20 - 25°C) и/или профильтруйте экстракт;
- далее разбавьте супернатант 1:50 (1+49) разбавителем для пробы; например, 20 мкл супернатанта + 980 мкл разбавителя;

- немедленно использовать 100 мкл на лунку в анализе (конечный коэффициент разбавления 500).

9.4 Экстрагирование с применением RIDA® Extraction Solution (colorless) Art. No. R7098

По сравнению с Коктейлем (арт. R7006/R7016) экстракция с RIDA® Extraction Solution (colorless) (арт. R7098) приводит к снижению извлечения клейковины в некоторых образцах. Проверка эффективности экстракции должна быть проверена заранее, особенно для приготовленных образцов.

Подготовка образца сокращается до 35 минут при использовании RIDA® Extraction Solution (colorless) (арт. R7098) по сравнению с Коктейлем (арт. R7006/R7016).

Рекомендуется работать в вытяжном шкафу так как в RIDA® Extraction Solution (colorless) (арт. R7098) содержится β-меркаптоэтанол.

Необходимые реагенты и материалы

- Экстракционный раствор RIDA® (арт. R7098).
- Раствор 2-пропанола (68 %): добавить 68 мл 2-пропанола к 32 мл дистиллированной воды и хорошо встряхнуть.
- Сухое обезжиренное молоко (для пищевых целей): продуктов, содержащих танины и полифенолы.

Общие инструкции по подготовке проб

Хорошо гомогенизируйте достаточное количество (не менее 5 г или 5 мл) образца (тщательно измельчите или хорошо перемешайте образец).

Процедура

Жидкий образец:

- перенесите 0,25 мл гомогенизированного образца во флакон;
- добавьте 2,5 мл экстракционного раствора RIDA® (бесцветный);
- закройте флакон и хорошо перемешайте.

Твердый образец:

- взвесьте 0,25 г гомогенизированной образца;
- добавьте 2,5 мл экстракционного раствора RIDA® (бесцветного);
- закройте флакон и хорошо перемешайте;

Образцы, содержащие: сою, просо, киноа и гречку, а также танины и полифенолы (шоколад, кофе, какао, каштановая мука, специи):

- взвесьте 0,25 г гомогенизированного образца;
- добавить 0,25 г сухого обезжиренного молока;
- добавить 2,5 мл экстракционного раствора RIDA® (бесцветный);
- закрыть флакон и хорошо перемешать.

Мясо и колбаса:

В этих матрицах глиадин может быть распределен неравномерно, поэтому гомогенизируйте около 50 г пробы.

- взвесьте 0,25 г гомогенизированной пробы;
- добавьте 2,5 мл экстракционного раствора RIDA® (бесцветный);
- закройте флакон и хорошо перемешайте.

Далее, для всех проб:

- инкубировать раствор пробы в течение 15 минут при 60 °С на водяной бане;
- дайте образцу остыть, а затем хорошо перемешайте с 7,5 мл 68% 2-пропанола;
- закройте флакон и инкубируйте в течение 10 минут на водяной бане при температуре 60 °С;
- центрифугируйте: 10 мин/при не менее 2500 g/20 - 25 °С и/или профильтруйте экстракт;
- перенести супернатант во флакон с винтовой крышкой;
- разведите пробу 1:12,5 (1+11,5/80 мкл + 920 мкл) разбавителем для образцов: конечный коэффициент разбавления 500;
- немедленно действуйте, как описано в пункте 10.2. инструкции к тест-системе RIDASCREEN® Gliadin (арт. R7001) (финальный фактор разведения 500).

9.5 Экстрагирование с применением раствора рыбьего желатина

Экстракция пробы с помощью рыбьего желатинового раствора должна использоваться только для необработанных образцов.

Рекомендуется для образцов, содержащих танины и полифенолы (шоколад, кофе, какао, гречка и каштановая мука).

Проверку эффективности экстракции с раствором желатина следует сравнить с Коктейлем (запатентовано) (R7006/7016).

Необходимые реагенты:

- дистиллированная или деионизированная вода;
- 10% жидкий рыбий желатин в растворе этанола (60%): добавить 30 мл дистиллированной воды в 100 мл градуированный цилиндр; добавить 10 г жидкого рыбьего желатина (Serva, арт. 22156 или Sigma, арт. G-7765, оба 45%); добавить 2 г поливинилпирролидона K15 или K17 (AppliChem A2258); добавить 60 мл этанола, перемешать и довести pH до 8,5; заполнить до 100 мл дистиллированной водой. Желатин не растворяется полностью в 60 % этанола, поэтому берите требуемый объем для каждой пробоподготовки при перемешивании. Раствор желатина в этаноле можно хранить при комнатной температуре в течение 2 недель.

Процедура:

- хорошо гомогенизируйте достаточное количество (не менее 5 г или 5 мл) образца (тщательно измельчите его и перемешайте);
- приготовьте раствор желатина (раствор перемешивать постоянно);
- взвесьте 1 г хорошо измельченного образца в стеклянном флаконе с шлифованной крышкой;

- добавьте 10 мл желатинового раствора, встряхивайте не менее 30 сек на вортексе;
- далее, встряхивайте в течение 10 минут переворачиванием при комнатной температуре;
- центрифугируйте: 10 мин/при не менее 2500 g/20 - 25 °C и/или профильтруйте экстракт;
- разведите супернатант 1:50 (1+49) разбавителем для проб, например, 20 мкл супернатанта + 980 мкл разбавителя, затем используйте 100 мкл на лунку в анализе, действуйте, как описано в разделе 10.2. инструкции (финальный фактор разведения 500).

9.6 Пробоподготовка для конопляного чая (диапазон измерения 2.5 – 40 мг/кг)

Из-за неспецифического связывания некоторых ингредиентов, таких как хлорофилл и полифенолы, со специфическими антителами, могут возникать фоновые или ложноположительные результаты. Эти эффекты могут быть подавлены путем добавления сухого обезжиренного молока, как описано в следующей процедуре. Поскольку сухое обезжиренное молоко может повлиять на извлечение, мы рекомендуем проверить метод с помощью пробы с пробой.

- Убедитесь, что образец однороден. В противном случае показатели извлечения могут отличаться.
- Тщательно измельчите достаточное количество (например, 50 г) для получения репрезентативной порции образца.
- Во флаконе взвесьте 0,25 г гомогенизированного образца, добавьте 0,25 г сухого обезжиренного молока и 2,5 мл Коктейля (запатентованного), закройте флакон и хорошо перемешайте.
- Экстрагируйте в течение 40 мин при 50 °C на водяной бане.
- Дайте образцу немного остыть (1 – 3 мин).
- Добавьте 7,5 мл 80 % этанола, закройте флакон и хорошо перемешайте.
- Встряхивайте в течение 1 ч вверх дном или с помощью ротатора при комнатной температуре (20 – 25 °C).
- Профильтруйте образец или центрифугируйте в течение 10 мин при > 2 500 x g при комнатной температуре (20 – 25 °C). (альтернатива: перенесите 2 мл экстракта в микро-пробирку и центрифугируйте на высокой скорости (> 10 000 x g) в течение 10 мин в микроцентрифуге).
- Перенесите супернатант в новую пробирку.
- Если после центрифугирования супернатант содержит твердые частицы, дополнительно очистите его фильтрованием.
- Перед использованием экстракты должны быть разбавлены буфером 1:12,5 (1 + 11,5) (например, 920 мкл буфера + 80 мкл образца).

- Используйте 100 мкл разбавленного образца в ИФА.
- Разбавленные экстракты образцов имеют ограниченный срок хранения и должны быть использованы в тесте в течение 30 минут.
- Фактор разведения – 500.

9.6 Пробоподготовка для семян конопли (диапазон измерения 2.5 – 40 мг/кг)

Процедура пробоподготовки очень сильно зависит от процедуры экстракции с использованием Cocktail (запатентовано), приведенной в инструкции по применению (глава 9.2).

- Убедитесь, что образец однороден. В противном случае показатели извлечения могут отличаться.
 - Тщательно измельчите достаточное количество (например, 50 г) для получения репрезентативной порции образца.
 - Взвесьте 0,25 г гомогенизированного образца и добавьте 2,5 мл коктейля (запатентованного), закройте флакон и хорошо перемешайте.
 - Экстрагируйте в течение 40 мин при 50 °С на водяной бане.
 - Дайте образцу немного остыть (1 – 3 мин).
 - Добавьте 7,5 мл 80 % этанола, закройте флакон и хорошо перемешайте.
 - Встряхивайте в течение 1 ч переворачиванием или с помощью ротатора при комнатной температуре (20 - 25 °С).
 - Профильтруйте образец или центрифугируйте в течение 10 мин при $> 2\,500 \times g$ при комнатной температуре (20 – 25 °С).
- (Альтернатива: перенесите 2 мл экстракта в микро-пробирку и центрифугируйте на высокой скорости ($> 10\,000 \times g$) в течение 10 мин в микроцентрифуге).
- Перенесите супернатант в новую пробирку.
 - Если после центрифугирования супернатант содержит твердые частицы, дополнительно очистите его фильтрованием.
 - Перед использованием экстракты должны быть разбавлены буфером 1:12,5 (1 + 11,5) (например, 920 мкл буфера + 80 мкл образца).
 - Используйте 100 мкл разбавленного образца в ИФА.
 - Разбавленные экстракты образцов имеют ограниченный срок хранения и должны быть использованы в тесте в течение 30 минут.
 - Фактор разведения – 500.

10. Проведение теста

10.1. Подготовка теста

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 - 25°C)

Буфер для разведения проб поставляется в концентрированном виде (5х). Необходимое количество буфера перед проведением подготовки проб разбавить дистиллированной водой в пропорции 1:5 (1+4) (напр., 3 мл

концентрата + 12 мл дистиллированной воды, достаточно для разбавления 10 проб). Следует убедиться в том, что отсутствует контаминация буфера глиадином.

Конъюгат (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде (11х). Поскольку разбавленный препарат конъюгата имеет ограниченную стабильность, перед анализом следует разбавлять буфером только требуемое количество конъюгата. Перед разбавлением осторожно перемешайте конъюгат. Для приготовления готового к использованию раствора конъюгата необходимо разбавить концентрат дистиллированной водой в соотношении 1:11 (1+10) (например, 200 мкл концентрата конъюгата + 2 мл дистиллированной воды - достаточно для 2-х стрипов). Следует убедиться в том, что отсутствует контаминация воды глиадином.

Моющий буфер поставляется в концентрированном виде (10х). Необходимое количество буфера разбавить дистиллированной водой в пропорции 1:10 (1+9) (напр., 100 мл концентрата + 900 мл дистиллированной воды). При кристаллизации буфера следует растворить кристаллы на водяной бане при 37°C. Раствор буфера хранить в течение 4 недель при 2-8°C.

10.2 Проведение теста

Экстракты, приготовленные согласно главе 9.1., должны быть разбавлены 1:12.5 (1+11,5) буфером (см. главу 9. Пробоподготовка) перед использованием (например, 920 мкл буфера + 80 мкл образца). Конечный коэффициент разбавления составляет 500. Разведенные экстракты образцов немедленно (в течение 30 минут) используйте в анализе. Более длительный период времени может повлиять на извлечение.

Точность результатов теста зависит от равномерного промывания лунок. В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы.

Не используйте более 6 стрипов (48 лунок) одновременно. Для того, чтобы избежать временного сдвига по микротитровальной пластине, необходимо использовать второй, не сенсibilизированный планшет (например, с низкой связывающей способностью от Greiner bio-one, кат. № 655101). Все стандарты и образцы пипетируют во вспомогательный планшет (не менее 150 мкл на лунку), а затем быстро переносят в рабочий, сенсibilизированный микротитровальный планшет с помощью 8-канальной пипетки.

1. В рамку микротитровального планшета помещают количество стрипов, необходимое для градуировочных растворов и проб. В протокол вносятся позиции градуировочных растворов и проб.

2. В соответствующие лунки в повторностях вносят по 100 мкл градуировочных растворов либо разбавленных растворов проб и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25°C).

3. По окончании инкубации, жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках, удаляют путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. В каждую лунку вносят по 250 мкл моющего буфера (см. п. 10.1). Процедуру промывки лунок повторяют еще дважды.

4. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора конъюгата (см. п. 10.1). Осторожно перемешивают содержимое планшета и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25°C).

5. По окончании инкубации, жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках удаляют путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. В каждую лунку вносят по 250 мкл моющего буфера (см. п. 10.1). Процедуру промывки лунок повторяют еще дважды.

6. В лунки вносят по 50 мкл раствора субстрата и 50 мкл раствора хромогена, аккуратно перемешивают содержимое и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре (20-25 °C) в темноте.

7. В лунки вносят по 100 мкл стоп-реагента и аккуратно перемешивают содержимое. В течение 30 минут после добавления стоп-реагента необходимо измерить оптическую плотность при 450 нм.

11. Результаты

Для оценки результатов анализа можно использовать программное обеспечение RIDA® SOFT Win (арт. Z9999), разработанное R-Biopharm специально для тест-систем RIDASCREEN®. Оценка осуществляется с помощью функции кубический сплайн.

Вид градуировочной кривой можно сопоставить с сертификатом качества на партию. Для обеспечения качества анализа рекомендуется использование тест-контролей глиадин (арт. R7012).

Более высокие значения оптической плотности (E450 нм) градуировочного графика по сравнению с данными сертификата на партию, особенно нулевого градуировочного раствора, могут свидетельствовать о недостаточной промывке либо о контаминации.

Пробы с оптической плотностью (E450 нм) □ градуировочный раствор 6 необходимо развести и провести повторный анализ. Разведение проб следует осуществлять таким образом, чтобы их значение можно было определить по линейной части графика.

Анализ также может проводиться с использованием одного измерения на пробу. Для расчета этого способа анализа необходимо создать файл методов в RIDASOFT® Win.NET. Каждая лаборатория может принять решение о проведении теста в формате одного измерения на пробу после квалифицированного анализа управления рисками. Однако это способ не соответствует официальному методу анализа AOAC и стандартам EN 15633-1 и EN 15842. Следует отметить, что это повышает риск ошибки при проведении теста (например, ошибки пипетирования).

Концентрация глиаина в нг/мл (ppb) считается из калибровочной кривой и далее должна быть умножена на коэффициент разбавления полученный при подготовке пробы – не менее 500. Этот результат затем умножается на 2 чтобы получить концентрацию глютена (глиадин составляет 50% от белков, присутствующих в клейковине). RIDASOFT® Win.NET (версия 1.93 или новее) показывает результаты в глиадине и глютене.

Пример расчета:

Процент связывания пробы соответствует концентрации 10 мкг/кг глиаина по градуировочной кривой. После умножения на фактор разведения 500 получается значение 5000 мкг/кг, соответствующее 5 мг/кг глиаина либо 0,0005% глиаина. Для расчета содержания глютена значение следует умножить на 2, что дает результат 10 мг/кг глютена (0,001% глютена). Проба должна быть маркирована как не содержащая глютен, т.к. концентрация ниже 20 мг/кг.

12. Интерпретация результатов

Результаты между LOD и LOQ указывают на низкую концентрацию аналита в образце. Рассчитанные результаты показывают высокую неопределенность в этой области из-за высокой вариабельности метода ниже LOQ. Поэтому такие результаты не должны быть выражены в виде количественного значения, а только в виде качественного - "< LOQ".

Результат ниже LOD не исключает загрязнения глютенном ниже предела обнаружения анализа, или что в образце могут присутствовать другие компоненты злаков, такие как липиды. Если образцы показывают более высокую абсорбцию, чем у стандарта 6, то образцы необходимо дополнительно разбавить и снова использовать в ИФА. Для этого разбавьте экстракт еще раз свежим буфером 1:12,5, как описано в главе 9.1. Затем разбавьте экстракт образца, в этом же соотношении, следующей смесью:

2 % - Коктейль (патентованный)

6 % - 80 % раствора этанола

92 % - буфера

Это соответствует, например, 100 мкл Коктейля (запатентованного), 300 мкл 80 % этанола и 4600 мкл буфера. При использовании этой смеси состав образца поддерживается в соответствии с экстракцией, описанной в главе 9.1.

В случае дополнительного разбавления новый коэффициент разбавления должен быть учтен при расчете концентрации аллергена. По сравнению с сертификатом, более высокие значения абсорбции (A450 нм) для стандартной кривой, особенно для нулевого стандарта, могут быть результатом недостаточной промывки или загрязнения аллергеном.

13. Ограничения метода

Результаты тестирования могут отличаться в зависимости от матрицы, фактической процедуры тестирования и лабораторных условий. Пределы обнаружения и количественного определения зависят от соответствующей матрицы, степени обработки и метода экстракции.

Взвешивание анализируемого образца влияет на результат измерения, например, при взвешивании с ошибкой +10% измеряется концентрация на 10% выше. Достаточная точность обеспечивается при колебаниях веса образца не более ± 1 %.

Кроме того, данные по отдельным продуктам питания могут быть получены в результате сравнительных лабораторных испытаний и межлабораторных сравнений. Для настоящего ИФА из-за большого количества продуктов можно было валидировать только отдельные, типичные продукты из различных категорий продуктов. При анализе не валидированной матрицы рекомендуется проверить полученные результаты с помощью экспериментов со спайками. При необходимости необходимо провести валидацию интересующей матрицы образца. Из-за множества типов продуктов питания нельзя исключить влияние матрицы. Они могут привести к ложноположительным / повышенным результатам, а также снизить или подавить правильную реакцию. Такие матричные эффекты не зависят от специфичности антитела, используемого в тесте, и могут быть выявлены в ходе экспериментов с проливом. Добавление чужеродного белка (в зависимости от теста, например, BSA, желатина, сухого обезжиренного молока) во время экстракции или процедуры тестирования может подавить матричные эффекты. В обработанных продуктах питания (например, при термической обработке, обезвоживании и т.д.) белки могут быть изменены или фрагментированы, что может повлиять на извлечение и результаты анализа. Перекрестные реакции – это не специфические реакции антител, используемых для приготовления тест-набора, с антигеном, имеющим схожие эпитопы с исследуемым аналитом. Перекрестная реактивность может также появляться после обработки пищевых продуктов в единичных случаях или пропадать. Для оценки перекрестной реактивности был проанализирован только один репрезентативный образец, другие образцы могут показать другой

результат. Все проанализированные перекрестные реактивности описаны в отчете о валидации. Содержание белка и белковый состав сортов пшеницы, ржи и ячменя могут отличаться. Поэтому для разных сортов следует ожидать различных результатов. Основным эпитопом антитела R5 является аминокислотная последовательность QQPFP, которая входит в состав многих токсичных для целиакии последовательностей. Эта последовательность неоднократно встречается в проламинах пшеницы, ржи и ячменя. Однако рожь и ячмень содержат большее количество реплик этой последовательности, что приводит к завышенной оценке ржи и ячменя по сравнению с пшеничным стандартом. Недавние исследования показали, что реальный коэффициент пересчета глиадины в глютен составляет примерно 1,5. Однако официальный коэффициент пересчета (Codex Alimentarius) по-прежнему равен 2.

14. Рекомендации

Для обеспечения высоких аналитических показателей мы рекомендуем:

- соблюдать общие требования по обеспечению качества для лабораторий, как указано в стандартах EN 15633-1 и EN 15842 (например, дублирование определений).
- перед пипетированием предварительно промыть наконечники пипеток стандартом или экстрактом образца.
- использовать контрольные тесты для контроля качества и обеспечения точной и правильной процедуры тестирования. Следует использовать образцы, не содержащие глютен и содержащие глютен (естественно загрязненные или спайкированные). В случае чрезвычайно кислых или основных образцов, необходимо отрегулировать значение pH до нейтрального (pH 6,5-7,5) перед экстракцией.

Провести ПЦР (например, SureFood®) для подтверждения результата.

Во время производства таких продуктов, как пиво или закваска, белки фрагментируются. В сэндвич ИФА фрагменты белка приводят к снижению извлечения глютена. Такие образцы следует анализировать с помощью конкурентного ИФА, такого как RIDASCREEN® Gliadin competitive (арт. R7021).

R-Biopharm не дает каких-либо гарантий, явных или подразумеваемых, кроме того, что материалы, из которых продукция изготовлена, имеют стандартное качество. В случае дефекта каких-либо материалов, R-Biopharm обеспечивает их замену. Не существует гарантии годности этого продукта для продажи или пригодности продукта для любых целей. R-Биофарм не несет ответственности за любые убытки, включая прямой или косвенный ущерб или расходы, возникающие прямо или косвенно в результате использования данного продукта.

Данные соответствуют нашему нынешнему состоянию технологий и предоставляют информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Биофарм не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.