RIDASCREEN® Глиадин конкурентный

REF R7021

Иммуноферментный анализ для количественного определения пептидных фрагментов глиадина и соответствующих белков

Утвержден как официальный метод анализа AOAC (OMA)

Статус окончательного действия 2015.05

Анализ *in vitro*

Хранить при 20-25°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 конкурентный

Описание

RIDASCREEN® Gliadin Competition (Арт. № R7021) — это конкурентный иммуноферментный анализ для количественного определения фрагментов проламиновых пептидов пшеницы (глиадин), ржи (секалин) и ячменя (гордеин) в пищевых продуктах, валидированных для этого метода (см. главу 1. Использование по назначению).

Der R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin Competition является:

- официальный метод AACCI (38-55.01) для пива, крахмальной патоки и закваски
- утвержденный официальный метод анализа AOAC (AOAC-OMA) Final Action Status (2015.05)
- валидированный метод ASBC (Beer-49)

Все реагенты, необходимые для иммуноферментного анализа, в том числе стандарты, содержатся в тест-наборе. Тестового набора достаточно для максимум 96 определений (включая стандарты). Для количественного определения требуется микротитрационный планшетный спектрофотометр.

Пробоподготовка:	Гомогенизация, экстракция и центрифугирование
Затраты времени:	Пробоподготовка (10 проб)…..……..……ок. 30 мин Время анализа (время инкубации)……40 мин
Стандартный материал:	Стандартный материал RIDASCREEN® представляет собой гидролизат (смесь пшеницы, ржи и ячменя; Gessendorf et al. (2009) Anal Bioanl Chem, 395:1721-1728).
Предел обнаружения: (зависит от матрицы)	2,3 мг/кг (ppm) глиадина* или 4,6 мг/кг (ppm) глютена* 1,9–2,6 мг/кг (частей на миллион) глиадина *среднее значение
Предел количественного определения:	5 мг/кг (ppm) глиадина или 10 мг/кг (ppm) глютена
Специфичность:	Моноклональное антитело R5 распознает потенциально токсичные пептидные последовательности глиадинов пшеницы и родственных проламинов ржи и ячменя. Дополнительная информация содержится в отчете о проверке.

Перекрестная реактивность антител, используемых для этого тестового набора, была определена для чистой пищи (например, кукурузной муки). В составных/обработанных пищевых продуктах (например, в кукурузном хлебе) перекрестная реактивность может быть другой. Мешающие вещества (например, полифенолы) можно обнаружить с помощью экспериментов с добавлением (см. главу 13. Ограничения метода).

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

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.Применение

RIDASCREEN® Gliadin конкурентный (Арт. № R7021) представляет собой конкурентный иммуноферментный тест, разработанный для количественного определения фрагментов проламиновых пептидов пшеницы (глиадин), ржи (секалин) и ячменя (гордеин) в ферментированных или гидролизованных пищевых продуктах, которые заявлены как «без глютена». Из-за большого количества различных пищевых продуктов следующие образцы были исследованы как репрезентативные для различных категорий пищевых продуктов в рамках разработки теста: пиво без глютена, рисовое пиво, кукурузная мука, закваска и патока из сахарной свеклы. Можно предположить, что анализ подходит и для анализа других пищевых продуктов, однако это должно быть проверено пользователем перед применением набора для тестирования к этой категории пищевых продуктов.

Подробные результаты и дополнительную информацию о данных валидации с другими матрицами пищевых продуктов см. в отчете о валидации. Дальнейшие применения регулярно проверяются в наших лабораториях, которые мы публикуем в наших указаниях по применению (см. главу 15. Дополнительные указания по применению).

2. Общая информация

Использование пшеничной муки и глютена в пищевых продуктах чрезвычайно распространено для улучшения, например. консистенция, сохранение влаги и вкус. Глютен представляет собой смесь белков проламина и глютелина, присутствующих в пшенице, ржи и ячмене. Целиакия — это постоянная непереносимость глютена, которая приводит к повреждению тонкой кишки и обратима, если глютен исключен из диеты.

Согласно Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979), существуют две категории для маркировки продуктов питания в зависимости от содержания глютена:

1) Пищевые продукты, содержащие менее 20 мг/кг (ppm), могут быть помечены как **«безглютеновые».**

2) Пищевые продукты с пометкой **«с очень низким содержанием глютена»** могут иметь содержание глютена от 20 до 100 мг/кг (ppm).

Пороговое значение 20 мг/кг было принято во многих национальных законодательствах многих стран. Содержание проламинов (например, глиадина) в глютене, согласно определению, обычно принимается равным 50 % (CODEX STAN 118-1979).

Во время обработки пищевых продуктов, например, при ферментации или гидролизе неповрежденные молекулы проламина частично или полностью расщепляются до небольших пептидных фрагментов. Тем не менее, они все еще могут быть опасны для больных целиакией.

Отдельные небольшие пептидные последовательности (мотивы) не могут быть обнаружены в формате сэндвич-ИФА, потому что для сэндвич-ИФА необходимы по крайней мере два эпитопа. Напротив, конкурентный формат также можно использовать для обнаружения пептидных фрагментов с одним эпитопом.

В качестве стандартного материала в RIDASCREEN® Gliadin (арт. № R7021) используют пшеницу, рожь и ячмень, которые расщепляли пепсином и трипсином, пептидные фрагменты смешивали и после определения белка лиофилизировали. Содержание белка определяли по Дюма. Анализ может быть связан с концентрацией проламина и, следовательно, с предельными значениями, установленными Codex Alimentarius. Результат выражается в мг/кг глиадина. Гидролизованный стандарт был подготовлен рабочей группой профессора доктора Кёлера (Немецкий исследовательский центр пищевой химии).

3. Принцип работы

Принципом проведения теста является реакция антиген-антитело. Микротитрные колодцы покрыты глиадином. Добавляют стандарты (гидролизатная смесь пшеницы, ржи и ячменя), соответственно пробные растворы и пероксидазные меченые антиглиадиновыми антителами (конъюгированные с моноклональными R5-антителами). Свободный и иммобилизованный глиадин конкурирует с сайтами связывания антител глиадина (конкурентный иммуноферментный анализ). Любой несвязанный конъюгат фермента затем удаляется с помощью этапа промывки. Раствор субстрата/хромогена добавляют в лунки и инкубируют. Связанный фермент конъюгат превращает хромоген в синий продукт. Добавляется стоп-раствор, который приводит к изменению цвета с синего на желтый. Абсорбцию раствора, которая обратно пропорциональна концентрации глиадина респективав образце, измеряют фотометрически при 450 нм и выражают в нг/мл (ppb) глиадина.

4. Состав набора

Каждый набор содержит достаточное количество материалов максимум для 96 измерений (включая стандартные анализы). Каждый тестовый набор содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитрационный планшет	-	Готов к использованию		96 лунок
Буфер	Белый	Концентрат	5x	60 мл
Стандарт 1*	Прозрачный	Готов к использованию	0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 2*	Прозрачный	Готов к использованию	10,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 3*	Прозрачный	Готов к использованию	30,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 4*	Прозрачный	Готов к использованию	90,0 нг/мл	1,3 мл
Стандарт 5*	Прозрачный	Готов к использованию	270,0 нг/мл	1,3 мл
Промывочный буфер	Коричневый	Концентрат	10x	100 мл
Конъюгат	Красный	Концентрат	11x	0,7 мл
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию		10 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

*Стандарты содержат гидролизат проламинов пшеницы, ржи и ячменя. В отличие от одобрения AOACOMA 2015.05 концентрации стандартов указаны в глиадине. Для превращения глиадина в глютен используется коэффициент 2 (определение Codex Alimentarius).

5. Необходимые материалы, которые не входят в состав набора

5.1.Оборудование

- Перчатки
- Шкала (диапазон измерения не менее 50 г и точность ±0,01 г)
- Лабораторная мясорубка/измельчитель, ступка, ультра-турракс или гомогенизатор
- Флаконы
- Шейкер/ротатор
- Рифленый фильтр (размер пор 8 - 12 мкм)
- Градуированные пипетки
- Градуированный цилиндр
- Различные микропипетки на 20 - 200 мкл и 200 - 1000 мкл
- При необходимости: дополнительный титрационный микропланшет (например, универсальный связывающий, разрушаемый MTP от Thermo Fisher Scientific, арт. № 95029390 или низкосвязывающий Greiner bio-one, 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 вода (дист. вода) или деионизированная вода
- Для экстракции таких образцов, как крахмал и патока, 60% этанол

требуется решение: передача, например. 150 мл этанола в год 100 мл дистиллированной воды и хорошо перемешать.

- Для экстракции образцов, содержащих полифенолы (например, пиво, солод, хмель): жидкий рыбный желатин (Serva, арт. № 22156 или Sigma, арт. № G-7765, содержание сухих веществ 45 %).
- 1 М раствор гидроксида натрия

6.Меры предосторожности

Этот тест должен проводиться только обученным персоналом лаборатории. Инструкция должна строго соблюдаться.

Этот комплект может содержать опасные вещества. Примечания об опасности содержащихся веществ см. в соответствующих паспортах безопасности материалов (SDS) для этого продукта, доступных онлайн на сайте www.r-biopharm.com.

Не используйте повторно лунки микротитрационных стрипов (микропланшет с покрытием и препланшет, если это необходимо (см. главу 10.2. Процедура тестирования)). Используйте отдельные наконечники пипеток для каждого стандарта и каждого экстракта образца, чтобы избежать перекрестного загрязнения, и предварительно промойте наконечник перед пипетированием стандарта или экстракта образца.

Все реагенты и материалы должны быть восстановлены или утилизированы после использования под собственную ответственность клиентов в соответствии с требованиями защиты здоровья человека и окружающей среды. Пожалуйста, соблюдайте применимые национальные правила по утилизации отходов (например, Закон об управлении отходами, Правила обращения с опасными химическими веществами и т. д.).

7. Хранение

Храните набор при температуре 2–8 °C (35–46 °F). Не замораживайте компоненты тестового набора.

Во избежание попадания влаги внутрь лунок открывайте пакет из фольги для извлечения микролунок только после того, как они достигнут комнатной температуры (20–25 °C / 68–77 °F).

Положите все неиспользованные микролунки в исходный пакет из фольги, снова запечатайте их вместе с влагопоглотителем и храните в дальнейшем при температуре 2–8 °C (35–46 °F).

Красноватый субстрат/хромоген чувствителен к свету. Поэтому избегайте воздействие прямого света на него.

Не используйте тест-набор после истечения срока годности (см. этикетку на тест-наборе).

Не меняйте местами отдельные реагенты в наборах с разными номерами партий.

8. Признаки непригодности реагентов

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

9. Пробоподготовка

Надевайте перчатки перед началом и во время анализа. Переносимая по воздуху зерновая пыль и грязное лабораторное оборудование могут привести к загрязнению теста глиадином.

Поэтому обратите внимание на следующие рекомендации:

- Очищайте поверхности, стеклянные флаконы, мясорубки и другое оборудование до и после подготовки каждой пробы 60 % этанолом.
- Проводить пробоподготовку в помещении, изолированном от ИФА.
- Проверить загрязнение реагентов и оборудования глиадином с помощью тест-полосок RIDA®QUICK Gliadin (арт. № R7003, R7004, R7005).

Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20–25 °C / 68–77 °F).

Для экстракции таких образцов, как крахмал и патока, требуется 60 % раствор этанола. Для этого добавьте, например. 150 мл этанола в год до 100 мл дист. воды и хорошо перемешать.

Для экстракции образцов, содержащих полифенолы, таких как пиво, солод и хмель, необходимо приготовить этанольный раствор (60 %), содержащий 10 % жидкого рыбьего желатина (этанольный раствор рыбьего желатина). Для этого заполните, например. 30 мл дист. воды в мерном цилиндре на 100 мл. Добавьте 10 г жидкого рыбного желатина и хорошо перемешайте. Добавьте 60 мл этанола в год. и хорошо перемешайте. Доведите значение pH до 8,5 с помощью pH-электрода и 1M раствора NaOH и доведите до 100 мл дист. вода. Рыбий желатин не может быть полностью растворен в 60 % этаноле, а остается в виде суспензии. Поэтому отбирают необходимый объем для пробоподготовки при перемешивании. Раствор рыбьего желатина в этаноле можно хранить в течение 2 недель при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F).

9.1.Экстракция

С помощью RIDASCREEN® Gliadin competitive (Арт. № R7021) следует тестировать только образцы, экстрагированные этанолом (не следует использовать Коктейль (запатентованный)).

Гомогенизируйте (тщательно измельчите до порошкообразного состояния и хорошо перемешайте полученный или порошок, например, 50 г или 50 мл), чтобы получить репрезентативную пробу для анализа.

- Твердые продукты (например, крахмал и крахмальная патока): перенесите 1 г гомогенизированной пробы в новый флакон, добавьте 10 мл 60% раствора этанола (см. главу 9) и хорошо перемешайте.

- Полифенолсодержащие твердые продукты (например, солод и хмель): переносят 1 г гомогенизированной пробы, добавляют 10 мл 60% раствора этанола, содержащего 10% жидкого рыбьего желатина (см. главу 9) и хорошо перемешивают.

- Жидкие продукты (например, соевый соус): хорошо смешать 1 мл гомогенизированной пробы с 9 мл 60% раствора этанола (см. главу 9).

- Пиво: хорошо смешать 1 мл гомогенизированной пробы с 9 мл 60 % раствора этанола, содержащего 10 % жидкого рыбьего желатина (см. главу 9).

Далее экстрагируйте все образцы, как описано ниже:

- Энергично перемешивайте не менее 30 секунд (например, вортексером).

- Хорошо встряхните вверх дном или вращать на ротаторе еще 10 мин.

- Отфильтруйте образец или отцентрифугируйте в течение 10 мин при > 2500 g; по возможности при комнатной температуре (20–25 °C / 68–77 °F).

(Альтернатива: перенести 2 мл экстракта в реакционный флакон и центрифугировать на высокой скорости (> 10 000 x g) в течение 10 мин в микроцентрифуге).

- Перенесите супернатант в свежий флакон.

- Если супернатант после центрифугирования не свободен от частиц, дополнительно отфильтровать экстракт.

- Экстракт (супернатант со стадии центрифугирования или фильтрат) можно хранить в неразбавленном виде в хорошо закрытом контейнере при комнатной температуре (20–25 °C / 68–77 °F) в темноте (срок годности около 4 недель) до использования. в тесте.

- Для использования в тесте экстракты (супернатант со стадии центрифугирования или фильтрат) должны быть разбавлены разбавленным буфером (для разбавления см. главу 10.2.).

10. Проведение теста

10.1. Подготовка к анализу

Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (20–25 °C / 68–77 °F).

Буфер, окрашенный в желтый цвет, поставляется в виде 5-кратного концентрата. В день проведения испытаний необходимая аликвота должна быть разбавлена 1:5 (1+4) дист. вода (т.е. 12 мл дистиллированной воды + 3 мл концентрата достаточно для разбавления 10 образцов). Разбавленный буфер стабилен в течение 1 дня. Убедитесь, что буфер не загрязнен глиадином из образца.

Конъюгат (конъюгат фермента антитела) (флакон с красной крышкой) поставляется в виде 11-кратного концентрата. Поскольку разведенный раствор антител имеет ограниченную стабильность, следует разбавлять только то количество, которое действительно необходимо. Перед пипетированием раствор антител следует тщательно встряхнуть. Для восстановления концентрат конъюгата разбавляют 1:11 (1+10) дист. водой (например, 1 мл дистиллированной воды + 100 мкл конъюгата конъюгата, достаточно для 2 микротитровальных полосок). Следите за тем, чтобы вода не была загрязнена глиадином.

Промывочный буфер предоставляется в виде 10-кратного концентрата. Перед использованием буферный концентрат необходимо развести 1:10 (1+9) с дист. водой (например, 900 мл дистиллированной воды + 100 мл буферного концентрата). Перед разбавлением растворите образовавшиеся кристаллы, инкубируя буфер на водяной бане при 37 °C (99 °F). Разбавленный промывочный буфер стабилен при 20–25 °C (68–77 °F) в течение прибл. 4 недели. Компоненты следует хранить при температуре 2–8 °C (35–46 °F), если они больше не требуются.

10.2. Процедура анализа

Подготовленные экстракты необходимо развести 1:50 (1+49) разведенным буфером (см. главу 10.1. Подготовка к анализу) перед использованием (например, 980 мкл разведенного буфера + 20 мкл образца).

Тщательно следуйте рекомендуемой процедуре промывки. Не допускайте высыхания микролунок между этапами анализа.

Рекомендуется пипетировать конъюгат, субстрат/хромоген и стоп-раствор с помощью многоканальной или ступенчатой пипетки, чтобы избежать временного сдвига по планшету.

1. Вставьте достаточное количество лунок в держатель микролунок, чтобы все стандарты и образцы были проанализированы в двух экземплярах. Запишите расположение стандартов и образцов.

2. Добавьте в лунки по 50 мкл каждого стандарта или пробы (подготовленной в соответствии с главой 9. Подготовка пробы и разведенной в соответствии с главой 10.2. Процедура анализа) в двух экземплярах.

3. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл разведенного конъюгата (см. главу 10.1.). Аккуратно перемешайте, встряхнув планшет вручную, и инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F).

4. Вылейте жидкость из лунок и энергично постучите держателем микропланшетов вверх дном (три раза) о впитывающую бумагу, чтобы обеспечить полное удаление жидкости из лунок. Заполните все лунки 250 мкл разбавленного промывочного буфера (см. главу 10.1.) и вылейте жидкость. Повторите еще два раза (всего три цикла промывки).

5. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл субстрата/хромогена и инкубируйте в течение 10 мин при комнатной температуре (20–25 °C/68–77 °F) в темноте.

6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора. Аккуратно перемешайте, встряхивая планшет вручную, и измерьте оптическую плотность при 450 нм. Оцените результат с помощью фотометра в течение 10 мин после добавления стоп-раствора.

11. Измерения

Специальное программное обеспечение **RIDASOFT® Win.NET** (Арт. № Z9996FF) доступно для оценки результатов иммуноферментного анализа RIDASCREEN®. Оценка должна выполняться с использованием функции 4-параметрического или кубического сплайна. После выбора метода оценки его следует сохранить и не переключать между двумя функциями. Из-за своей математической основы функция кубического сплайна не может рассчитывать концентрации за пределами диапазона измерения (< стандарт 2 и > стандарт 5). Функция с 4 параметрами позволяет вычислять значения между стандартом 1 и стандартом 2 (см. главу 13. Ограничения метода).

Программное обеспечение RIDA ® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/	

Для оценки необходимо уточнить, выполняются ли критерии качества для текущего прогона теста. Ход стандартной кривой можно взять из прилагаемого сертификата анализа.

Анализ можно также оценить при выполнении однократных определений. Это не влияет на работу тест-набора. Для этого в программе RIDASOFT® Win.NET должна быть написана специальная оценка анализа. Его нет по умолчанию. Каждая лаборатория может принять решение о проведении теста в отдельных определениях после квалифицированного анализа управления рисками. Однако это не соответствует таким стандартам, как EN 15633-1 и EN 15842. Следует отметить, что это увеличивает риск пропуска ошибок при выполнении теста (например, ошибок пипетирования). Более того, более высокая вариация результатов будет иметь место при пипетировании в одиночных определениях.

12. Интерпретация результатов

Концентрация глиадина в нг/мл считывается со стандартной кривой и должна быть дополнительно умножена на коэффициент разбавления 500. Этот коэффициент 500 установлен по умолчанию в программном обеспечении RIDASOFT® Win.NET.

Программное обеспечение RIDASOFT® Win.NET (версия 1.93 или более поздняя) показывает результаты по глиадину и глютену. Антитело R5 обнаруживает глиадин, секалин и гордеин.

Пример расчета:

Из стандартной кривой получают концентрацию глиадина 50 нг/мл (ppb). Умножение на рекомендуемый коэффициент разбавления 500 дает 25 000 нг/кг глиадина, что соответствует 25 мг/кг (ppm) глиадина. Чтобы рассчитать содержание глютена, необходимо умножить его на коэффициент 2, в результате чего получится 50 мг/кг (ppm) глютена.

Для перевода глиадина в глютен используется коэффициент 2 (определение Codex Alimentarius). Этот фактор сильно зависит от анализируемого образца, особенно промытые крахмалы могут содержать более высокую долю глютелинов. В этом случае коэффициент больше 2 и соответственно выше концентрация клейковины.

Результаты между LOD и LOQ указывают на низкую концентрацию аллергена в образце. Результаты расчетов показывают высокую неопределенность в этой области из-за большой вариации метода ниже LOQ. Следовательно, такие результаты следует сообщать не с количественным значением, а с качественным как «< LOQ».

Результат ниже LOD не исключает загрязнения глютеном ниже предела обнаружения анализа или того, что в образце могут присутствовать другие компоненты злаков, такие как крахмал. Результат должен быть сообщен соответствующим образом.

13. Ограничения метода

Результаты испытаний могут различаться в зависимости от матрицы образцов, фактической процедуры испытаний и лабораторных условий.

Пределы обнаружения и количественного определения зависят от матрицы образца, степени обработки и метода экстракции.

Технические ограничения метода испытаний выходят за пределы установленного диапазона измерений, что приводит к более высоким вариациям. Это может привести к переключению результатов между различными областями калибровочной кривой, особенно на границах тестовых характеристик (LOD, LOQ, верхний предел диапазона измерений).

Неправильный вес анализируемого образца повлияет на результат измерения 1:1 (например, концентрация на 10 % выше при взвешивании +10 %). Достаточная точность дается при отклонении не более ±1%.

Подробные результаты и дополнительную информацию по другим матрицам пищевых продуктов см. в текущем отчете о валидации. Кроме того, данные по отдельным пищевым продуктам могут быть получены в результате сравнительных лабораторных испытаний и межлабораторных сравнений.

Для данного ИФА можно было валидировать только отдельные образцовые пищевые продукты из разных категорий продуктов из-за большого количества пищевых продуктов. При анализе невалидированной матрицы рекомендуется проверять полученные результаты с помощью методов с добавкой вещества. При необходимости выполните проверку интересующей выборки матрицы.

Из-за множества типов продуктов нельзя исключать матричные эффекты. Это может привести к ложноположительным/завышенным результатам, а также уменьшить или подавить правильную реакцию. Такие матричные эффекты не зависят от специфичности антитела, используемого в тесте, и их можно сделать видимыми в экспериментах с добавлением.

Добавление чужеродного белка (в зависимости от теста, например, БСА, желатина, сухого обезжиренного молока) во время экстракции или процедуры тестирования может подавлять матричные эффекты.

В переработанных пищевых продуктах (например, при термической обработке, обезвоживании и т. д.) белки могут быть изменены или фрагментированы, что может повлиять на результаты извлечения и анализа.

Перекрестная реактивность представляет собой побочную реакцию антитела, используемого для приготовления тестового набора, с антигеном, имеющим сходные эпитопы с исследуемым аналитом. Они появляются особенно с антигенами из близкородственных видов. В отличие от матричных эффектов, это специфическая реакция антигена с антителом. Структуры антигена подвергаются тем же воздействиям (например, при нагревании или сушке), что и реальный аналит. Следовательно, перекрестные реакции могут

также проявляться после обработки пищевых продуктов в единичном случае или исчезать.

Для оценки перекрестной реакции был проанализирован только один репрезентативный образец, другие образцы могут показать другой результат. Все проанализированные перекрестные реактивности описаны в отчете о валидации.

Термообработанные образцы, экстрагированные этанолом, могут демонстрировать пониженное восстановление. Для таких образцов экстракцию следует проводить с помощью Коктейля (запатентованного) с последующим анализом в сэндвич-ИФА RIDASCREEN® Gliadin (Арт. № R7001). Однако экстракты коктейля (запатентованные) нельзя анализировать в конкурентном ИФА. Таким образом, из-за экстракции этанолом в конкурентном ИФА RIDASCREEN® Gliadin может быть заниженное определение в нагретых образцах. С другой стороны, в тесте Sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin может присутствовать недоопределение из-за гидролиза образца. Таким образом, образцы, подвергшиеся как термообработке, так и гидролизу, представляют собой особую аналитическую проблему. В этих случаях рекомендуется анализ в обоих ИФА. Из-за этой проблемы результаты обоих тестов следует интерпретировать с осторожностью, и с точки зрения риска следует использовать более высокое значение.

В таблице ниже показан диапазон вариаций для анализа гидролизованных образцов (дополнительные результаты эффективности метода опубликованы в J. AOAC. Int. 98:1346-1354, 2015):

		Пиво			Крахмальный сироп		Закваска	
	Символ	Без глютена	15 мг/кг проламина	50 мг/кг проламина	Без глютена	Природные примеси	35 мг/кг проламина	75 мг/кг проламина
Общее кол-во лабораторий		13	12	11	13	13	13	13
Общее количество анализов		26	24	22	26	26	26	26
Среднее знач.		1.2	13.1	59.7	0.7	5.3	24.2	72.8
Извлечение, %			87	119			69	97
Повторяемость SD (мг/кг)	s(r)	1.2	4.0	18.6	1.0	0.9	5.6	14.2
Воспроизводимость SD (мг/кг)	s(R)	1.5	4.8	18.6	1.5	1.8	6.3	20.0
Повторяемость отн. SD (мг/кг)	RSD(r)	97.9	30.2	31.2	157.2	16.3	23.1	19.5
Воспроизводимость отн. SD (мг/кг)	RSD(R)	126.1	36.9	31.2	236.1	34.4	25.9	27.5
Коэффициент Хорвитца		8.1	3.4	3.6	13.8	2.8	2.6	3.3

Пепсин/трипсиновый перевар, используемый в качестве калибратора в этом анализе, не отражает все процессы гидролиза. Пользователям рекомендуется подтвердить эффективность метода для своих конкретных процессов.

Тест может не измерять или обнаруживать все ферментированные и/или гидролизованные формы глютена. Гидролиз также может давать более крупные

фрагменты без эпитопа для используемого антитела R5, что может представлять риск для пациентов с глютеновой болезнью.

14. Рекомендации

Для обеспечения высокой аналитической производительности мы рекомендуем:

- Соответствовать общим требованиям обеспечения качества для лабораторий, как указано в таких стандартах, как EN 15633-1 и EN 15842 (например, проведение повторных определений).
- Предварительно промойте наконечники пипеток стандартным экстрактом или экстрактом пробы перед пипетированием.
- Осуществлять контроль испытаний для контроля качества и обеспечения точной и правильной процедуры испытаний. Должны использоваться образцы без глютена и содержащие глютен (естественно загрязненные или обогащенные). Пример эксперимента со спайками приведен в отчете о проверке.
- В случае чрезвычайно кислых или щелочных образцов перед экстракцией может потребоваться отрегулировать значение pH образца (pH от 6,5 до 7,5) до нейтрального.
- Провести ПЦР (например, SureFood®) для подтверждения результатов.
- Свяжитесь с нами по адресу sales@r-biopharm.de, если используются автоматы (например, ThunderBolt® / BoltTM).

15. Дополнительные указания по применению

- Анализ глютена или ß-лактоглобулина в пищевых добавках и необработанных пищевых продуктах, содержащих их.
- Более чувствительный анализ с конкурентным RIDASCREEN® Gliadin.

Дополнительную информацию о продукте и его применении можно получить у местного дистрибьютора или в компании R-Biopharm по адресу: sales@r-biopharm.de.

Обзор версий

Номер версии	Описание
2016-09-21	Первая версия
2021-07-01	- общие корректировки по тексту - главы 1, 6, 8, 11, 12, 13, 14
2022-05-06	Глава 10.2. Процедура анализа: ошибка из версии 2021-07-01 с «всего четыре цикла промывки» исправлена обратно на «всего три цикла промывки»

Значение символов

Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией

LOT Номер партии

Срок годности (год-месяц)

Температура хранения

REF Артикул

Количество измерений

Дата производства (год-месяц)

Производитель + адрес

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. Р-Биофарм не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.