



Arbeitsanleitung

Gliadin/Gluten ELISA

96/48 Tests

Enzymimmunoassay
zur quantitativen
Bestimmung von
Gliadin/Gluten in
Nahrungsmitteln

Best.-Nr.: GLU-E02/E04

Version: 18. Juli 2023

Dieses Dokument stellt eine kombinierte Arbeitsanleitung für die Produkte GLU-E02 (96 well) und GLU-E04 (48 well) dar.

**Gold Standard Diagnostics
Kassel GmbH**

Otto-Hahn-Str. 16
D-34123 Kassel

Tel.: +49 (0) 561 491742-0
Fax: +49 (0) 561 491742-20

info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.kassel.goldstandarddiagnostics.com

Empfindlichkeit (Gliadin), Bier	0,03 ppm
Empfindlichkeit (Gliadin), sonstige	0,3 ppm
Wiederfindung	85 - 98%
Inkubationszeit	60 min

Allgemeines

Gluten ist der Hauptbestandteil der Proteinfraction von Getreiden und setzt sich etwa zu gleichen Teilen aus den beiden Proteinklassen Prolamin (Gliadin) und Glutenin zusammen. Durch seine besonderen physikochemischen Eigenschaften und seinen niedrigen Preis findet sich Gluten nicht nur in Getreideprodukten, sondern auch in anderen Lebensmitteln wie Wurstprodukten und Eiscreme sowie in Medikamenten und Körperpflegemitteln, wo es als Bindemittel und Streckmittel eingesetzt wird.

Für einige Personen hat Gluten eine pathologische Wirkung (Zöliakie). Dieser Personenkreis ist auf eine streng glutenfreie Diät angewiesen. In der Europäischen Union ist ein Grenzwert von 20 ppm Gluten für als „glutenfrei“ deklarierte Produkte bzw. 100 ppm Gluten für mit „sehr geringer Glutengehalt“ gekennzeichnete Produkte festgelegt. Um Glutenrückstände detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Gold Standard Diagnostics Gliadin/Gluten Test** stellt ein hochsensibles Nachweissystem dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Gliadin-/Glutenrückständen in Backwaren, Babynahrung, Bier, Fleisch und Schokolade geeignet.

Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Gliadin/Gluten Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Gliadin - der löslichen Fraktion des Glutens - gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Gliadin enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Gliadin gerichteter zweiter Antikörper wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Gliadinkonzentration ist der Intensität der Färbung direkt proportional. Aufgrund der gleichen Anteile von Gliadin und Glutenin in Weizen-Gluten wird die Glutenkonzentration durch Multiplikation mit dem Faktor 2 berechnet.

Vorsichtsmaßnahmen

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipetenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.

4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

Reagenzien

Der Kit enthält Reagenzien für 96/48 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. Mikrotiterplatte mit 96/48 Kavitäten (12/6 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit anti-Gliadin.
2. Gliadin Standards: 1 x 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 2, 6, 20, 60 ppm Gliadin), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. Konjugat (anti-Gliadin-Peroxidase), 15/7,5 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. Verdünnungspuffer (TRIS), 60 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens 4 Wochen haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
9. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.

10. Arbeitsanleitung.

Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

Geräte

- 5 - 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Ultra-Turrax oder Mixer
- Zentrifuge

Reagenzien

- Ethanol (40%)
- bidestilliertes Wasser
- ggf. Magermilchpulver

Probenvorbereitung

Aufgrund der hohen Gefahr von Kreuzkontaminationen müssen alle verwendeten Arbeitsgeräte wie Spatel, Mörser, Glasgefäße etc. vor und nach jeder Probe **gründlich gereinigt** werden. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vor-extrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für Bierproben angewandt werden:

1. Bier durch z.B. Ultraschall entgasen.
2. 100 µL Bier werden mit 4,9 mL verdünntem Probenverdünner verdünnt.
3. Die Proben werden bei mindestens 2500 g für 10 min zentrifugiert, der partikelfreie Überstand wird im Test verwendet.

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle übrigen Arten von Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchgemischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 10 mL 40%igem Ethanol suspendiert. Bei Extraktion Tannin-haltiger Proben wie z.B. Schokolade wird vor der Suspension zusätzlich 1 g Magermilchpulver hinzugefügt. Anschließend wird die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.
3. Die Proben werden bei mindestens 2500 g für 10 min zentrifugiert. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Die partikelfreie Lösung wird anschließend 1:50 mit **verdünntem** Probenverdünner verdünnt (z.B. 20 µL Überstand und 980 µL Probenverdünner).

Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit Probenverdünner weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Testdurchführung

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bidestilliertem Wasser **verdünnt** werden.

Die **gebrauchsfertigen** Standards sollten in jedem Fall im Doppelansatz bestimmt werden. Bei größeren Mengen von Proben sollten die Standards einmal vor und einmal nach den Proben pipettiert und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen werden.

Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen.

Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Gliadin-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.

11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

Berechnung der Ergebnisse

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ppm (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppm für Gliadin abgelesen. **Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Gliadin-Gehalt der Probe, die Probenverdünnung ist bereits berücksichtigt. Für Bierproben muss die ermittelte Konzentration durch den Faktor 10 geteilt werden.** Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Gliadinegehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.
4. Um aus der gemessenen Gliadinkonzentration die Glutenkonzentration zu berechnen muss das Ergebnis abschließend mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Typische Standardkurve

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Gliadin (ppm)	OD-% von 60 ppm
60	100
20	62
6	27
2	13
0	6

Technische Daten

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Gold Standard Diagnostics Gliadin/Gluten Tests** beträgt 0,03 ppm Gliadin für Bier bzw. 0,3 ppm Gliadin für sonstige Proben.

Die untere Bestimmungsgrenze des **Gold Standard Diagnostics Gliadin/Gluten Tests** beträgt 0,2 ppm Gliadin für Bier bzw. 2 ppm Gliadin für sonstige Proben.

Da jede Matrix einen unterschiedlichen Einfluss auf die LOD haben kann und die Bandbreite der getesteten Matrices begrenzt ist, sollte im Bedarfsfall für jede zu untersuchende Matrix eine spezifische LOD ermittelt werden.

Alternativ können alle Ergebnisse unterhalb der LOQ als quantitativ „< LOQ“ angegeben werden.

Spezifität

Für die folgenden Nahrungsmittel wurde ein negatives Ergebnis und damit keine Kreuzreaktivität festgestellt:

Amaranth	Mais	Rindfleisch
Buchweizen	Milch	Schweinefleisch
Ei	Quinoa	Soja
Hirse	Reis	Teff
Kakao		

Für die folgenden Nahrungsmittel der obenstehenden Tabelle waren die Ergebnisse zwischen 0,5xLOQ und LOQ des Test Kits. Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass diese Matrices in Einzelfällen zu Ergebnissen oberhalb der LOQ führen:

Soja

Die Glutenkonzentration verschiedener Nahrungsmittel kann stark schwanken. Außerdem hängt die bestimmte Konzentration verschiedener Getreide von der Kreuzreaktivität des Prolamins mit dem Weizen-Gliadin-Antikörper ab. Die folgende Tabelle gibt Richtlinien für die Kreuzreaktivität verschiedener Getreide an.

Dinkel	13%
Gerste	14%
Hafer	0.06%
Roggen	63%
Triticale	56%
Weizen	100%

Präzision

Intra-Assay Präzision	5%
Inter-Assay Präzision	2 - 3%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Reiswaffel, Maisgrieß, Zartbitterschokolade, Wurst, Babynahrung und Bier) ergab Verdünnungslinearitäten von 95 - 115%.

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestocker Proben bestimmt:

Reiswaffel	97%
Maisgrieß	98%
Zartbitterschokolade	97%
Babynahrung	88%
Wurst	85%
Bier	96%