

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Gliadin/Gluten ELISA

REF

DEGLUE02



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. GENERAL INFORMATION	3
2. PRINCIPLE OF THE TEST	3
3. PRECAUTIONS	3
4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS.....	3
5. REAGENTS	4
6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED).....	4
7. SAMPLE PREPARATION	4
8. PROCEDURE.....	5
9. CALCULATION OF RESULTS.....	5
10. TYPICAL STANDARD VALUES.....	5
11. PERFORMANCE.....	6
1. ALLGEMEINES	7
2. TESTPRINZIP	7
3. VORSICHTSMAßNAHMEN	7
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN.....	8
5. REAGENZIEN	8
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN	8
7. PROBENVORBEREITUNG.....	9
8. TESTDURCHFÜHRUNG	9
9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	10
10. TYPISCHE STANDARDKURVE	10
11. TECHNISCHE DATEN	10
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	12

Sensitivity (Gliadin), beer	0.03 ppm
Sensitivity (Gliadin), others	0.3 ppm
Recovery	85-98%
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Gluten is the main part of the protein fraction of cereals and consists of nearly the equal amount of the protein compounds prolamin (gliadin) and glutenin. Because of its special physico-chemical attributes and its low price, gluten is not only contained in cereal products, but also in other food as sausage products and ice cream or in drugs and cosmetics as binder and filler.

For some persons, gluten has a pathological effect (coeliac disease). These people need to have a strict gluten free diet. In the European Union a maximum level of 20 ppm gluten is allowed for products declared as "gluten-free", and 100 ppm gluten for products declared as "very low gluten" respectively. Sensitive detection systems are required to determine gluten residues in foodstuff.

The **Demeditec Gliadin/Gluten ELISA** represents a highly sensitive detection system and is particularly capable of the quantification of gliadin/gluten residues in bakery products, baby food, beer meat and chocolate.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Gliadin/Gluten** quantitative test is based on the principle of the enzyme-linked immunosorbent assay. An antibody directed against gliadin – the soluble fraction of gluten - is bound on the surface of a microtiter plate. Gliadin containing samples or standards are given into the wells of the microtiter plate. After 20 minutes of incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugated second antibody directed against gliadin is given into the wells and after 20 minutes of incubation, the plate is washed again. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of gliadin is directly proportional to the colour intensity of the test sample. Because of the equal amounts of gliadin and glutenin in wheat gluten, the gluten concentration of the sample is calculated by multiplication with the factor 2.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipettes, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are found on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-gliadin.
2. **CAL 1 – 5** Gliadin Standards (0, 2, 6, 20, 60 ppm Gliadin): 1 x 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-gliadin-Peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (0.5 M H₂SO₄): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 10x** Sample dilution buffer (Tris): 1 x 60 mL as 10x concentrate, dyed red. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least one week. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
7. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 5 - 1000 µL-micropipets
- ELISA reader (450 nm)
- Ultra-Turrax or mixer
- Centrifuge
- Plastic bag to store unused microtiter strips.

Reagents

- Ethanol (40%)
- distilled water
- Skimmed milk powder when indicated

7. SAMPLE PREPARATION

Due to the high risk of cross-contamination all applied instruments like applicator, mortar, glass vials etc. have to be **cleaned thoroughly** before and after each sample. To identify possible cross-contamination caused by previous extractions it is strongly recommended to note the sequence of the extractions.

The following sample preparation should be applied for beer samples:

1. Degas beer, for instance by ultrasonics.
2. Dilute 100 µL of beer with 4.9 mL of **pre-diluted** sample dilution buffer.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at 2500 g. The particle-free supernatant has to be applied in the test procedure.

The following sample preparation should be applied for all other kinds of samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample collection, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 10 mL of 40% ethanol. If tannin-containing food like chocolate is extracted, 1 g of skimmed milk powder is added before suspension. Afterwards the suspension is mixed for further 5 min to ensure good homogeneity.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at 2500 g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated if necessary.
4. Afterwards the particle-free solution is diluted 1:50 in **pre-diluted** sample dilution buffer (for example 20 µL of solution in 980 µL sample dilution buffer).

If the results of a sample are out of the measuring range, further dilution with the **pre-diluted** sample dilution buffer is necessary. The additional dilution has to be considered when calculating the concentration.

8. PROCEDURE

The washing solution is supplied as 10x concentrate and has to be **diluted** 1+9 with double distilled water before use.

In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and once after the samples. For final interpretation the arithmetic mean is used for calculation. In consideration of GLP and quality management a duplicate measurement of samples is recommended.

The procedure is according to the following scheme:

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL **ready-to-use** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-gliadin-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (0.5 M H₂SO₄) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

The ready-to-use standards are prepared for a direct determination of sample concentrations. **The dilution of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered. In case of beer samples the resulting concentration has to be divided by 10.** Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ppm on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of gliadin in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. For calculating the corresponding gluten concentration, the result of gliadin has to be multiplied with factor 2.

10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 60 ppm standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Gliadin (ppm)	% binding of 60 ppm
60	100
20	62
6	27
2	13
0	6

11. PERFORMANCE

All performance data was evaluated based on Sigma-Aldrich Gliadin from wheat, Cat. no. G3375.

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Gliadin/Gluten test** is 0.03 ppm Gliadin for beer samples and 0.3 ppm Gliadin for all other samples. The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Gliadin/Gluten test** is 0.2 ppm Gliadin for beer samples and 2 ppm Gliadin for all other samples.

As matrices can have variable influence on the LOD in specific cases, and the range of matrices that was tested is of course limited, the end user if needed may evaluate its own LOD values depending on the matrices to be analyzed.

Alternatively, any results below LOQ should be just reported quantitatively as "< LOQ".

Cross-reactivity

For the following foods no cross-reactivity could be detected:

Amaranth	Egg	Quinoa
Beef	Milk	Rice
Buckwheat	Millet	Soy
Cocoa	Pork	Teff
Corn		

For the following commodities of the table above the results were between 0.5*LOQ and LOQ of the kit. So, it cannot be completely excluded that these matrices may provide values above the LOQ in specific cases:

Soy

The gluten concentration in various foods may vary significantly. Additionally, the determined concentration of different cereals depends on the cross-reactivity of the prolamin towards the wheat-gliadin antibody. The following table will give guidelines for the cross-reactivity of different cereals.

Cereals	Cross-reactivity [%]
Barley	14%
Oats	0.06%
Rye	63%
Spelt	13%
Triticale	56%
Wheat	100%

Precision

Intra-assay Precision	5%
Inter-assay Precision	2 - 3%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (rice wafer, corn semolina, dark chocolate, sausage, baby food and beer) resulted in a dilution linearity of 95% - 115%.

Recovery

Mean recovery was determined by spiking samples with different amounts of gliadin:

Rice wafer	97%
Corn semolina	98%
Dark chocolate	97%
Baby food	88%
Sausage	85%
Beer	96%

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

1. ALLGEMEINES

Gluten ist der Hauptbestandteil der Proteinfraktion 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 Binde- 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 **Demeditec Gliadin / Gluten Test** stellt ein hochsensibles Nachweissystem dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Gliadin-/Glutenrückständen in Backwaren, Babynahrung, Bier, Fleisch und Schokolade geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec 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 Gliadin-konzentration 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.

3. 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-Pipettenspitze 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.).

4. 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.

5. REAGENZIEN

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

1. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit anti-Gliadin.
2. **CAL 1 – 5** Gliadin Standards: 1 x 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 2, 6, 20, 60 ppm Gliadin), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Gliadin-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL 10x** Verdünnungspuffer (TRIS), 1 x 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. **WASH SOLN 10x** 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. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 5 - 1000 µL-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Ultra-Turrax oder Mixer
- Zentrifuge
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.

Reagenzien

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

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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

11. TECHNISCHE DATEN

Alle technischen Daten basieren auf der Verwendung von Sigma-Aldrich Gliadin from wheat, Cat. no. G3375.

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Gliadin/Gluten Tests** beträgt 0,03 ppm Gliadin für Bier bzw. 0,3 ppm Gliadin für sonstige Proben. Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec 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 ab. Die folgende Tabelle gibt Richtlinien für die Kreuzreaktivität verschiedener Getreide an.

Getreide	Kreuzreaktivität [%]
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 aufgestockter Proben bestimmt:

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta