



GlutenTox® SticksPlus for Reader

Quick test for the quantification of gluten content in food and beverages with GlutenTox® Reader.

REF

KIT3007 (KT-6476)

GlutenTox® SticksPlus for Reader

Contents

1. Intended purpose	2
2. Introduction	2
3. Test basis.....	2
4. Supplied materials.....	3
5. Necessary materials not supplied	4
6. Storage conditions and stability.....	4
7. Precautions	4
8. Sample preparation (food, beverages and other consumer products)... 4	
8.1. Solid samples	4
8.2. Liquid samples	6
9. Test implementation for extracted samples	6
10. Use of GlutenTox Reader	7
11. Visual interpretation of results	7
12. Quality control	8
13. Analytical features	8
14. Intellectual property.....	10
15. References	10

1. Intended Purpose

GlutenTox Sticks Plus for Reader is a rapid immunochromatographic test for the quantification of gluten, which is harmful for celiac patients, in food, beverages and other consumer products.

2. Introduction

Celiac disease is a disorder that damages the small intestine causing the atrophy of the intestinal villi, which interferes with the absorption of nutrients such as proteins, lipids, carbohydrates, mineral salts and vitamins. This disease is caused by an inappropriate response of the immune system to gluten (a mix of proteins found in cereals) from wheat, barley, rye, and to a lesser extent, from oat [ref. 1 and 2], leading to diarrhea, vitamin and mineral deficiencies, anemia and thin bones (osteoporosis). Celiac disease affects people of all ages.

Currently, the only treatment for celiac disease sufferers is a strict, lifelong gluten-free diet that presents great difficulties because gluten, in addition to being present in many foods, may also be found in food additives and preservatives.

According to the Codex Alimentarius Commission and the EC Regulation 41/2009 on the composition and labeling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten, food can be considered as “gluten-free” if its gluten content does not exceed 20 parts per million (ppm*).

* Milligrams of gluten per kilo of food.

3. Test basis

GlutenTox Sticks Plus for Reader is an immunochromatographic (lateral flow) test for the quantification of gluten in foods with different composition and levels of processing, from raw materials to heat-processed food, beverages and other consumer products. It is based on the anti-gliadin G12 antibody, which specifically recognizes the 33-mer peptide, the most immunogenic fraction of gluten [ref. 3]. This rapid test is useful in routine monitoring of gluten presence, to guarantee that products comply with a program of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), and to ensure proper labeling. It also allows quick decisions and corrective actions in case there is any risk of contamination along the production chain.

In all methods used for gluten analysis in a given sample, the gluten first has to be extracted from the sample's matrix. Extraction is one of the most critical points of the testing process. The extraction solution provided in this kit, Universal Gluten Extraction Solution (UGES), is suited for all types of food thanks to the combination of denaturing agents, reducing agents and solubilizers.

For the analysis of food containing polyphenols, including tannins, such as chocolate, tea, coffee, wine, purple corn and corn fiber, soy, berries, legumes like chickpeas and lentils, etc., it is necessary to use a special additive (**not included in this kit, see section 5**) that prevents the interference of the above mentioned compounds in the extraction process (see Figure 1). The same applies in the case of cosmetic products with antioxidant compounds such as vitamins A, C and E, carotenes, carotenoids, etc.

After the extraction, during the detection step, the gluten present in the sample reacts first with the anti-gliadin G12 antibody [ref. 3] conjugated to red colored particles, previously placed on the stick. The resulting complexes spread by capillarity through the stick and react with a second anti-gliadin antibody, also previously immobilized on the stick. If the result is positive, a RED line appears in the Test Zone (T) of the cassette. The absence of the RED line indicates a negative result. Whether or not gluten is present, the sample moves through the stick up to the Control Zone (C) where, if the test was properly performed, a GREEN line will appear, due to the accumulation of green colored particles also included in the stick. The presence of this GREEN line indicates that: 1) the sample volume was enough, 2) the sample flow was appropriate, and 3) the conjugate particles included in the test were properly released. If the GREEN line does not appear, the test should be considered invalid.

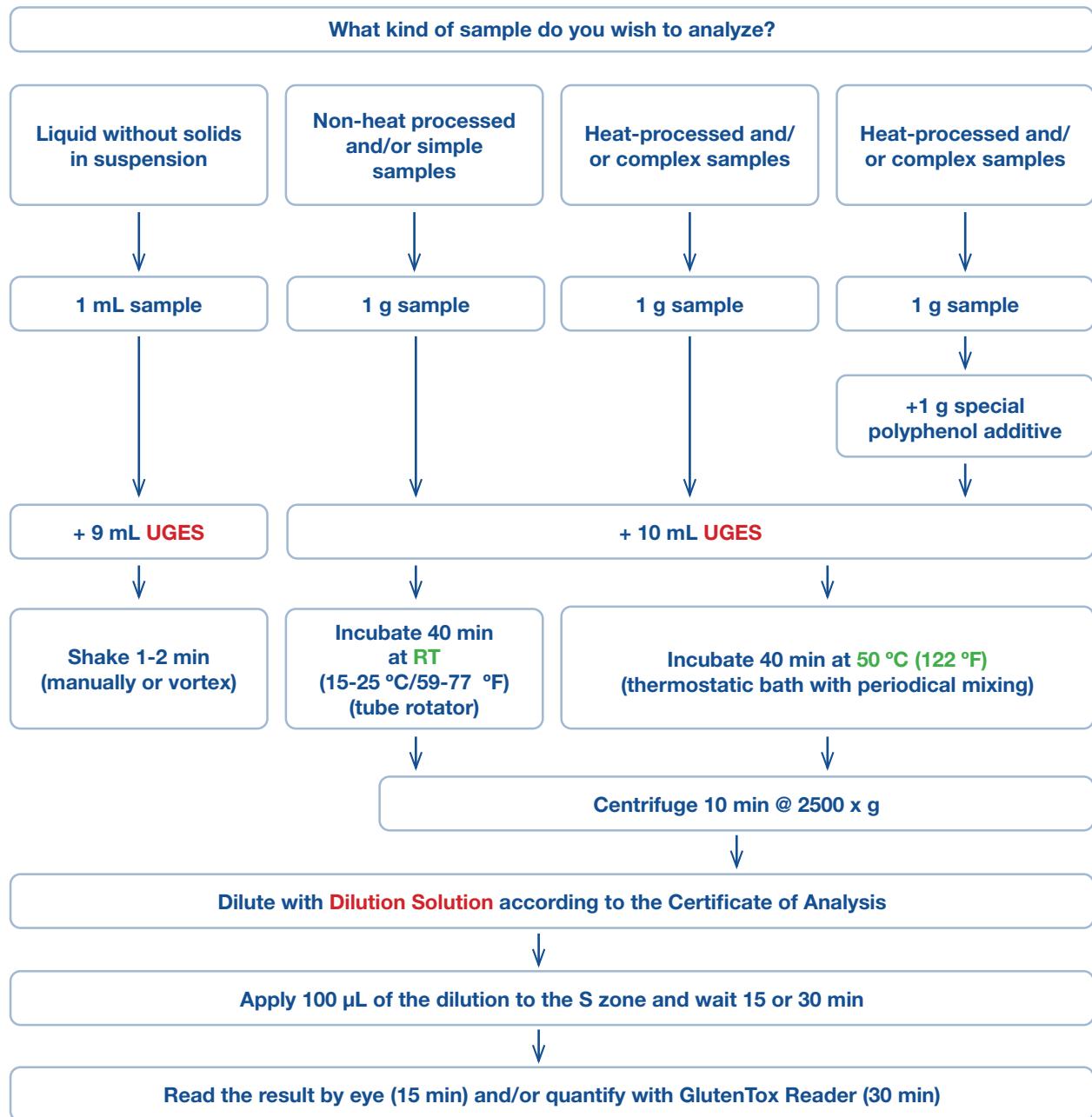


Figure 1. Scheme of use for GlutenTox Sticks Plus for Reader

This test allows two options for the reading of the results: a visual reading and a digital scanning with the GlutenTox Reader. GlutenTox Reader combines a highly sensitive optical detector with an integrated electronic system for efficient data processing. GlutenTox Reader is CE labeled and produced according to ISO 9001 and ISO 13485.

4. Supplied materials

- GlutenTox cassettes (12 cassettes)
- Universal Gluten Extraction Solution (UGES) (125 mL)
- Dilution Solution (15 mL)
- Positive Control (wholegrain oat flour contaminated with gluten, 10 g)
- Negative Control (corn flour, 10 g)
- Instructions for use

5. Necessary materials not supplied

- Analytical scale (accurate to 0.1 g)
- Thermostatic bath (not necessary for non-heat- processed samples with simple matrix composition)
- Capped centrifuge test tubes (>10 mL)
- Test vials (1.5 – 2 mL)
- Centrifuge (optional)
- Pipettes and disposable tips
- Disposable gloves
- Vortex mixer (optional)
- Watch/chronometer
- Tube rotator

For testing food containing polyphenols (including tannins) and cosmetic containing antioxidants, please acquire the Polyphenol Pack (KT-5320/KIT3008)* available from Hygiena TM. This pack contains:

- Special polyphenol additive (25 g).
- Positive Control containing polyphenols (cocoa powder with gluten, 10 g).
- Negative Control containing polyphenols (gluten-free cocoa powder, 10 g).

IMPORTANT NOTE!

- Foods rich in polyphenols or tannins are: chocolate, tea, coffee, wine, purple corn and corn fiber, soy, berries, legumes like chickpeas and lentils, etc.

IMPORTANT NOTE!

- The most common antioxidants in cosmetic products are vitamins A, C and E, carotenoids, etc.

*For more information contact your supplier.

6. Storage conditions and stability

For optimal test performance, GlutenTox Sticks Plus for Reader must be stored in its original packaging, between 15 °C - 25 °C (59 °F - 77 °F) and used before the expiration date printed on the label.

WARNING: The envelopes with the cassettes should not be opened until the time of use. Never freeze.

7. Precautions

- Only for testing food, beverages and other consumer products.
- Do not ingest the solutions (liquids) of the kit.
- Do not use after the expiration date.
- The use of non-powdered disposable gloves is recommended.
- Manipulate the cassettes with gloves or washed hands and do not touch the Sample Zone (S) within the cassette, to avoid accidental contamination of the test with gluten traces.
- If a sample is heterogeneous (e.g. a salad), make sure to take a representative part of each ingredient, and mix them to make a homogenous sample. If the gluten in the sample is unevenly distributed and you do not do this, a false negative could be obtained.

8. Sample preparation (food, beverages and other consumer products)

8.1. Solid samples

1. Homogenize, mill and/or triturate the sample.
2. Weigh 1 g of sample and add it to a test tube.

IMPORTANT NOTE!

- If the sample, solid or liquid, contains polyphenols, tannins (e.g. chocolate) or antioxidants, weigh and add 1 g of special polyphenol additive (KT-5320/KIT3008), to the sample tube and mix it vigorously to achieve complete homogenization of the mixture.

3. Add 10 mL of Universal Gluten Extraction Solution (UGES). Close the tube and mix to homogenize (for example, using a vortex mixer).
4. Depending on the complexity of the sample matrix and whether the food sample has been processed by heat or not, follow one of the 2 options below (see Figure 2):

a) Non-heat processed samples with simple matrix composition:

Incubate the sample at room temperature (15 - 25 °C / 59 - 77 °F) for 40 minutes with a tube rotator.

b) Heat-processed samples and/or with complex matrix composition:

Incubate the sample at 50 °C (122 °F) in a water bath for 40 minutes, shaking the tube periodically by tipping it over or using a vortex mixer.

IMPORTANT NOTE!

- If the type of sample is difficult to determine, we recommend heating at 50 °C (122 °F) (option b) to facilitate the extraction.

5. Allow separation of solids by settling or centrifugation (10 min at 2500 x g). Solid parts can alter the results.
6. Transfer the clarified supernatant to a clean tube.

IMPORTANT NOTE!

- Once extracted, the samples must be analyzed as quickly as possible.

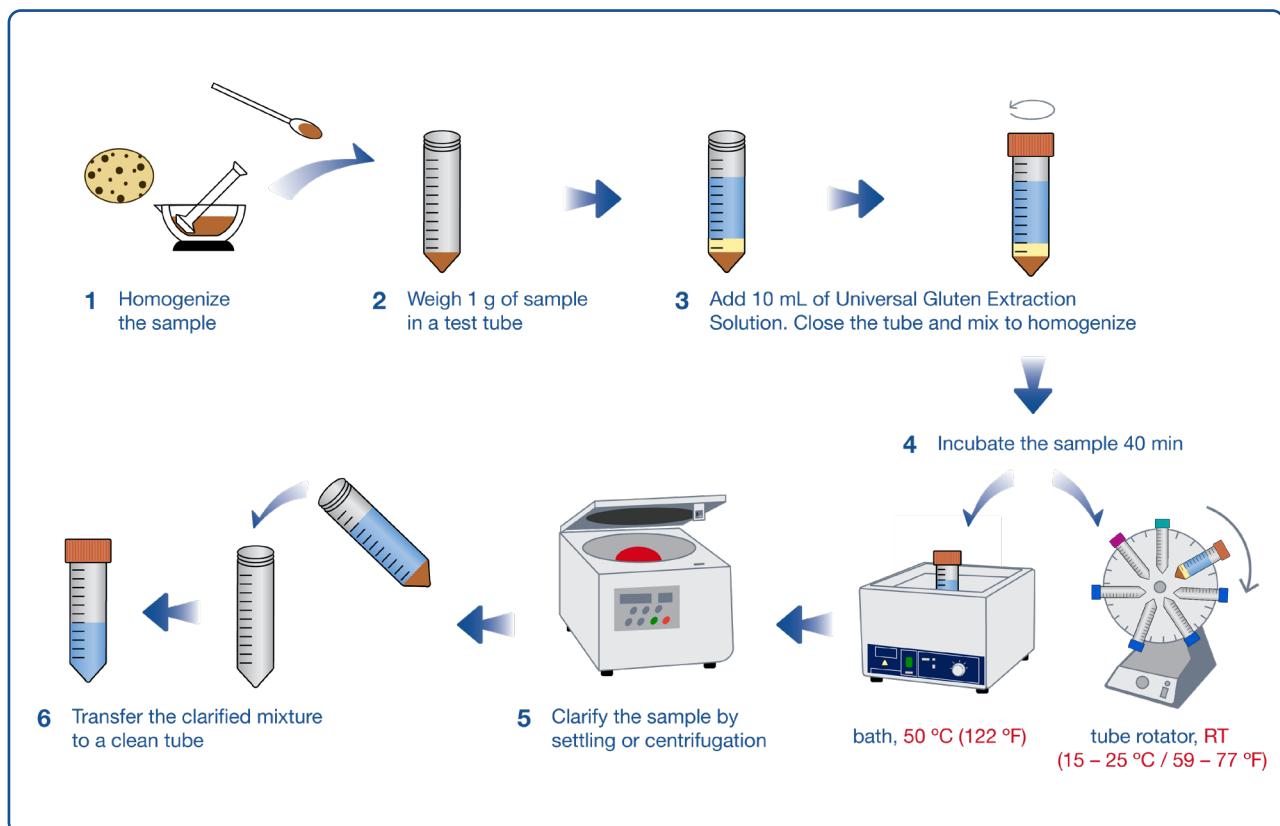


Figure 2. Scheme of the extraction procedure of the solid samples

8.2. Liquid samples

Liquid samples such as milk, juices, soft drinks, organic drinks (soy, rice, oat, spelt drinks), beers and broths do not require intensive extraction. For this reason, manually shaking for 1 or 2 minutes is sufficient and the extracts do not require a centrifugation or settling step.

- 1.** Add 1 mL of sample to a test tube.
- 2.** Add 9 mL of Universal Gluten Extraction Solution (UGES) and close the tube cap tightly.

IMPORTANT NOTE!

- **Liquid samples with polyphenols, tannins or antioxidants must be extracted according to the point 8.1 Solid Samples.**
- 3.** Shake the sample for 1-2 minutes, manually or using a vortex mixer.

IMPORTANT NOTE!

- **Once extracted, the samples must be analyzed as soon as possible.**

9. Test implementation for extracted samples

- 1.** Bring the extracted samples, controls, the Dilution Solution, and the cassettes to room temperature (15 - 25 °C / 59 - 77 °F).
- 2.** Dilute the extracted samples with Dilution Solution in test tubes or vials. The appropriate dilution corresponding to the batch of GlutenTox cassettes can be found in the Certificate of Analysis included in each kit. A final volume of 900-1000 µL is sufficient to perform the test.

IMPORTANT NOTE!

- **In samples with high levels of fat, avoid taking the upper layer that contains the fat.**

IMPORTANT NOTE!

- **The diluted samples must be analyzed as quickly as possible and the remaining material should be discarded.**
- 3.** Open the envelope of the cassette. If you wish to perform positive and negative controls, you will need one cassette for each control.
- 4.** Add 100 µL of the diluted sample or control into the Sample Zone (S) of the cassette.
- 5.** Wait 15 minutes and read the result on the cassette (see section 11).
- 6.** To quantify the gluten in the sample, wait at least 30 minutes (and not longer than 2 hours) before introducing the cassette into the GlutenTox Reader.

10. Use of the GlutenTox Reader

The Reader is designed exclusively for the quantification of gluten content with GlutenTox Sticks cassettes. The quantification potential of the kit ranges from 1 ppm to 40 ppm gluten. To quantify your sample, follow these steps:

1. At least 30 minutes after adding the sample to the cassette, insert the cassette into the cassette holder and in the Reader.



2. When using the Reader in stand-alone mode, enter the identification data of the sample in the device and press "measure" to start the reading. The result will appear on the screen as "ppm of gluten".
3. When using the GlutenTox Reader while plugged into a computer, use the provided LF Software to identify the sample and start the reading.

IMPORTANT NOTE!

- Before performing the test and the quantification of the results, make sure the method installed in your GlutenTox Reader is the right one for the lot number of the cassettes that you plan to use. Methods are available at www.hygiena.com.

11. Visual interpretation of results

For quantification with GlutenTox Reader, see section 10. For visual interpretation of the results, it is enough to wait 15 min after adding the sample to the cassette. A result can be:

NEGATIVE: A single GREEN line (control line) appears in the Control Zone (C) of the cassette. The sample contains less than 1 ppm of gluten.

POSITIVE: In addition to the control line (GREEN), a RED line appears in the Test Zone (T). Sample contains more than 1 ppm of gluten and is quantifiable with GlutenTox Reader.

INVALID: The control line (GREEN) does not appear, whether or not the test line (RED) appears. The most common causes for the appearance of an invalid result are adding an insufficient (<100 µL) volume of sample to the cassette, performing an incorrect procedure, or deterioration of the kit reagents. In the case of an invalid result, it is necessary to revise the procedure and repeat the experiment with a new cassette. If the problem persists, please contact your supplier.

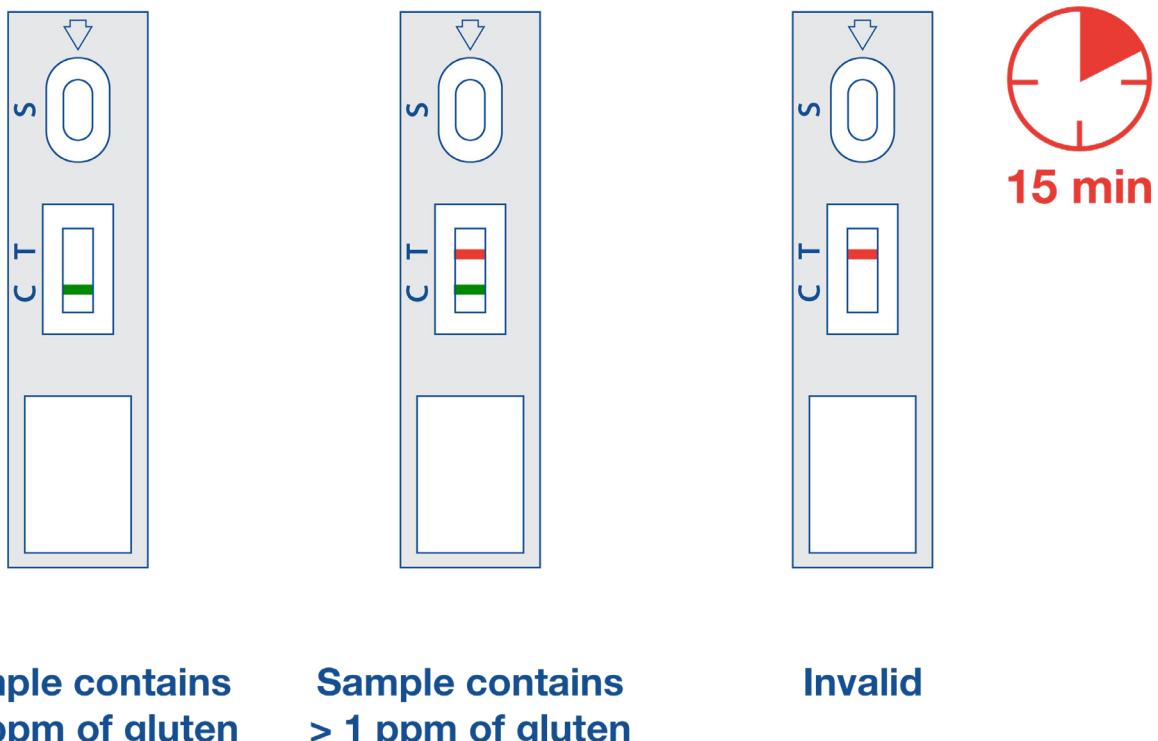


Figure 3. Visual interpretation of results

12. Quality control

Internal procedural quality control is included in the test. The green line in the Control Zone (C) is a built-in feature that indicates both a sufficient volume and a correct flow of the sample, with proper release of the conjugate particles. In addition, the kit includes Positive and Negative Controls that can be used, according to the instructions in point 8.1.2 and onwards, to confirm a correct test performance; these control materials must provide clear positive and negative results, respectively, if the test procedure was conducted properly.

13. Analytical features

Different assays have been carried out to characterize the main analytical parameters of the test: sensitivity and specificity.

Sensitivity

The detection limit of GlutenTox Sticks Plus for Reader is 1 ppm gluten. This value was obtained using different solutions of known concentrations of gliadin (one of the proteins of gluten) in the Dilution Solution.

Specificity

This test can specifically detect the presence of the toxic fraction of the prolamins of wheat (gliadin), rye (secalin), barley (hordein) and some varieties of immunogenic oats (avenin) that can therefore be harmful for celiac patients [ref. 2]. However, when the samples contain celiac-safe foods like rice, corn, soy, buckwheat, sesame, millet, teff, quinoa and amaranth, no positive signal is observed.

Internal Validation

To ensure the test's performance with all types of food and other materials such as cosmetics and personal care products, a broad range of commercial products have been tested. After analyzing the samples with GlutenTox Sticks in all types of matrices tested (see Table 1 and 2) the results were satisfactory and consistent with the gluten contents determined with the approved method of Codex Alimentarius.

Table 1. Food samples tested for validation of GlutenTox Sticks Plus

Group	Tested samples
Flour and semolina	Corn flour, precooked corn flour, corn semolina, rice flour, wheat flour, buckwheat flour
Milk products	Cow milk, milk with soluble fiber, milk with cereals, flavoured or natural yogurt, cheese spread, shredded cheese blend
Baked and cereal products	Toast, bread stick, biscuits (Rich tea), chocolate cookies, Madeleine, cake, cornflakes, pastas, corn pancakes, rice cakes, spelt cake, snacks
Meat products	Minced turkey, minced chicken, turkey sausage, chicken nuggets, pork sausages, chorizo, pork liver pâté
Fishery products	Cod and Hake
Vegetables	Lettuce mix, fried vegetables
Broth, soups, creams and dry mixes	Vegetable broth, chicken rice soup, dehydrated vegetable soup, stock cubes, vegetable soup, peanut butter
Sauces, dressing, spices and condiments	Yogurt salad dressing, ketchup, soy sauce, salad dressing, garlic powder, paprika powder, cooking cream
Sugars	Glucose syrup, powdered sugar
Prepared meals and dishes	Meatballs in sauce with peas, Meat Ravioli in Egg Dough, bean stew
Fatty foods	Olive oil, sunflower oil, butter, margarine, cream
Acidic foods	Tomato sauce, wine vinegar, apple cider vinegar, lemon juice
Beverages	Water, milk, fruit juices, beer, soy drinks, rice drinks, oat drinks, soft drinks

Table 2. Non-food samples tested for validation of GlutenTox Sticks Plus

Group	Tested samples
Personal care products	Bath gel, shampoo, deodorant, toothpaste, mouthwash
Cosmetics	Creams (face, body and hands), cleanser, lip balm
Others	Pet food (dry food, wet food), cleaning products, drugs (tablets, capsules and syrups)

14. Intellectual property

The immunoreagents used in this kit are commercialized under the exclusive license for biological material from the Spanish National Research Council (CSIC).

15. References

1. SHAN L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-2279.
2. COMINO I. et al.; "Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease."; Gut; 2011; 60:915-922.
3. MORÓN B., et al.; "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide", 2008;87:405-414.
4. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

GlutenTox® SticksPlus

for Reader

Notes



Americas:

Hygiena Headquarters
941 Avenida Acaso
Camarillo, CA 93012
1.805.388.8007

Hygiena Canada
2650 Meadowvale Blvd Unit 14
Mississauga, Ontario L5N 6M5
1.833.494.4362 (Toll-free) or
1.416.686.7962

Hygiena Mexico, S.A. de C.V.
Calle 3 Anegas 409 Bodega 5, Col. Nueva Industrial
Vallejo, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07700,
CDMX, México.
+52 (55) 5281-4108 y 5281-4146

International:

Hygiena International
8, Woodshots Meadow
Watford, Hertfordshire
WD18 8YU, UK
+44 (0)1923 818821

Hygiena (Shanghai) Trading Co., Ltd.
Rm.7K, No.518, Shangcheng Rd.
Pudong New District
Shanghai, China 200120
+86 21 51321081, 51321077/8/9

Hygiena Diagnóstica España S.L.
P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,
41900, Camas (Sevilla), Spain
+34 954 08 12 76

www.hygiena.com
enquiries@hygiena.com



GlutenTox® SticksPlus para Reader

Test rápido para la cuantificación del contenido de gluten en alimentos y bebidas con GlutenTox® Reader.

REF

KIT3007 (KT-6476)

GlutenTox® SticksPlus para Reader

Contenidos

1. Uso previsto	2
2. Introducción	2
3. Fundamento del test	2
4. Materiales suministrados	3
5. Materiales necesarios no suministrados	4
6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad	4
7. Precauciones.....	4
8. Preparación de muestras de alimentos, bebidas y otros productos de consumo ..	4
8.1. Muestras sólidas	4
8.2. Muestras líquidas	6
9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción	5
10. Uso del GlutenTox Reader	7
11. Interpretación visual de los resultados.....	7
12. Control de calidad	8
13. Características analíticas	8
14. Propiedad intelectual.....	10
15. Referencias.....	10

1. Uso previsto

GlutenTox Sticks Plus para Reader es un test inmunocromatográfico que permite la cuantificación de gluten inmunotóxico dañino para celíacos en todo tipo de alimentos, bebidas y otros productos de consumo.

2. Introducción

La celiaquía es una enfermedad que afecta al intestino delgado provocando la atrofia de las vellosidades intestinales, lo que interfiere en la absorción de nutrientes tales como proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales y vitaminas. Dicha enfermedad se debe a una respuesta inmunológica inapropiada al gluten (mezcla de proteínas presente en cereales) de trigo, cebada, centeno y, en menor medida, de avena [ref. 1 y 2], pudiendo producir diarrea, deficiencia de vitaminas y minerales, anemia y osteoporosis. La celiaquía afecta a personas de todas las edades.

En la actualidad, el único tratamiento del que disponen los enfermos celíacos es seguir una dieta estricta sin gluten durante toda su vida, un hecho que presenta grandes dificultades en la práctica, sobre todo si tenemos en cuenta que el gluten, además de estar presente en multitud de alimentos, lo está también en aditivos y conservantes.

Según la Comisión del Codex Alimentarius y el Reglamento (CE) 41/2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, para considerar un alimento "exento de gluten" (según el Codex) o "sin gluten" (según el Reglamento CE), éste debe tener un contenido de gluten que no sobrepase las 20 partes por millón (ppm*).

* Miligramos de gluten por kilogramo de alimento.

3. Fundamento del test

GlutenTox Sticks Plus para Reader es un test inmunocromatográfico (flujo lateral) que permite determinar la cantidad de gluten en muestras de alimentos de muy diversa naturaleza y grado de procesamiento, desde materias primas hasta alimentos procesados y/o tratados con calor y, también, de productos de consumo de riesgo para los celíacos. Está basado en el anticuerpo anti-gliadina G12, que reconoce específicamente el péptido 33-mer, la fracción más inmunogénica del gluten [ref. 3]. Este test es especialmente útil en el control rutinario de las empresas agroalimentarias para asegurar que sus productos cumplen con el programa de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), así como para garantizar su correcto etiquetado. Permite, además, la toma rápida de decisiones y acciones correctivas cuando se haya producido alguna contaminación a lo largo de la cadena de producción.

En todos los métodos de análisis de gluten el primer paso es la extracción del gluten de las muestras, siendo éste uno de los puntos más críticos. La Solución de Extracción UGES proporcionada en este kit es válida para todo tipo de alimentos gracias a la combinación de agentes disagregantes, reductores y solubilizantes.

Para el análisis de alimentos con polifenoles, incluyendo taninos, como son chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, legumbres como garbanzos y lentejas, etc., es necesario añadir un aditivo especial (**no incluido en este kit, ver sección 5**) en el proceso de extracción, con objeto de evitar las interferencias de estos compuestos (ver Figura 1). Lo mismo ocurre en el caso de productos cosméticos con compuestos antioxidantes como son las vitaminas A, C y E, los carotenos, carotenoides, etc.

Tras la extracción, durante el paso de detección, la muestra se añade al casete que contiene la tira inmunocromatográfica. El gluten presente en la muestra reacciona primero con un conjugado coloreado (anticuerpo monoclonal anti-gliadina G12 [ref. 3] unido a microesferas rojas), previamente incluido en la tira. Los complejos resultantes avanzan por capilaridad a lo largo de la tira y reaccionan con un segundo anticuerpo anti-gliadina, también previamente inmovilizado en la Zona Test (T) del casete donde, si el resultado es positivo, aparecerá una línea de color ROJO (línea de resultado). La ausencia de la línea ROJA indica un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de gluten, la muestra avanza por la tira, acumulándose en la Zona Control (C) donde, si el test se ha realizado correctamente, deberá aparecer una línea de color VERDE (línea de control) por acumulación de microesferas de este color también incluidas en la tira. La aparición de esta línea se utiliza para: 1) para verificar que se ha añadido un volumen de muestra suficiente, 2) indicar que el flujo ha sido apropiado; y 3) confirmar que las partículas de conjugado se han liberado correctamente. Si la línea VERDE no aparece, el test debe considerarse inválido.

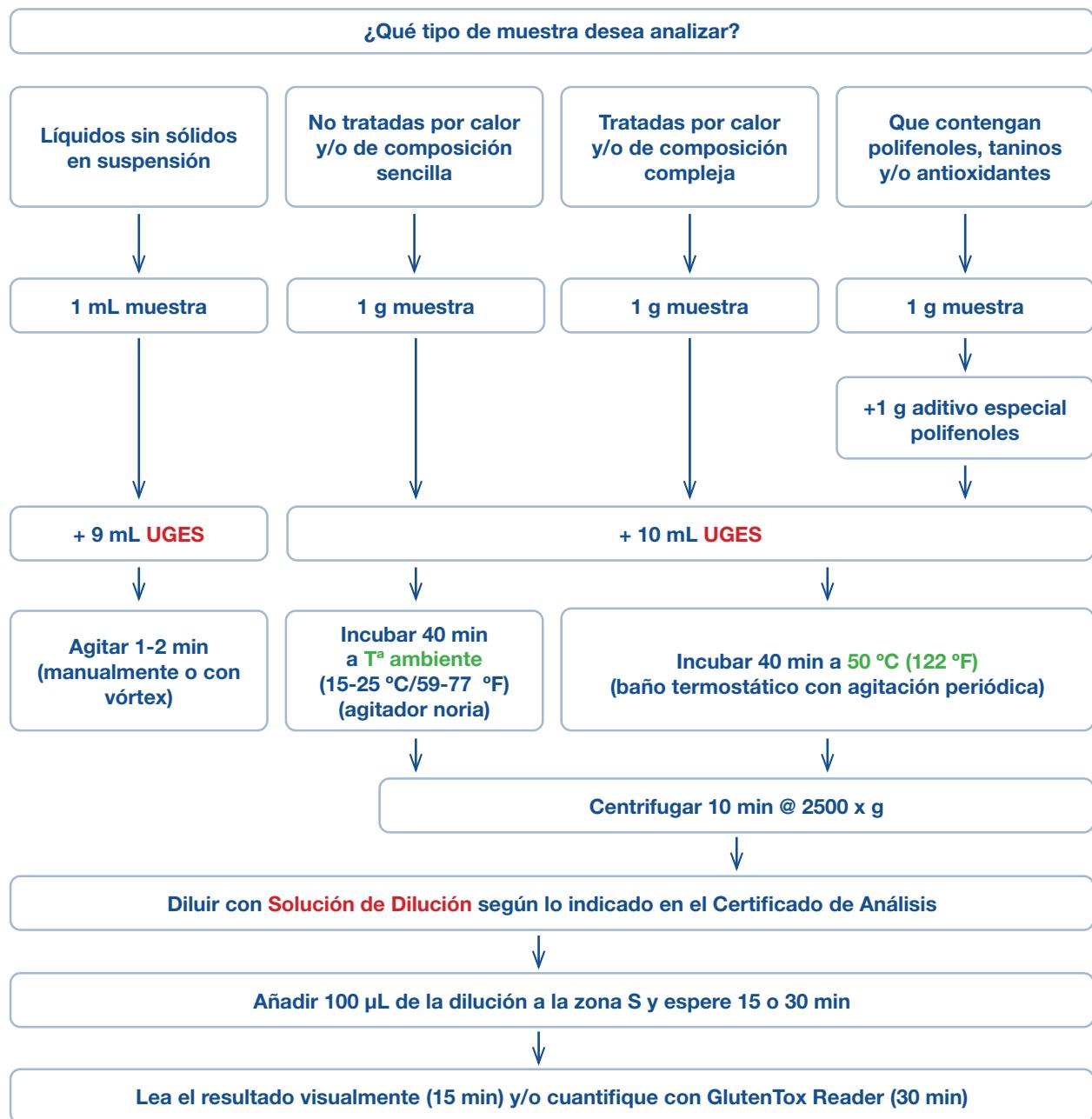


Figura 1. Esquema del protocolo de uso de GlutenTox Sticks Plus para Reader

Esta técnica permite dos opciones de lectura de resultados: lectura visual o lectura mediante el uso del lector GlutenTox Reader. El lector GlutenTox Reader combina un detector óptico de alta sensibilidad, un sistema electrónico integrado y un sistema efectivo de procesamiento de datos. Además, este lector cumple con la normativa europea de marcado CE y ha sido fabricado de acuerdo con las Normas ISO 9001 e ISO 13485.

4. Materiales suministrados

- GlutenTox cassetes (12 cassetes)
- Solución de Extracción UGES (Universal Gluten Extraction Solution) (125 mL)
- Solución de Dilución (15 mL)
- Control Positivo (harina integral de avena contaminada con gluten, 10 g)
- Control Negativo (harina de maíz, 10 g)
- Instrucciones de uso

5. Materiales necesarios no suministrados

- Balanza analítica (precisión 0,1 g)
- Baño termostático (no necesario en muestras no procesadas por calor y de composición simple)
- Tubos de ensayo con tapón (>10 mL)
- Viales de ensayo
- Centrifuga (opcional)
- Micropipetas y puntas desechables
- Guantes desechables
- Vortex (opcional)
- Cronómetro
- Agitador de noria o similar

Para analizar alimentos con polifenoles (incluyendo taninos) y productos cosméticos con antioxidantes adquiera el Polyphenol Pack (KT-5320/KIT3008)*, disponible en el catálogo de Hygiena TM. Este pack contiene:

- Aditivo especial polifenoles (25 g)
- Control Positivo especial polifenoles (cacao con gluten, 10 g)
- Control Negativo especial polifenoles (cacao sin gluten, 10 g)

¡NOTA IMPORTANTE!

- Alimentos ricos en polifenoles o taninos son: chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, legumbres como garbanzos y lentejas, etc.

¡NOTA IMPORTANTE!

- Los antioxidantes más frecuentes en productos cosméticos son las vitaminas A, C y E, los carotenos, carotenoides, etc.

*Para más información consulte con su proveedor.

6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Se debe almacenar el producto entre 15 °C - 25 °C en su envase original, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

AVISO: El envoltorio con los casetes no debe abrirse hasta el momento de su uso. Nunca lo congele o refrigerere.

7. Precauciones

- Solo para analizar alimentos, bebidas y otros productos de riesgo para los celíacos.
- No ingerir ninguna solución (líquido) ni aditivo del kit.
- No usar ningún elemento del kit después de la fecha de caducidad.
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo.
- Solo toque el casete con guantes o con las manos limpias. Evite, en todo caso, tocar la zona S del casete ya que esto puede conducir a la aparición de falsos positivos.
- Si un alimento consta de varias partes, asegúrese de tomar una muestra representativa de cada una y de preparar una muestra final homogénea. Si no lo hace así y el gluten estuviera distribuido desigualmente en el alimento, podría obtenerse un falso negativo.

8. Preparación de muestras de alimentos, bebidas y otros productos de consumo

8.1. Muestras sólidas

1. Homogenice y/o triture la muestra.
2. Pese 1 g de muestra y añádalo a un tubo de ensayo.

¡NOTA IMPORTANTE!

- Si la muestra, sea sólida o líquida, contiene polifenoles, taninos (p. ej. chocolate, vino) o antioxidantes, pese y añada al tubo con la muestra 1 g de aditivo especial polifenoles (KT-5320/KIT3008) y agítelo vigorosamente para homogeneizar la mezcla.

3. Añada 10 mL de Solución de Extracción UGES. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex).

4. Dependiendo de la complejidad de la matriz de la muestra y de si la muestra de alimento ha sido procesada o no por calor, el proceso de extracción puede requerir o no tratamiento térmico (ver Figura 2):

a) Muestras no procesadas por calor y de composición simple:

Incubar la muestra durante 40 minutos a temperatura ambiente (15 - 25 °C) mediante el uso de un agitador de noria.

b) Muestras procesadas por calor y/o de composición compleja, o muestras con polifenoles, taninos o antioxidantes:

Incubar la muestra a 50 °C en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.

¡NOTA IMPORTANTE!

- Si el tipo de muestra es difícil de determinar, recomendamos el uso de calor (opción b) para facilitar la extracción.

5. Separe los sólidos presentes en la muestra por sedimentación o centrifugación (10 min a 2500 x g).

6. Transfiera el sobrenadante clarificado a un tubo limpio.

¡NOTA IMPORTANTE!

- Las muestras, una vez extraídas, deben analizarse tan pronto como sea posible.

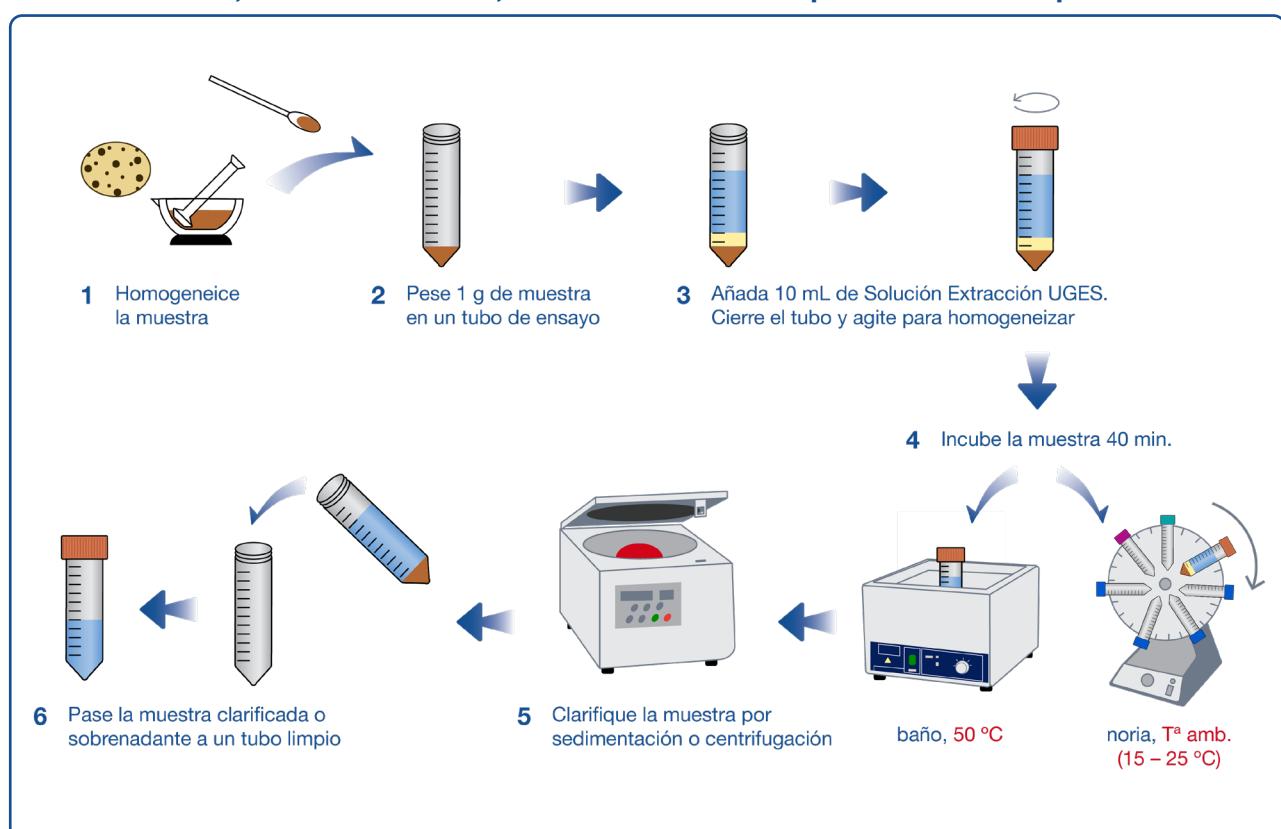


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

8.2. Muestras líquidas

Las muestras líquidas tales como leche, zumos, bebidas carbonatadas (refrescos), bebidas ecológicas (de soja, arroz, avena, espelta), cervezas y caldos no requieren una extracción intensiva, siendo suficiente con 1-2 minutos de agitación manual, y tampoco requieren de un paso final de sedimentación o centrifugación.

1. Añada 1 mL de muestra a un tubo de ensayo.
2. Añada 9 mL de Solución de extracción UGES y cierre bien el tubo.

¡NOTA IMPORTANTE!

- **Muestras líquidas con polifenoles, taninos o antioxidantes deben extraerse según lo indicado en el apartado 8.1 Muestras sólidas.**
- 3. Agite la muestra manualmente (de forma vigorosa) o mediante un vórtex, durante 1-2 minutos.

9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción

1. Acondicione a temperatura ambiente (15 - 25 °C) las muestras y controles clarificados, la Solución de Dilución y los cassetes GlutenTox.
2. Diluya la muestra con Solución de Dilución en tubos o viales de ensayo según lo indicado en el Certificado de Análisis que acompaña a cada kit. La dilución varía con el lote de cassetes GlutenTox. Un volumen final de 900-1000 µL es suficiente para realizar el ensayo.

¡NOTA IMPORTANTE!

- **En muestras con un elevado contenido en grasas, evite coger la capa de grasa sobrenadante.**

¡NOTA IMPORTANTE!

- **Las diluciones de la muestra deben analizarse en un corto espacio de tiempo, y el material restante no se puede conservar.**
3. Abra el envoltorio del casete. En caso de que desee realizar los controles positivos y negativos, necesitará un casete para cada prueba. Deposite con una pipeta 100 µL de la muestra diluida o del control correspondiente en la Zona S del casete.
 4. Espere 15 minutos y lea visualmente el resultado en el casete (ver sección 11).
 5. Para cuantificar el contenido en gluten de la muestra, espere al menos 30 minutos (y nunca más de 2 horas) antes de introducir el casete en el GlutenTox Reader.

10. Uso de GlutenTox Reader

El GlutenTox Reader está diseñado exclusivamente para la cuantificación de gluten con GlutenTox Sticks Plus para Reader, con un rango de detección de entre 1 ppm y 40 ppm de gluten.

1. Inserte el casete en el lector al menos 30 minutos después de añadir la muestra al casete.



2. En caso de utilizar el lector de forma autónoma, introduzca los datos de la muestra y pulse "measure". Inmediatamente comenzará la lectura de la tira. Los resultados aparecerán en la pantalla como "ppm de gluten".
3. En el caso de utilizar el lector asociado a un ordenador utilice el programa LF para asignar la identidad de la muestra y comenzar la lectura.

:NOTA IMPORTANTE!

- **Antes de proceder a la realización del test y a la cuantificación de los resultados, asegúrese de que el método analítico instalado en su GlutenTox Reader es el adecuado para el lote de cassetes. Métodos disponibles en www.hygiena.com.**

11. Interpretación visual de los resultados

Para cuantificar la cantidad de gluten en la muestra, use GlutenTox Reader (ver sección 10). Para una interpretación visual, es suficiente con esperar 15 minutos tras añadir la muestra. El resultado puede ser:

NEGATIVO: Aparece una sola línea VERDE (línea de control) en la Zona Control (C). La muestra contiene menos de 1 ppm de gluten.

POSITIVO: Además de la línea de control (VERDE) también aparece una línea ROJA (línea de resultado) en la Zona Test (T). La muestra contiene más de 1 ppm de gluten y es cuantificable con GlutenTox Reader.

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (ROJO). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente (< 100 µL) de muestra en la Zona S, un error durante el procedimiento o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si el problema persiste, debe contactar con su proveedor.

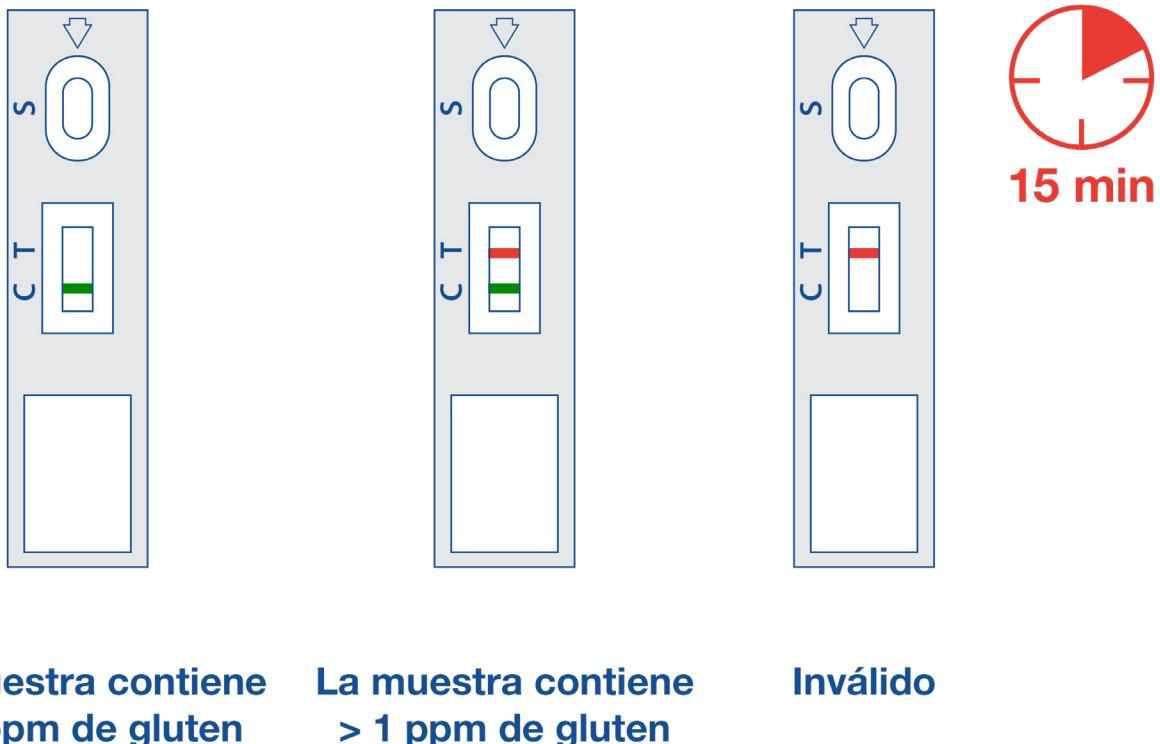


Figura 3. Interpretación visual de los resultados

12. Control de calidad

El control interno de funcionamiento viene incluido en el test. La línea verde que aparece en la Zona de Control (C) es el control interno que confirma que el volumen de muestra es suficiente, que el flujo ha sido adecuado y que se han liberado correctamente las partículas de conjugado. Además, el kit incluye un Control Positivo y un Control Negativo que se pueden procesar siguiendo las instrucciones desde el punto 8.1.2. en adelante para asegurarse de que está usando el kit de manera apropiada. Los resultados que debe obtener son: un resultado positivo con el Control Positivo y un resultado negativo con el Control Negativo.

13. Características analíticas

Se han llevado a cabo diferentes ensayos para caracterizar los principales parámetros analíticos del test: sensibilidad y especificidad.

Sensibilidad

El límite de detección de GlutenTox Sticks Plus para Reader es de 1 ppm de gluten. Este valor se ha obtenido analizando soluciones de gliadina (una de las proteínas del gluten) de concentración conocida, diluidas en Solución de Dilución.

Especificidad

El test es capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica para los pacientes celíacos de las prolaminas del trigo (gliadina), centeno (secalina), cebada (hordeína) y cantidades suficientemente elevadas de las de algunas avenas (aveninas) que pueden desencadenar la respuesta inmune en pacientes celíacos [ref. 2]. Sin embargo, no se observa señal positiva cuando las muestras contienen ingredientes vegetales seguros para los celíacos como arroz, maíz, soja, trigo sarraceno, sésamo, mijo, teff, quinoa y amaranto. Hasta ahora no se han reportado falsos positivos.

Validación interna

Para garantizar la capacidad del test de analizar todo tipo de alimentos (de naturaleza muy diversa), así como otros tipos de muestras no alimentarias se han ensayado diferentes muestras comerciales. Tras el análisis con GlutenTox Sticks Plus, en todos los tipos de muestras ensayadas (ver Tablas 1 y 2) se obtuvieron resultados satisfactorios y concordantes con el contenido de gluten determinado con el método validado por el Codex Alimentarius, lo cual demuestra la aplicabilidad del test sobre un amplio tipo de muestras.

Tabla 1. Muestras alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox Sticks Plus

Grupo	Muestras
Harinas y sémolas	Harina de maíz, harina de maíz precocida, sémola gruesa de maíz, harina de arroz, harina de trigo, harina de espelta
Leche y productos lácteos	Leche de vaca, leche con fibra soluble, leche con cereales, yogur natural y sabores, queso de untar, mezcla de quesos rallados
Productos de panadería y productos elaborados a partir de cereales	Pan de molde, palillos de pan, galletas María, galletas con chocolate, magdalenas, bizcocho, cornflakes, pastas, tortitas de maíz, tortitas de arroz, tortitas de espelta, snacks
Carnes y productos cárnicos	Carne de pavo picada, carne de pollo picada, embutido de pavo, nuggets de pollo, salchichas de cerdo, chorizo rojo, paté de hígado de cerdo
Pescados y productos de la pesca	Merluza, bacalao
Verduras	Mix de lechugas variadas, revuelto de verduras
Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas	Caldo de verduras, sopa de arroz con pollo, sopa de verduras deshidratadas, pastillas de caldo, crema de verduras, crema de cacahuete
Salsas, aderezos, especias y condimentos	Salsa para ensalada César, salsa de tomate, salsa de soja, aderezo ensalada, ajo en polvo, pimentón en polvo, nata líquida para cocinar
Azúcares	Glucosa líquida, azúcar en polvo
Comidas y platos preparados	Albóndigas en salsa con guisantes, raviolis al huevo con carne, fabada
Alimentos grasos	Aceite de oliva, aceite de girasol, mantequilla, margarina, nata líquida
Alimentos ácidos	Salsa de tomate, vinagre de vino, vinagre de manzana, zumo de limón
Bebidas	Agua, leche, zumo de frutas, cerveza, bebida de soja, bebida de arroz, bebida de avena, bebidas carbonatadas (refrescos)

Tabla 2. Muestras no alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox Sticks Plus

Grupo	Muestras
Productos de higiene personal	Gel de baño, champú, desodorante, pasta de dientes, enjuague bucal
Productos cosméticos	Cremas (cara, cuerpo y manos), desmaquillante, cacao o vaselina labial
Otros	Comida animal (pienso seco, comida húmeda), productos de limpieza, medicamentos (comprimidos, cápsulas y jarabes)

14. Propiedad intelectual

Los inmunoreactivos usados en este kit se comercializan bajo licencia exclusiva de material biológico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

15. Referencias

1. SHAN L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-2279.
2. COMINO I. et al.; "Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease."; Gut; 2011; 60:915-922.
3. MORÓN B., et al.; "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide", 2008;87:405-414.
4. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

GlutenTox® SticksPlus

for Reader

Notas



Americas:

[Hygiena Headquarters](#)
941 Avenida Acaso
Camarillo, CA 93012
1.805.388.8007

[Hygiena Canada](#)
2650 Meadowvale Blvd Unit 14
Mississauga, Ontario L5N 6M5
1.833.494.4362 (Toll-free) or
1.416.686.7962

[Hygiena Mexico, S.A. de C.V.](#)
Calle 3 Anegas 409 Bodega 5, Col. Nueva Industrial
Vallejo, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07700,
CDMX, México.
+52 (55) 5281-4108 y 5281-4146

International:

[Hygiena International](#)
8, Woodshots Meadow
Watford, Hertfordshire
WD18 8YU, UK
+44 (0)1923 818821

[Hygiena \(Shanghai\) Trading Co., Ltd.](#)
Rm.7K, No.518, Shangcheng Rd.
Pudong New District
Shanghai, China 200120
+86 21 51321081, 51321077/8/9

[Hygiena Diagnóstica España S.L.](#)
P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,
41900, Camas (Sevilla), Spain
+34 954 08 12 76

www.hygiena.com
enquiries@hygiena.com