



GlutenTox® ELISA RAPID G12

Kit for gluten determination in foodstuff

REF KIT3075

GlutenTox® ELISA RAPID G12

Kit for gluten determination in foodstuff

Contents

1. Intended use	3
2. Introduction	3
3. Test basis.....	3
4. Supplied materials.....	3
5. Materials not supplied	4
6. Storage conditions and stability.....	4
7. Precautions	4
8. Recommendations	5
9. Reagent preparation.....	5
10. Sample preparation.....	6
10.1 Solid and semisolid samples.....	6
10.2 Liquid samples	7
10.3 Swab samples.....	7
11. Test procedure.....	7
12. Results calculation	9
13. Quality control	10
14. Analytical features	10
15. Intellectual property.....	10
16. References	11
Annex 1. Recommended protocols.....	12

1. Intended Use

GlutenTox ELISA Rapid G12 is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of gluten*, which is harmful for celiac disease sufferers, in food and beverages.

* Not for hydrolyzed sources of gluten.

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 “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 ELISA Rapid G12 is a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) designed for the determination of the immunotoxic fraction of gluten in food samples.

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.

After the extraction, the sample's extract is added to a multi-well plate coated with a monoclonal anti-gliadin antibody (G12) that specifically recognizes the most toxic or immunogenic fraction of gluten. After the washing steps, the addition of a second monoclonal anti-gliadin antibody conjugated to HRP (A1-HRP) will allow to measure the signal. GlutenTox ELISA Rapid G12 is a direct method. The higher the concentration of gluten present in the sample, the more intense the signal will be.

The ELISA Sandwich is a usual technique for the analysis of substances found at very low concentrations. The high specificity of the antibodies used in this test [ref. 3], allows this method to precisely quantify gluten in food samples.

4. Supplied materials

- 12 multi-well G12-coated strips (dividable; 8 wells each)
- Wash Solution 10x (40 mL)
- Dilution Solution (120 mL)
- Extraction Solution (200 mL)
- GlutenTox A1-HRP conjugated antibody (15 mL)
- Substrate Solution (12 mL)
- Stop Solution, H_2SO_4 1M (12 mL)
- 5 GlutenTox Standards (1.56 to 50 ng/ml gliadin, 1.25 mL each)
- Negative control (1.25 mL)
- Positive control (1.25 mL)
- Internal control (1.25 mL)

All reagents supplied are ready to use, except the 10x concentrated Wash Solution stock.

5. Materials not supplied

- Analytical scale (accurate to 0.1 g)
- Capped centrifuge test tubes (> 10 mL)
- Test vials (1.5-2 mL)
- Disposable gloves
- Distilled water
- Timer
- Vortex mixer
- Tube rotator (or similar mixing device)
- Centrifuge
- Thermostatically-controlled water bath
- Automatic microplate washer (recommended)
- Mono-channel pipettes, multi-channel pipettes (recommended), pipette tips
- ELISA plate reader (with 450 nm filter)

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

- Special polyphenol additive (ASY3044) (25 g)
- Positive Control containing polyphenols (ASY3043) (cocoa powder with gluten, 10 g)
- Negative Control containing polyphenols (ASY3042) (gluten-free cocoa powder, 10 g)

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

* For more information contact your supplier.

6. Storage conditions and stability

- Store all kit reagents at 2 – 8 °C (36 - 46 °F). Do not freeze.
- Reagents will remain stable until the expiration date, provided they are stored and manipulated correctly.
- Check the expiration date of the components of the kit before starting the test. Do not use any reagent or the multi-well G12-coated strips after the expiration date.
- Unused multi-well strips should be kept in the desiccant-containing aluminum bag, hermetically sealed and stored at 2 – 8 °C (36 – 46 °F).
- Diluted Wash Solution remains stable for two weeks at 2 – 8 °C (36 – 46 °F).

7. Precautions

- Carefully read this manual before performing the assay.
- It is recommended that the instructions described in the manual be followed exactly as described.
- This kit is designed for professional use only.
- Do not mix components from various kits or use reagents or solutions other than those supplied.

- It is recommended that this kit be used with non-powdered disposable gloves. Touching multi-well strips with your hands should be avoided.
- Incomplete sealing of the aluminum bag containing the multi-well strips can result in the accumulation of humidity inside the bag and reduced assay accuracy.
- The Substrate Solution is photosensitive; avoid prolonged light exposure.
- The Stop Solution contains sulphuric acid (H_2SO_4); avoid its ingestion, inhalation, or contact with skin or eyes. Avoid exposure to basic solutions, metals, or other compounds that could react with acids.

8. Recommendations

- Each sample material should be analyzed at least in duplicate.
- Use gluten-free and gluten-containing (spiked) samples as test controls.
- Due to the high variability of food types, matrix effects cannot be excluded. To ensure an accurate result, the analysis of spiked samples is recommended.
- In the production of foods such as beer or sourdough, gluten proteins are fragmented. In sandwich ELISAs protein fragments lead to a reduced recovery. Such samples should be analyzed with a competitive ELISA test system.

General considerations

- Samples tested negative could still contain a gluten contamination below the limit of detection of the assay.
- Due to the high variability of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.) proteins may be altered or fragmented; this may have an impact on the recovery/cross reactivity.
- For the evaluation of the cross reactivity, only one exemplary sample of each matrix was analyzed. All cross reactivities and exemplary matrices are described in the internal validation report. Other samples may show a different result.

WARNING! It is necessary to work carefully and meticulously to obtain exact and reproducible results. A variety of factors are involved in successful assay completion including the initial temperature of the reagents, assay incubation times, precision and reproducibility of liquid handling (pipetting) and quality of the washing technique.

9. Reagent preparation

WARNING! Allow all the reagents to reach room temperature (15 – 25 °C / 59 – 77 °F) before starting the assay, except for GlutenTox A1-HRP conjugated antibody, which should be kept at 2 – 8 °C (36 – 46 °F) until use.

Preparation of 1x Wash Solution

The Wash Solution is supplied as a 10x concentrate, which must be diluted 1:10 in distilled water prior to use. To dilute all the supplied solution, add the 40 mL of 10x Wash Solution to 360 mL of distilled water. If only part of the Wash Solution is needed at a given time, a smaller quantity can be prepared by following a 1:10 dilution (for example, 60 mL of 1x Wash Solution, enough for a 16-well assay, can be prepared by adding 6 mL of 10x Wash Solution to 54 mL of distilled water).

Once diluted, the Wash Solution remains stable for 2 weeks if stored at 2 – 8 °C (36 – 46 °F).

10. Sample preparation

Food samples need to undergo an extraction process in order to make the immunotoxic gluten peptides accessible for subsequent analysis.

The protocol for performing the extraction of the samples depends on the type of food to be analyzed.

NOTE: Once extracted, samples must be analyzed as soon as possible.

10.1. Solid and semisolid samples:

10.1.1. Homogenize, mill and/or triturate the sample.

10.1.2. Weigh 0.5 g of sample and add it to a test tube.

NOTE: If the sample, whether solid or liquid, contains polyphenols, tannins or antioxidants, weigh and add to the tube containing the sample 0.5 g of the special additive for polyphenols (KIT3008) and shake vigorously to mix. (See Annex 1 A for a detailed protocol).

10.1.3. Add 5 mL of Extraction Solution. Close the tube and mix vigorously using a vortex mixer or similar device.

10.1.4. 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:

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 mild agitation (for example, using a tube rotator).

b) Heat-processed sample and/or with complex matrix composition, or samples containing polyphenols, tannins or antioxidants (Annex 1 A)

Incubate the sample at 50 °C (122 °F) in a water bath for 40 minutes; periodically mix the sample by inverting or vortexing the tube.

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

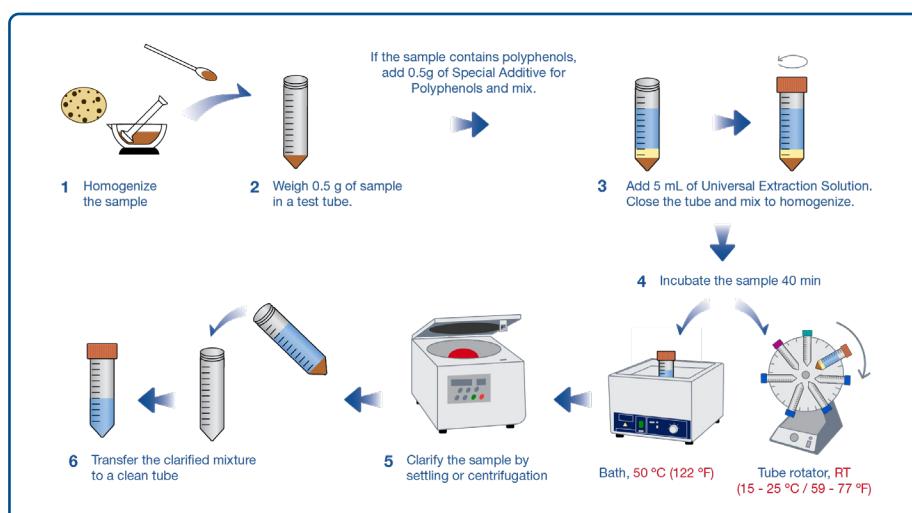


Figure 1. Scheme of the extraction procedure for solid samples

10.1.5. Centrifuge the suspension at 2500 x g for 10 minutes and transfer the supernatant to a clean tube.

10.2. Liquid samples:

NOTE: Liquid samples with polyphenols, tannins or antioxidants have to be analyzed according to the point 10.1. Solid and semisolid samples.

Liquid samples without emulsions or solids do not require intensive extraction. Manual shaking or vortexing is enough, and the final step of centrifugation is not required.

10.2.1. Shake the sample to homogenize.

10.2.2. Add 0.5 mL of sample in a test tube.

10.2.3. Add 4.5 mL of Extraction Solution. Close the tube and shake for 2 minutes manually or using a vortex mixer.

10.3. Swab samples

NOTE: This procedure can only be used for a qualitative detection of gluten (absence/presence) in a surface.

Swab sample results should not be used for quantification. For surface sample collection, swab firmly and thoroughly a square of 16 cm²/2.46 inch² of the selected surface (see Figure 2). Cut the tip of the swab and put it in a 1.5 mL vial, add 1mL of Dilution Solution and vortex for 1 minute.

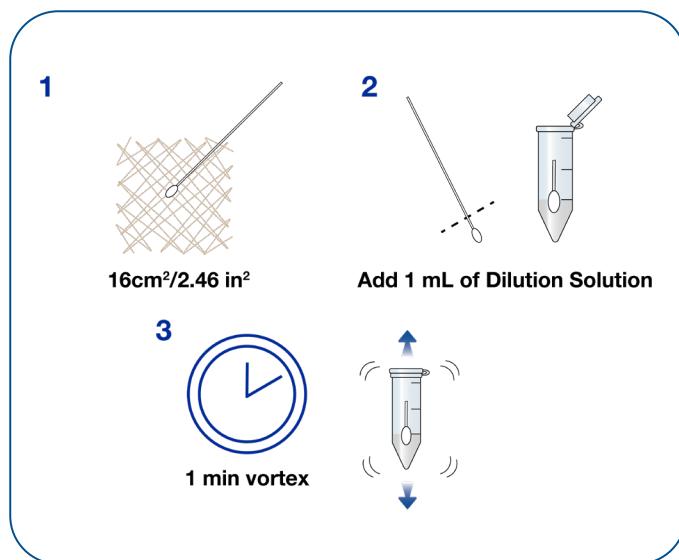


Figure 2. Scheme of the swab sample preparation

Follow the instructions from point 11.3 in the Test Procedure Section.

11. Test procedure:

11.1. All assay reactions (GlutenTox Standards, positive control, negative control, internal control and samples) should be performed at least in duplicate. The volumes given below have been calculated using two wells for each reaction.

11.2. Prepare appropriate dilutions of the extracted, clarified samples, using the provided Dilution Solution, and polypropylene vials. A final volume of 300 µL is enough for the analysis of each sample. Extracted sample dilutions should be analyzed as soon as possible and any unused material should be discarded.

		Example of dilution	
Expected amount of gluten	Dilution	Sample extract	Dilution Solution
Gluten-free (<20 ppm)	1:20	50 µL	950 µL
Low gluten (20 to 100 ppm)	1:50	20 µL	980 µL
High gluten (100 to 200 ppm)	1:200	5 µL	995 µL

Depending on the expected gluten content of the sample, prepare dilutions according to the following table:

11.3. Add 100 µL of each standard, positive control, negative control, internal control and sample dilution to separate wells, in duplicate (two wells each). Cover the wells and incubate at room temperature (15-25 °C / 59-77 °F) for 30 min.

11.4. Washes: eliminate well contents by inverting the plate; add 300 µL of diluted Wash Solution to all wells; incubate for three seconds. Repeat this sequence four more times, for a total of five washes. **Perform the washes in the same order used to load the wells in the previous step.** After the last wash, invert the plate and tap it on an absorbent material (for example, a clean paper towel) to eliminate the remaining liquid. An automatic washer is recommended for a higher reproducibility of the results.

11.5. Add 100 µL of the GlutenTox A1-HRP conjugated antibody to each well. Cover the wells and incubate at room temperature (15-25 °C / 59-77 °F) for 30 minutes.

NOTE: GlutenTox A1-HRP conjugated antibody should be pipetted following good laboratory practices and in the most aseptic conditions possible. To avoid potential microbial or chemical contamination, never return unused GlutenTox A1-HRP conjugated antibody to its original container.

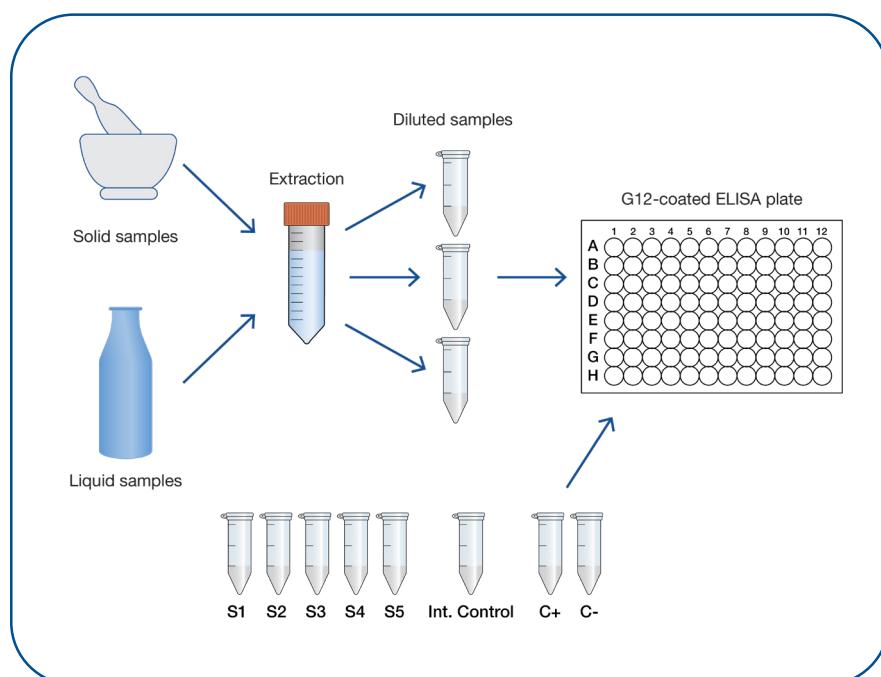


Figure 3. Scheme of the analysis procedure

11.6. Wash the plate five times with 300 µL of Wash Solution per well, as indicated in step 11.4.

11.7. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Cover the wells and incubate at room temperature (15-25 °C / 59-77 °F) for 30 minutes **in the dark**.

11.8. Add 100 µL of Stop Solution to each well. **Follow the same order used when adding the Substrate Solution in the previous step.**

11.9. Using an ELISA microplate reader with a 450 nm filter, read the absorbance (OD) of each well as soon as possible, within 30 minutes of the addition of the Stop Solution.

12. Results calculation

12.1. Determine average absorbance values for the replicates of each condition.

12.2. Prepare a standard curve (see Figure 4) by plotting gliadin concentrations of each GlutenTox standard (y-axis) versus the respective absorbance values (x-axis) obtained from the calibration standards using an appropriate software (for example Excel). Please contact Hygiena Diagnóstica España to obtain the Excel template.

12.3. Calculate the equation that defines the standard curve by second-order polynomial regression using a suitable software (for instance Excel). An example is shown in Figure 4.

12.4. Enter into this equation the sample absorbance values obtained for each sample to obtain gliadin concentrations of the sample dilutions.

12.5. Enter the gliadin concentration value obtained into the following formula to obtain the amount of gluten in ppm.

$$\text{ppm gluten} = (\text{ng/mL gliadin} \times \text{dilution}^* \times 2)/100$$

*dilution performed on Step 11.2.

NOTE: When the absorbance (OD) of the sample is not within the values covered by the standard curve, the assay should be repeated using different dilutions.

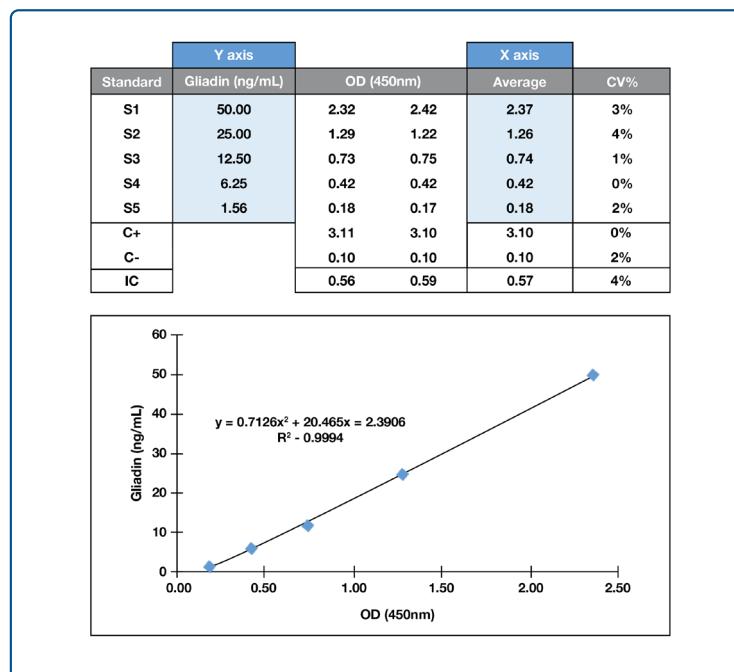


Figure 4. Example of the Standard Curve

13. Quality control

The performance of the assay can be controlled in two ways:

- The Internal Control included in the kit must be used as a sample ready to use, without any further dilution. The analytical value of the internal control will be defined in the Certificate of Analysis of each specific batch. The value of an internal control batch obtained in an assay must have a maximum deviation of $\pm 15\%$ of the analytical value of the same internal control batch defined in the Certificate of Analysis.
- The absorbance of the positive control must be above that obtained for the Standard 1 (S1, 50 ng/mL of gliadin) and the absorbance of the negative control must be below that obtained for the Standard 5 (S5, 1.56 ng/mL of gliadin).

If any of these controls fail, the assay should be repeated.

14. Analytical features

Sample dilution	Lower quantification limit (ppm gluten)	Upper quantification limit (ppm gluten)
1:20	0.6	20
1:50	1.6	50
1:100	3.1	100
1:200	6.2	200

Tests have been performed to determine the main analytical characteristics of the assay:

Sensitivity

The limit of detection (LoD) of the assay is 0.3 ppm gluten/0.15 ppm gliadin. The limit of quantification (LoQ) is 0.6 ppm gluten/0.3 ppm gliadin. The range of quantification of the assay is 0.6-200 ppm gluten (0.3-100 ppm gliadin). Depending on the sample dilution analyzed, the quantifiable amount of gluten in each sample will vary within the range of absorbance values of the standard curve (see example in the following table):

The limit of detection (LoD) of the swab sample method is 1.8 ng gliadin/cm² (3.6 ng gluten/cm²). However, this result cannot be extrapolated to a final concentration of gluten ppm on the surface.

Specificity

This test is based on the G12 and A1 monoclonal antibodies, which can specifically detect the presence of the immunotoxic fraction of the prolamins of **wheat** (gliadin), **rye** (secalin), **barley** (hordein) and some rare varieties of immunogenic **oats** (avenin) that can therefore be harmful for celiac patients [ref. 2]. However, when samples contain celiac-safe foods like rice, corn, soy, buckwheat, sesame, millet, teff, quinoa and amaranth, no positive signal is observed.

15. Intellectual Property

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

16. References

1. SHAN L., *et al.*; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-9.
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.*; "Toward the Assessment of Food Toxicity for Celiac Patients: Characterization of Monoclonal Antibodies to a Main Immunogenic Gluten Peptide"; PLoS ONE 2008; 3 (5): e2294.

ANNEX 1. Recommended protocols

A-Extraction procedure for foods and drinks containing polyphenols, tannins or antioxidants

- 1.1. Homogenize, mill and/or triturate the sample.
- 1.2. Weigh 0.5 g or add 0.5 mL of sample in a test tube.
- 1.3. Add 0.5 g of the additive for polyphenols. Mix vigorously using a vortex mixer until the two kinds of powders or the powder and the liquid form a homogeneous mixture.
- 1.4. Add 5 mL of Extraction Solution.
- 1.5. Mix vigorously using a vortex mixer until complete disaggregation. With some samples it can be helpful to pre-heat the sample for two minutes at 50 °C/122 °F and then vortex again until complete disaggregation.
- 1.6. Once completely disaggregated, use option 10.1.4 b) for incubation (40 minutes at 50 °C/122 °F) and follow the rest of the procedure as usual.

B-Extraction procedure for fatty foods.

- 1.1. Homogenize, mill and/or triturate the sample.
- 1.2. Weigh 0.5 g or add 0.5 mL of sample in a test tube.
- 1.3. Add 5 mL of Extraction Solution.
- 1.4. Use a weighing spoon or pallet to physically help the disaggregation of the sample until a suspension with particles below 2mm is achieved. The nature of those samples will avoid the simple disaggregation by vortexing, therefore an external help for that is needed. This procedure can render an increase of recovery up to 20%.
- 1.5. Once completely disaggregated, use option 10.1.4 a) for incubation [40 minutes at room temperature (15– 25 °C /59 – 77 °F) with mild agitation] and follow the rest of the procedure as usual.

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

Notes

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

Notes

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

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 21-5132-1081, +86 21-5132-1077,
+86 21-5132-1078

Hygiena Diagnóstica España S.L.
P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,
41900, Camas, Sevilla, Spain
+34 954-08-1276

www.hygiena.com
enquiries@hygiena.com



GlutenTox® ELISA RAPID G12

Kit de determinación de gluten para muestras alimenticias

REF KIT3075

GlutenTox® ELISA RAPID G12

Kit de determinación de gluten para muestras alimenticias.

Contenidos

1. Uso previsto	3
2. Introducción	3
3. Fundamento del test	3
4. Materiales suministrados	4
5. Materiales no suministrados	4
6. Condiciones de almacenamiento.....	4
7. Precauciones.....	5
8. Recomendaciones.....	5
9. Preparación de reactivos.....	6
10. Proceso de extracción de las muestras	6
10.1 Muestras sólidas y semisólidas	6
10.2 Muestras líquidas	7
10.3 Muestras de superficies con hisopos	7
11. Procedimiento de análisis	8
12. Cálculo e interpretación de los resultados	9
13. Control de calidad	10
14. Características analíticas	10
15. Propiedad intelectual.....	11
16. Referencias.....	11
Anexo 1. Protocolos recomendados.....	12

1. Uso previsto

GlutenTox ELISA Rapid G12 es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para la determinación de gluten*, dañino para las personas celíacas, en alimentos y bebidas.

* No apto para fuentes hidrolizadas de gluten.

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. La causa de 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 ELISA Rapid G12 es un ensayo cuantitativo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) diseñado para la determinación de la fracción immunotóxica del gluten en muestras alimenticias.

En todos los métodos de análisis de gluten el primer paso es la extracción del gluten de las muestras, siendo este uno de los puntos más críticos.

La solución de extracción proporcionada en este kit, Solución Universal de Extracción de Gluten (UGES por sus siglas en inglés), es válida para todo tipo de alimentos gracias a la combinación de agentes desnaturalizantes, reductores y solubilizantes.

Después de la extracción, el extracto de la muestra se añade a una placa multipocillo tapizada con un anticuerpo monoclonal anti-gliadina (G12) que reconoce específicamente la fracción más tóxica o inmunogénica de gluten. Después de los pasos de lavado, la adición de un segundo anticuerpo monoclonal anti-gliadina conjugado a HRP (A1-HRP) permitirá medir la señal.

GlutenTox ELISA Rapid G12 es un método directo. Cuanto mayor sea la concentración de gluten presente en la muestra, más intensa será la señal.

ELISA Sándwich es una técnica habitual para el análisis de sustancias que se encuentran en concentraciones muy bajas. La alta especificidad de los anticuerpos utilizados en esta prueba [ref. 3], permite a este método cuantificar con gran precisión el gluten en muestras de alimentos.

4. Materiales suministrados

- 12 tiras multi-pocillo tapizadas con anticuerpo G12 (divisibles; 8 pocillos cada una)
- Solución de Lavado 10x (40 mL)
- Solución de Dilución (120 mL)
- Solución de Extracción (200 mL)
- Anticuerpo conjugado GlutenTox A1-HRP (15 mL)
- Solución Sustrato (12 mL)
- Solución Stop, H_2SO_4 1M (12 mL)
- 5 Patrones GlutenTox (1,56 a 50 ng/ml gliadina, 1,25 mL cada uno)
- Control negativo (1,25 mL)
- Control positivo (1,25 mL)
- Control interno (1,25 mL)

Todos los reactivos suministrados están listos para su uso, excepto la Solución de Lavado, que está concentrada 10x.

5. Materiales no suministrados

- Balanza analítica (precisión 0,1 g)
- Tubos de ensayo con tapón adecuados para centrífuga (> 10mL). Por ejemplo, tubos Falcon de 50 mL
- Viales de ensayo (1,5-2 mL)
- Guantes desechables
- Agua destilada
- Cronómetro
- Vórtex
- Agitador de noria (o similar)
- Centrífuga
- Baño termostático
- Lavador automático de microplacas (opcional)
- Pipetas monocalor, pipetas multicanal (recomendado) y puntas
- Lector de placas ELISA (con filtro de 450 nm)

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

- Aditivo especial de polifenoles (ASY3044) (25 g)
- Control positivo que contiene polifenoles (ASY3043) (cacao en polvo con gluten, 10 g)
- Control negativo que contiene polifenoles (ASY3042) (cacao en polvo sin gluten, 10 g)

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

*Para más información consulte con su proveedor.

6. Condiciones de almacenamiento

- Almacene todos los reactivos del kit entre 2-8 °C (36-46 °F). No los congele.
- Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan y manipulan correctamente.
- Compruebe la fecha de caducidad de todos los componentes del kit antes de empezar el ensayo. No use ningún reactivo o componente después de la fecha de caducidad.

- Las tiras multi-pocillo sin utilizar se deben guardar en la bolsa de aluminio que contiene el desecante, cerrándola herméticamente y almacenándola entre 2-8 °C (36-46 °F).
- La Solución de Lavado diluida permanece estable durante dos semanas almacenada entre 2-8 °C(36-46 °F).

7. Precauciones

- Lea detenidamente este manual antes de iniciar el ensayo.
- Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones descritas en este manual.
- Este kit se ha diseñado solo para uso profesional.
- No mezcle los componentes de varios kits, ni utilice reactivos o soluciones diferentes a las suministradas.
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo para trabajar con este kit. No toque las tiras multi-pocillo con las manos.
- El sellado incompleto de la bolsa de aluminio con las tiras multi-pocillo puede provocar el acúmulo de humedad y la pérdida de precisión en los resultados.
- La Solución Sustrato es fotosensible; evite su exposición prolongada a la luz.
- La Solución Stop se compone de una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Evite la ingestión, inhalación y el contacto con la piel y los ojos. Evite la exposición a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con los ácidos.

8. Recomendaciones

- Cada muestra debe analizarse al menos por duplicado.
- Use muestras sin gluten y que contengan gluten (fortificadas) como controles.
- Debido a la alta variabilidad de los tipos de alimentos, los efectos de matriz no pueden excluirse. Para garantizar un resultado preciso, se recomienda el análisis de muestras fortificadas.
- En la producción de alimentos como la cerveza o la masa madre, las proteínas del gluten están fragmentadas. En los ELISA sándwich, los fragmentos de proteína pueden dar lugar a una menor recuperación del analito. Dichas muestras deben analizarse con un ELISA competitivo.

Consideraciones Generales

- Las muestras con resultado negativo aún podrían contener una contaminación de gluten por debajo del límite de detección del ensayo.
- Debido a la alta variabilidad de los tipos de alimentos, los efectos de matriz no pueden excluirse. En los alimentos procesados (tratamiento térmico, deshidratación, etc.) las proteínas pueden estar alteradas o fragmentadas; esto puede tener un impacto en la recuperación/reactividad cruzada.
- Para la evaluación de la reactividad cruzada, solo se analizó una muestra de cada matriz. Todas las reactividades cruzadas y matrices analizadas se describen en el informe de validación interna. Con otras muestras podría obtenerse un resultado diferente.

¡ADVERTENCIA! Es necesario trabajar con cuidado y meticulosidad para obtener resultados exactos y reproducibles. Multitud de factores influyen en la realización correcta del ensayo, incluida la temperatura inicial de los reactivos, los tiempos de incubación del ensayo, la precisión y la reproducibilidad de la manipulación de líquidos (pipeteo) y la calidad de la técnica de lavado.

9. Preparación de reactivos

¡ADVERTENCIA! Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15-25 °C / 59-77 °F) antes de comenzar el ensayo, excepto el anticuerpo conjugado GlutenTox A1-HRP, que debe mantenerse a 2-8 °C (36-46 °F) hasta su uso.

Preparación de la Solución de Lavado 1x

La Solución de Lavado se suministra concentrada 10 veces, por lo que antes de su uso deberá realizar una dilución 1:10 en agua destilada. Para preparar toda la solución proporcionada, añada los 40 mL de Solución de Lavado 10x suministrados a 360 mL de agua destilada. Si, por el contrario, desea preparar solo la cantidad de Solución de Lavado que necesita en ese momento puede preparar una cantidad menor siempre que realice una dilución 1:10 (por ejemplo, si va a usar solo 16 pocillos, puede preparar 30 mL, añadiendo 3 mL de Solución de Lavado 10x a 27 mL de agua destilada).

La Solución de Lavado, una vez diluida, permanece estable durante 2 semanas si se conserva entre 2-8 °C (36-46 °F).

10. Proceso de extracción de las muestras

Las muestras de alimento necesitan sufrir un proceso de extracción para hacer accesibles los péptidos tóxicos del gluten para su posterior análisis.

El protocolo a seguir para realizar la extracción de las muestras dependerá del tipo de alimento a analizar.

NOTA: Una vez extraídas, las muestras deben ser analizadas a la mayor brevedad posible.

10.1. Muestras sólidas y semisólidas:

10.1.1. Homogeneice y/o triture la muestra de alimento que desee analizar utilizando un mortero o un molinillo.

10.1.2. Pese 0,5 g de muestra en un tubo de ensayo.

NOTA: Si la muestra, sea sólida o líquida, contiene polifenoles, taninos o antioxidantes, pese y añada al tubo que contiene la muestra 0,5 g de Aditivo especial polifenoles (KIT3008) y agite vigorosamente para mezclar. (Ver Anexo 1 A para una descripción detallada del protocolo).

10.1.3. Añada 5 mL de Solución de Extracción. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, utilizando un vórtex).

10.1.4. 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; siga una de las dos opciones siguientes:

a) Muestras no procesadas por calor y de composición simple

Incubar la muestra durante 40 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C / 59-77 °F), con agitación suave (por ejemplo, empleando un agitador de noria).

b) Muestras procesadas por calor y/o de composición compleja o muestras con polifenoles, taninos y/o antioxidantes (Anexo 1 A)

Incubar la muestra a 50 °C (122 °F) en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.

NOTA: Si el tipo de muestra es difícil de determinar, recomendamos calentar a 50 °C (122 °F), opción b para facilitar la extracción.

10.1.5. Centrifugue la suspensión a 2500 x g durante 10 minutos y pase el sobrenadante a un tubo limpio.

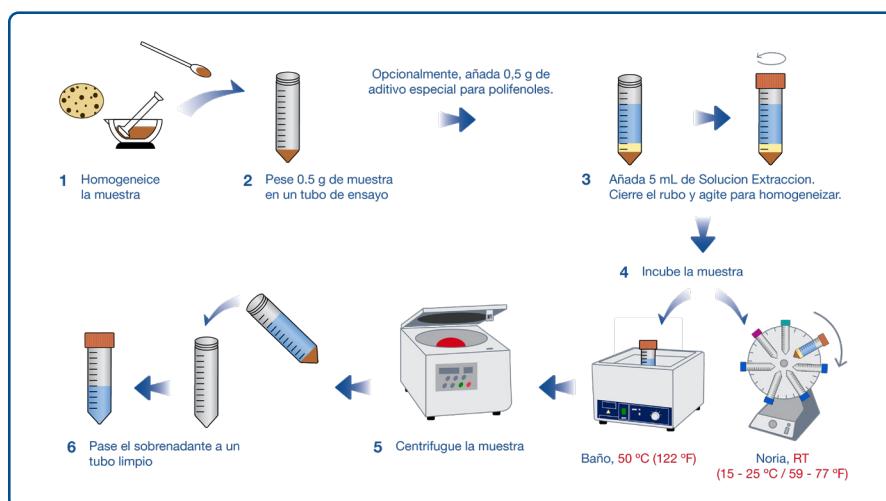


Figura 1. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

10.2. Muestras líquidas:

NOTA: Las muestras líquidas que contengan polifenoles, taninos o antioxidantes deben analizarse siguiendo el punto 10.1 Muestras sólidas y semisólidas.

Las muestras líquidas, sin emulsiones o sólidos, no requieren una extracción intensiva, siendo suficiente con 1-2 minutos de agitación manual, y tampoco requieren de un paso final de centrifugación.

10.2.1. Agite la muestra para homogeneizar.

10.2.2. Añada 0,5 mL de muestra en un tubo de ensayo.

10.2.3. Añada 4,5 mL de Solución de Extracción. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex) durante dos minutos.

10.3. Muestras de superficies con hisopos

NOTA: Este procedimiento solo puede usarse para una detección cualitativa de gluten (ausencia / presencia) en una superficie.

Los resultados del procedimiento de análisis de superficie a partir de hisopos no deben usarse para cuantificar. Para la recolección de muestras de superficie, frote con un hisopo limpio con firmeza y minuciosamente un cuadrado de 16 cm² de la superficie seleccionada (ver Figura 2). Corte la punta del hisopo y colóquelo en un vial de 1,5 mL, agregue 1 mL de Solución de Dilución y agite durante 1 minuto usando un vórtex.

Siga las instrucciones del punto 11.3 en la sección Procedimiento de análisis.

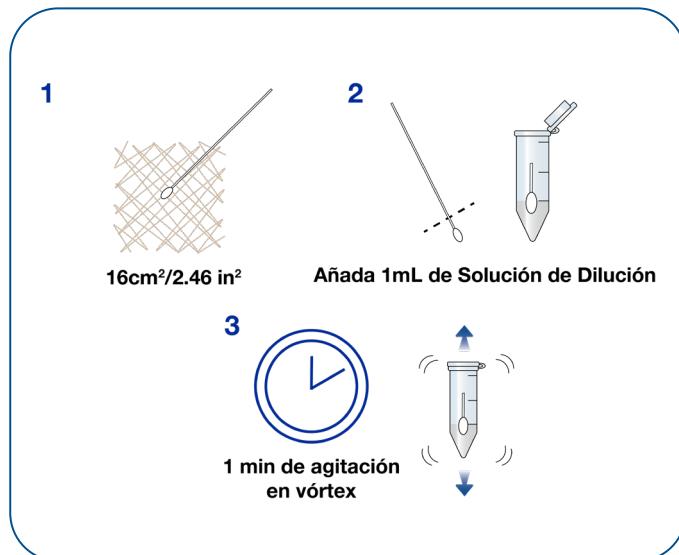


Figura 2. Esquema del procedimiento de preparación de muestra de hisopo

11. Procedimiento de análisis:

11.1. Se recomienda que todas las condiciones del ensayo (patrones GlutenTox, control positivo, control negativo, control interno y muestras) se analicen al menos por duplicado. Por este motivo, todos los volúmenes se han calculado para utilizar dos pocillos por cada condición.

11.2. Prepare diluciones de las muestras extraídas y clarificadas con la Solución de Dilución proporcionada y en viales de polipropileno. Un volumen final de 300 µL es suficiente para el análisis de cada muestra. Las diluciones de las muestras extraídas deben analizarse lo antes posible y cualquier material no utilizado debe descartarse.

Dependiendo del contenido de gluten esperado de la muestra, prepare las diluciones de acuerdo con la siguiente tabla:

Ejemplos de dilución			
Valores esperados de gluten	Dilution	Muestra extraída	Solución Dilución
Libre de gluten (<20 ppm)	1:20	50 µL	950 µL
Bajo contenido de gluten (20 a 100 ppm)	1:50	20 µL	980 µL
Alto contenido en gluten (100 a 200 ppm)	1:200	5 µL	995 µL

11.3. Añada 100 µL de los patrones, los controles y las muestras (a la dilución correspondiente) por pocillo, y por duplicado. Cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15-25 °C / 59-77 °F) durante 30 minutos.

11.4. Lavados: elimine el contenido de los pocillos; añada 300 µL de Solución de Lavado diluida a todos los pocillos; incube tres segundos. Repita este proceso cuatro veces más, para un total de cinco lavados. **Mantenga la misma secuencia para los lavados que la seguida para la adición de las mezclas de ensayo.** Despues del último lavado, invierta la placa y golpéela suavemente sobre un material absorbente para eliminar el líquido residual. Se recomienda un lavador automático para una mayor reproducibilidad de los resultados.

11.5. Añada 100 µL del anticuerpo GlutenTox A1-HRP a cada pocillo, cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15-25 °C / 59-77 °F) durante 30 minutos.

NOTA: El anticuerpo conjugado GlutenTox A1-HRP debe pipetearse en las condiciones más asépticas posibles y siguiendo buenas prácticas de laboratorio. Para evitar cualquier contaminación potencial microbiana y/o química, nunca devuelva el anticuerpo GlutenTox A1-HRP sin usar a su recipiente original.

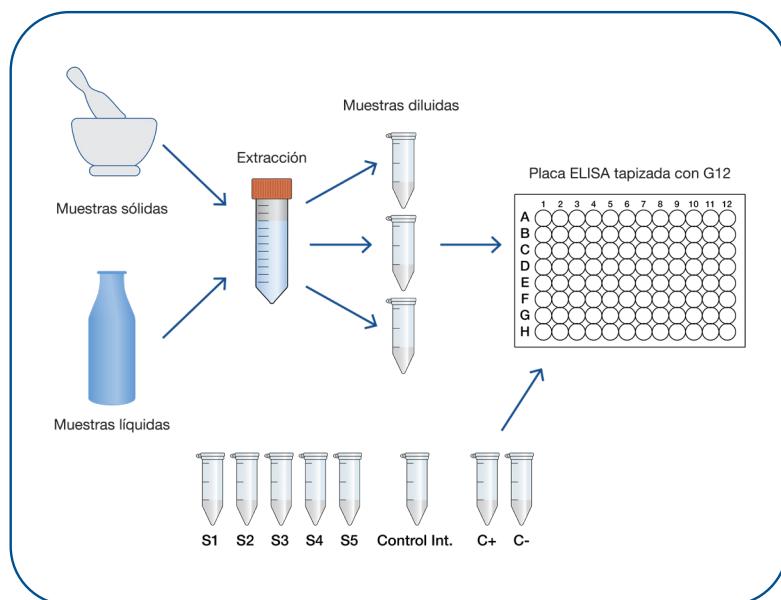


Figura 3. Esquema del procedimiento de análisis

11.6. Lavar la placa cinco veces con 300 µL por pocillo de la Solución de Lavado preparada anteriormente como se indica en el punto 11.4.

11.7. Añada 100 µL de Solución Sustrato a todos los pocillos. Cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15-25 °C / 59-77 °F) durante 30 min **en oscuridad**.

11.8. Añada 100 µL de Solución Stop. **Mantenga la misma secuencia que la seguida para la adición de la Solución Sustrato en el paso anterior.**

11.9. Usando un lector de microplacas ELISA con un filtro de 450 nm, lea la absorbancia (DO) a 450 nm lo antes posible, en el plazo máximo de media hora tras haber agregado la Solución Stop.

12. Cálculo e interpretación de los resultados

12.1. Determine la media de absorbancia de los duplicados de cada condición.

12.2. Construya una curva patrón (ver Figura 4) representando las concentraciones de gliadina de cada uno de los Patrones GlutenTox (eje y) frente a las respectivas absorbancias obtenidas para los patrones (eje x) utilizando el software apropiado (por ejemplo, Excel). Contacte con Hygiena Diagnóstica España para obtener la plantilla Excel.

12.3. Calcule la ecuación que define la curva patrón anterior mediante una regresión polinomial de segundo grado (ver ejemplo en Figura 4).

12.4. Introduzca en dicha ecuación el valor de absorbancia obtenida para cada muestra, para obtener la concentración de gliadina en ng/mL de la dilución de las muestras.

12.5. Introduzca el valor de la concentración de gliadina obtenida en la siguiente fórmula para obtener las ppm de gluten de la muestra.

$$\text{ppm gluten} = (\text{ng/mL de gliadina} \times \text{dilución}^* \times 2)/100$$

*Dilución realizada en el paso 11.2.

NOTA: Cuando la absorbancia (DO) de la muestra no esté incluida dentro de los valores obtenidos para la recta patrón, se repetirá el ensayo utilizando otras diluciones.

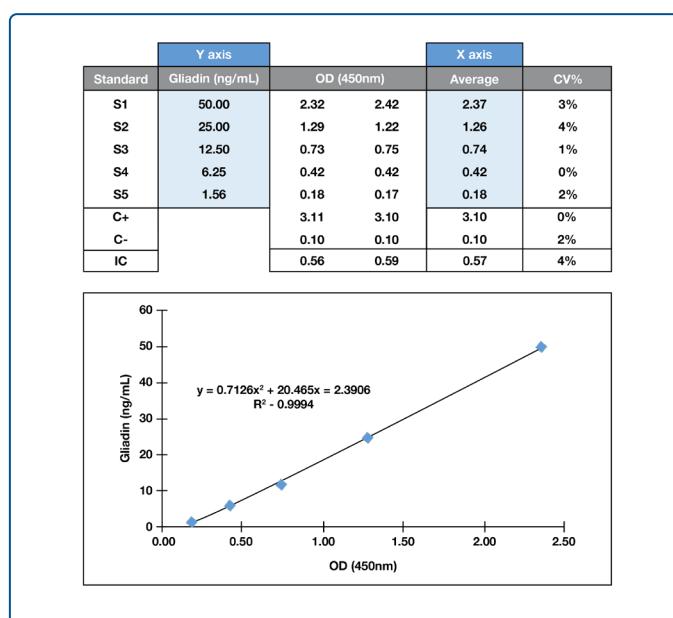


Figura 4. Ejemplo de curva de patrón.

13. Control de calidad

La calidad del ensayo se puede controlar de dos maneras:

- El control interno incluido en el kit debe usarse como una muestra lista para usar, sin ninguna otra dilución. El valor analítico del control interno viene definido en el Certificado de Análisis de cada lote específico. El valor de un lote del control interno en un ensayo debe tener una desviación máxima de $\pm 15\%$ del valor analítico del control interno para ese lote definido en el Certificado de Análisis.
- La absorbancia del control positivo debe ser superior a la obtenida para el Patrón 1 (S1, 50 ng / mL de gliadina) y la absorbancia del control negativo debe ser inferior a la obtenida para el Patrón 5 (S5, 1,56 ng / mL de gliadina).

Si alguno de estos controles no es satisfactorio, el ensayo debe repetirse.

14. Características analíticas

Se han realizado pruebas para determinar las principales características analíticas del ensayo:

Dilución de la muestra	Límite inferior de cuantificación (ppm de gluten)	Límite superior de cuantificación (ppm de gluten)
1:20	0,6	20
1:50	1,6	50
1:100	3,1	100
1:200	6,2	200

Sensibilidad

El límite de detección (LD) del ensayo es 0,3 ppm de gluten / 0,15 ppm de gliadina. El límite de cuantificación (LC) es 0,6 ppm de gluten / 0,3 ppm de gliadina. El rango de cuantificación del ensayo es de 0,6-200 ppm de gluten (0,3-100 ppm de gliadina). Dependiendo de la dilución de la muestra analizada, la cantidad cuantificable de gluten en cada muestra variará dentro del rango de absorbancias de la recta patrón (véase ejemplo en la siguiente tabla):

El límite de detección (LD) del método de análisis de superficie es 1,8 ng gliadina/cm² (3,6 ng gluten/cm²). Sin embargo, este resultado no se puede extrapolar a una concentración final de ppm de gluten en la superficie.

Especificidad

Este ensayo está basado en los anticuerpos monoclonales G12 y A1, que son capaces de detectar específicamente la presencia de la fracción inmunotóxica de las prolaminas de **trigo** (gliadina), **centeno** (secalina), **cebada** (hordeína) y algunas variedades inmunogénicas de **avenas** (aveninas) que pueden ser dañinas para los celíacos[ref. 2]. Sin embargo, no se observa señal positiva cuando las muestras contienen arroz, maíz, soja, trigo, sésamo, mijo, teff, quinoa y amaranto, cereales seguros para los celíacos.

15. Propiedad Intelectual

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

16. Referencias

1. SHAN L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-9.

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.; “Toward the Assessment of Food Toxicity for Celiac Patients: Characterization of Monoclonal Antibodies to a Main Immunogenic Gluten Peptide”; PLoS ONE 2008; 3 (5): e2294.

ANEXO 1. Protocolos recomendados

A-Procedimiento de extracción para muestras de comida y bebida que contengan polifenoles, taninos y/o antioxidantes.

- 1.1. Triture y/o homogeneice la muestra.
- 1.2. Pese 0,5 g o 0,5 mL de muestra y añádalos a un tubo de ensayo.
- 1.3. Añada 0,5 g de aditivo para polifenoles. Mezcle vigorosamente usando un vórtex hasta que los dos tipos de polvo o el líquido y el polvo formen una mezcla homogénea.
- 1.4. Añada 5 mL de Solución de Extracción.
- 1.5. Mezcle vigorosamente usando un vórtex hasta que la mezcla se haya desagregado completamente. Con algunas muestras puede resultar de ayuda precalentar la muestra durante dos minutos en un baño a 50 °C/122 °F y luego continuar mezclando con el vórtex hasta su completa desagregación.
- 1.6. Una vez que la muestra esté completamente desagregada, use la opción 10.1.4 b) para la incubación (40 minutos a 50 °C/122 °F) y siga el resto del protocolo normalmente.

B-Procedimiento de extracción para muestras grasas.

- 1.1. Triture y/o homogeneice la muestra.
- 1.2. Pese 0,5 g o 0,5 mL de muestra y añádalos a un tubo de ensayo.
- 1.3. Añada 5 mL de Solución de Extracción.
- 1.4. Use una cucharilla u otro objeto para ayudar físicamente a la desagregación de la muestra y agite con vórtex hasta que alcance una suspensión con partículas por debajo de 2 mm de diámetro. La naturaleza de estas muestras impide desagregarla solo usando el vórtex; por ello es necesario ayuda externa. Este procedimiento puede aumentar la recuperación hasta un 20%.
- 1.5. Una vez que la muestra esté completamente desagregada, use la opción 10.1.4 b) para la incubación (40 minutos a 50 °C/122 °F) y siga el resto del protocolo normalmente.

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

Notas

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

Notas

GlutenTox® ELISA

Rapid G12

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 21-5132-1081, +86 21-5132-1077,
+86 21-5132-1078

[Hygiena Diagnóstica España S.L.](#)
P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,
41900, Camas, Sevilla, Spain
+34 954-08-1276

www.hygiena.com
enquiries@hygiena.com