



GlutenTox® Pro

Gluten detection kit for foods, drinks
and working surfaces



REF KIT3001 (KT-5288)

GlutenTox® Pro

Contents

1. Intended purpose	2
2. Introduction	2
3. Test basis.....	2
4. Supplied materials (for 5 tests).....	3
5. Useful but not supplied materials.....	3
6. Storage conditions	3
7. Precautions	3
8. Warnings and limitations	3
9. Food	4
9.1. Preparation and sample analysis	4
9.2. Interpretation of results	7
10. Surface analysis	7
10.1. Preparation and sample analysis	7
10.2. Interpretation of results	8
11. Quality control	8
12. Analytical features	8
12.1. Sensitivity	8
12.2. Specificity.....	9
12.3. Internal validation	9
13. Intellectual property.....	9
14. References	9
Appendix 1	10
Appendix 2	11

1. Intended purpose

GlutenTox® Pro is a rapid and user-friendly test for the detection of gluten*, which is harmful for celiac disease sufferers, in food** and on surfaces**. (Food matrices and environmental surfaces approved by AOAC are listed in Appendix 1). This kit is recommended for consumers, commercial kitchens and industry and includes the possibility of choosing different detection threshold levels of gluten according to the end user requirements.

* not for hydrolyzed sources of gluten.

** Matrices validated according to AOAC Performance Tested Methods (PTM) protocols:

- Food matrices: Rice flour, bread, rolled oat, pâté and yogurt.
- Environmental surfaces: stainless steel, rubber, plastic, food-grade painted wood and sealed ceramic.

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 which 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® Pro is an immunochromatographic test (lateral flow test) for the detection of gluten in foods with different composition and levels of processing, from raw materials to processed food. In addition, GlutenTox® Pro can be used to control the cleanliness of food production zones through surface analysis, a prerequisite to prevent the risk of cross-contamination in the final product.

The test consists of an extraction stage using a simple procedure which is common to all types of food. The detection step is based on the reaction of the 33mer-like immunotoxic peptides of gluten in the sample with the colored conjugates (monoclonal anti-gliadin 33mer antibody / red colored microsphere) previously fixed on the stick [ref. 3 and 4]. This complex spreads by capillarity through the stick. If the result is positive, a RED line appears in the result zone of the stick. The absence of the RED line indicates a negative result. Whether or not gluten is present, the mixture of the conjugate moves through the stick up to the control region where, if the test was properly performed, a BLUE line (control line) will appear, due to accumulation of blue microspheres included also in the stick.

These rapid tests are specially useful in routine monitoring of gluten to ensure that products comply with a program of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), and to ensure proper labeling. They also enable quick decisions and corrective actions in case there is any risk of contamination along the production chain.

4. Supplied materials (for 5 tests)

- GlutenTox® Pro stick (x5) in a tube.
- Plastic pipette (x10).
- Disposable plastic spoons (x5).
- **Yellow cap** bottle with extraction solution (x5).
- **Blue cap** bottle with dilution solution (x5).
- Instructions leaflet.

5. Useful but not supplied materials

- Mortar or any other utensil to grind the sample.
- Non-powdered disposable gloves.
- Scale (precision 0.1 g).
- Alcohol (ethanol).
- Watch (a stopwatch is preferable).

6. Storage conditions

The product must be stored at a temperature ranging from 15 – 25 °C (59 - 77 °F) during the shelf life of the kit. To obtain optimal test performance, the product must be stored in its original packaging, and used before the expiration date printed on the tube of sticks.

WARNING: The tube with the sticks should not be opened until its time of use. All components of the kit are fully disposable in ordinary trash or recyclable where appropriate.

7. Precautions

- To avoid contaminations that interfere with the analysis, the use of non-powdered disposable gloves is recommended. If you do not have disposable gloves, wash your hands thoroughly before the test.
- Once the GlutenTox® Pro stick has been removed from the tube, it must be used as soon as possible under strict clean conditions. Close the tube afterwards.
- Do not use any material from the kit after the expiration date.
- Do not drink any solution (liquid) from the kit (the extraction solution contains alcohol [ethanol]).
- **Keep out of reach of children.**

8. Warning and limitations

- In certain types of samples gluten may be extracted with lower efficiency, and therefore working under conditions of maximum sensitivity (10 drops of the extract to the **dilution bottle with blue cap**) is recommended to ensure a detection limit of at least 10 ppm. These samples are the following:
 - Food containing ingredients (up to 70%) having high concentrations of polyphenols or tannins (e.g. chocolate, black tea, coffee, wine, berries, legumes like chickpeas or lentils, etc.)
 - Samples with antioxidants, such as vitamins A, E and C.
 - Food heat-treated with temperatures above 180 °C/356 °F.
- In extensively hydrolyzed matrices such as beer, syrups or sourdough, the gluten content of the sample could be underestimated.

IMPORTANT NOTE!

- In these cases it has been found that at least 50% of the total content of gluten present in the sample is detected. Therefore, if a negative result is obtained by working under conditions of maximum sensitivity (with 10 drops), it can be assured that the food contains less than 10 ppm of gluten, and therefore, it can be considered as "gluten-free" suitable for celiacs in accordance with current regulations.
- In some food samples with a very high content of polyphenols and tannins, i.e. foods in which the major component (> 70%) is chocolate, black tea, coffee, wine, berries, legumes like chickpeas or lentils, etc., the extraction process can be insufficient and therefore underestimate the amount of gluten in the sample. In these cases it is recommended to use GlutenTox® Sticks Plus*.
- Gum-type samples can be difficult to analyze due to the thick paste formed when mixed with the extraction solution provided in the GlutenTox® Pro Test Kit. Please ask your kit provider for advice.

*For more information contact your supplier.

9. Food

9.1. Preparation and sample analysis

IMPORTANT NOTE!

- Before using the kit clean the utensils and the areas in which the sample will enter in contact, with soap and water, and rinse well. After cleaning, it is highly recommended to wipe them with a clean cloth dampened with alcohol. Materials included in the kit are ready to use, and can be disposed after use.

9.1.1. If the sample is liquid, shake it vigorously to homogenize completely before sampling.

If the sample is semi-liquid or doughy, remove it with the help of a tooth-pick or clean spoon to mix it and achieve a homogeneous mixture.

If the sample is solid, grind it as much as possible using a mortar and/or a domestic meat grinder/mincer which must be perfectly clean. If the food sample is too hard (sweets, nougat, etc.) fragment it with a knife or a little hammer to achieve an efficient grinding.

IMPORTANT NOTE!

- If a food has several parts, be sure to take a representative sample of each and prepare a final homogeneous sample. If you do not do this, and the gluten was distributed unevenly in the food, a false negative could be obtained.

9.1.2. Use the provided spoon with leveled amounts of sample following Table 1 or if you have an appropriate scale⁽¹⁾ weigh 1 gram of sample. If the sample is liquid, use one leveled spoon or take 1 milliliter of the liquid.

⁽¹⁾The use of a scale increases the accuracy of the analysis process.

Table 1. Amount of sample depending on the kind of food

Type of food	Examples	Spoonful
Flours, fine powders	Corn flour, rice flour*, milk powder, spices, rolled oat*	 
Fine crumbs	Bread*, cookies, cakes, snacks, etc.	 
Liquids and sauces	Water, rinse water, milk, juice, condensed milk, yogurt*, soup, gravy, sauce, cream, etc.	 
Meat, fish and cold meat	Meat, fish, sausage, black pudding, pâté*, canned meat and fish, etc.	 

* Food matrices approved by AOAC.

- 9.1.3.** Open one **extraction bottle with yellow cap**. Add the content of the spoon, 1 gram or the milliliter to the **extraction bottle with yellow cap**.
- 9.1.4.** Close the bottle, shake vigorously for at least 2 minutes and let it settle for about 5 minutes so that any solids rest on the bottom of the tube. Settling time will depend on the type of sample.
- 9.1.5.** Open one **dilution bottle with blue cap**. Using a disposable plastic pipette, take approximately 1 mL of extracted sample from the **extraction bottle with the yellow cap**. Add **10, 4, 2, or 1 drops** of extracted solution to the **dilution bottle with the blue cap** according to your required threshold/limit of detection (see Table 2).

Table 2.

Mix softly for at least 15 seconds.

no. drops	LD
10	5 ppm
4	10 ppm
2	20 ppm
1	40 ppm

- 9.1.6.** Using a new disposable plastic pipette, add **10 drops** from the **dilution bottle with blue cap** in the same inverted blue cap. Put the cotton wool side of the stick in contact with the liquid present in the blue cap until all the liquid is absorbed. Let it stand in the blue cap.
- 9.1.7.** **Wait 10 minutes** to see the final result (if there is a high concentration of gluten, the result may appear in less than 1-2 minutes).

IMPORTANT NOTE!

- **Wait 10 minutes to read the result. Do not leave the stick longer than indicated, as the results may vary.**

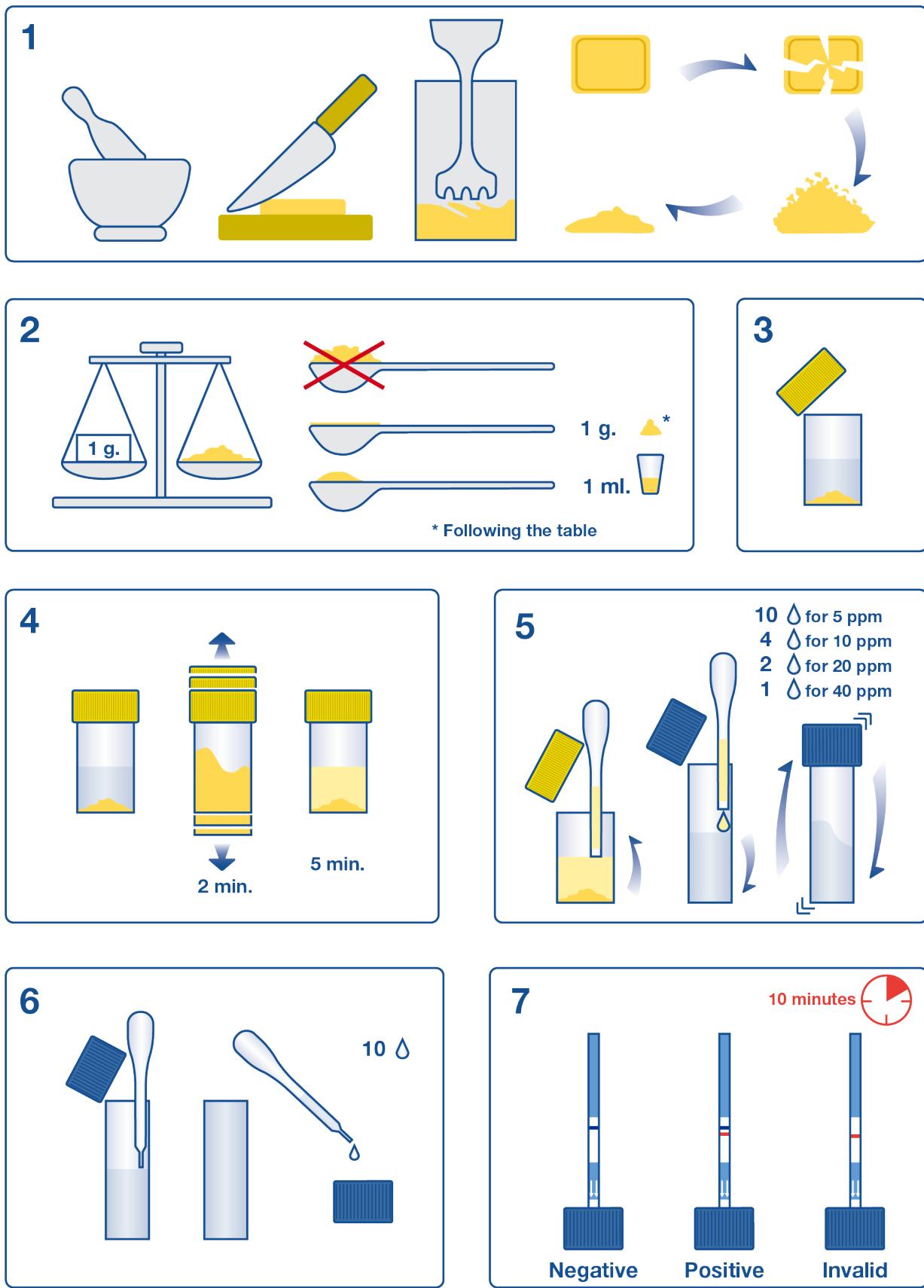


Figure 1. Preparation and analysis of samples.

9.2. Interpretation of results

Negative: A single BLUE line (control line) appears in the central part of the stick (control zone).

Positive: In addition to the control line (BLUE), a RED line (result line) appears in the result zone. The intensity of the red line in the results zone will vary depending on the gluten concentration present in the sample.

The threshold of detection depends on the number of drops (10, 4, 2 or 1 drops) added to the **dilution bottle with blue cap** in step 9.1.5. (see Table 3).

Table 3. Interpretation of results ⁽²⁾

		Detection threshold			
		10 drops	4 drops	2 drops	1 drop
Test Result	Positive	> 5 ppm	> 10 ppm	> 20 ppm	> 40 ppm
	Negative	< 5 ppm	< 10 ppm	< 20 ppm	< 40 ppm

⁽²⁾ The results are qualitative for limit of detection.

Invalid: The control line (BLUE) does not appear, whether or not the result line appears (RED). The most common causes for the appearance of an invalid result are: an insufficient quantity of sample, following an incorrect procedure, or deterioration of the reagents. In the case of invalid results, it is necessary to repeat the experiment with a new test always following a correct procedure. If the problem persists, you must contact the supplier and stop using the test.

The test is for screening purposes. A positive result might require confirmation or further testing.

10. Surface analysis

10.1. Preparation and sample analysis

10.1.1. Rub the cotton wool side of the stick against a surface of at least 16 cm²/2.46 inch² or in a line of 40 cm/15.6 inch. The area selected for analysis must be representative of the total area of interest.

10.1.2. Open a **dilution bottle with blue cap** and place inverted cap on a clean surface. Use a new, disposable plastic pipette to place **10 drops** from the **dilution bottle into the blue cap**. Put the cotton wool side of the stick in contact with the liquid present in the blue cap until all the liquid is absorbed. Let it stand in the blue cap.

10.1.3. **Wait 10 minutes** to see the final result (if there is a high concentration of gluten, the result may appear in less than 1-2 minutes).

NOTE! Environmental surfaces approved by AOAC are listed in Appendix 1.

IMPORTANT NOTE!

- **Wait 10 minutes to read the result. Do not leave the stick longer than indicated, as the results may vary.**

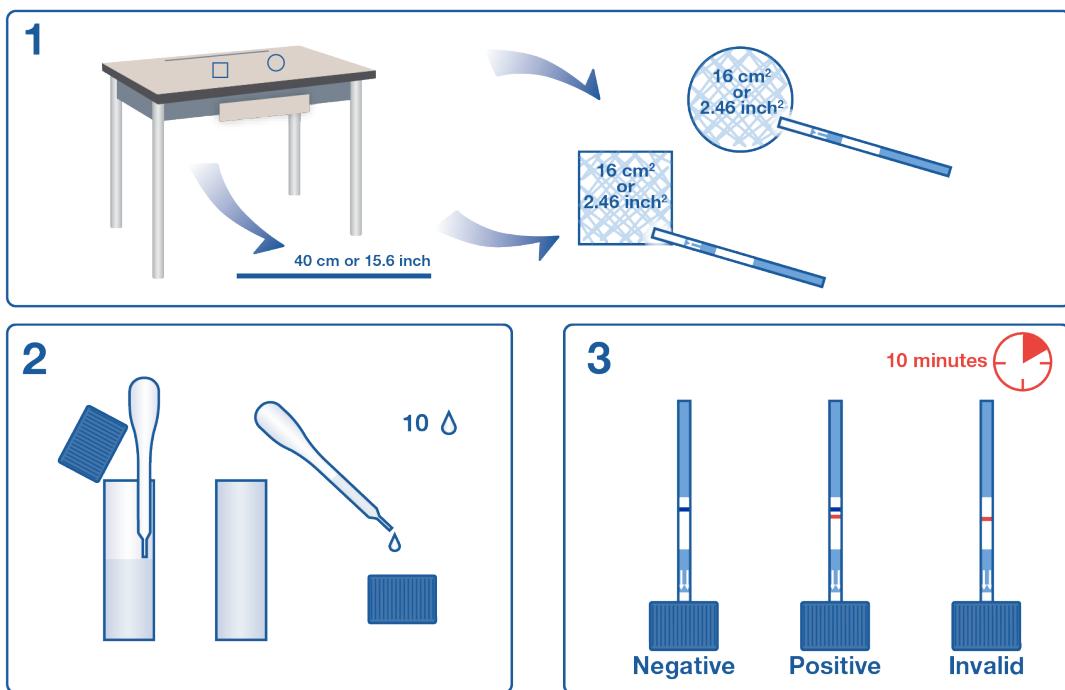


Figure 2. Procedure for surface analysis.

10.2. Interpretation of results

Negative: A single BLUE line (control line) appears in the central part of the stick (control zone).

Positive: In addition to the control line (BLUE), a RED line (result line) appears in the result zone.

The intensity of the red line in the results zone will vary depending on the gluten concentration present in the sample.

Invalid: The control line (BLUE) does not appear, whether or not the result line appears (RED). The same considerations apply as for paragraph 9.2 invalid test results.

11. Quality control

The internal control is included in the test. The blue line that appears on the stick is the internal control of the test which checks that the sample volume is sufficient and that the followed procedure is adequate.

12. Analytical features

12.1. Sensitivity

Food

The limit of detection of the assay is 5 ppm, working at maximum sensitivity (10 drops). This detection limit is always reached in simple samples, such as raw materials, foods with little degree of processing and non heat-processed foods. The high sensitivity of the test complies fully with the Codex Alimentarius guidelines and Regulation (EC) 41/2009, which sets a limit of 20 ppm to consider the food as "gluten-free".

Surface analysis

The result obtained with the test indicates the presence or absence of gluten on the analyzed surface; it cannot be extrapolated into any value of gluten in ppm.

Positive results from a surface size of 16 cm²/2.46 inch² or a line of 40cm/15.6 inches indicate a minimum detection of 10 ng/cm² of gluten from the surface [ref. 5].

12.2. Specificity

This test can specifically detect the presence of the toxic fraction (33mer) of the prolamins of wheat (gliadin), rye (secalin), barley (hordein) and as well varieties of oat [ref.2] (avenin) that can be toxic and therefore harmful for celiac patients. Furthermore, the test will not cross-react with samples containing rice, corn, soy, buckwheat, sesame, millet, teff, quinoa and amaranth.

Note: To estimate gluten in a sample with this test, the prolamin content has been adjusted multiplying by factor = 2.

12.3. Internal validation

In addition to the food matrices and environmental surfaces validated according to AOAC Performance Tested Methods (PTM) protocols, listed in Appendix 1, to ensure the test's ability to analyze a wide range of samples of different types (food, beverages, oral hygiene products), different commercial samples have been tested. After analyzing the samples with GlutenTox® Pro in all types of matrices (see Appendix 2) the results were satisfying and consistent with the validated method for the Codex Alimentarius, which demonstrates that the test can be used on a broad range of samples.

13. Intellectual property

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

14. 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.; "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide", Am. J. Clin. Nutr, 2008; 87:405-414.
4. 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.
5. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

Appendix 1. Matrices validated according to AOAC Performance Tested Methods (PTM) protocols

Group	Tested samples
Foods	Rice flour, bread, rolled oat, pâté and yogurt
Environmental surfaces	Stainless steel, rubber, plastic, food-grade painted wood and sealed ceramic.

Appendix 2. Samples tested for internal validation of GlutenTox® Pro by Hygiena

Group	Tested samples
Flour and semolina	Corn flour, precooked corn flour, corn semolina, rice flour*, buckwheat flour, rolled oat*
Milk products	Cow milk, milk with soluble fiber, milk with cereals, natural or flavored 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, pâté*, chicken nuggets, pork sausages, chorizo
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	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, rinse water, milk, fruit juices, soy drinks, rice drinks, oat drinks, soft drinks
Oral hygiene products	Toothpaste, mouthwash

* Food matrices approved by AOAC.

GlutenTox® Pro

Notes

GlutenTox® Pro

Notes

GlutenTox® Pro

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® Pro

Kit de detección de gluten en alimentos
y superficies



REF

KIT3001 (KT-5288)

GlutenTox® Pro

Contenidos

1. Uso previsto	2
2. Introducción	2
3. Fundamento del test	2
4. Materiales suministrados (para 5 pruebas)	3
5. Materiales convenientes no suministrados	3
6. Condiciones de almacenamiento	3
7. Precauciones.....	3
8. Advertencias y limitaciones.....	3
9. Análisis de alimentos.....	4
9.1. Preparación y análisis de las muestras	4
9.2. Interpretación de resultados	7
10. Análisis de superficies.....	7
10.1. Preparación y análisis de las muestras	7
10.2. Interpretación de resultados	8
11. Control de calidad	8
12. Características analíticas	8
12.1. Sensibilidad.....	8
12.2. Especificidad.....	9
12.3. Validación interna.....	9
13. Propiedad intelectual.....	9
14. Referencias.....	9
Anexo 1	10
Anexo 2	11

1. Uso previsto

GlutenTox® Pro es una prueba rápida y fácil de usar que permite detectar el gluten* perjudicial para los celíacos, en alimentos y superficies**. (Los alimentos y superficies aprobados por la AOAC se muestran en el Anexo 1). Este kit está recomendado para consumidores, cocinas comerciales e industria y proporciona la posibilidad de elegir entre diferentes límites de detección de gluten de acuerdo con las necesidades del usuario final.

* no válido para alimentos hidrolizados.

** matrices validadas según los protocolos AOAC Performance Tested Methods (PTM)

- Alimentos: harina de arroz, pan, copos de avena, paté y yogur.

- Superficies: acero inoxidable, goma, plástico, madera pintada grado alimentario y cerámica.

2. Introducción

La celiaquía es una enfermedad que afecta al intestino delgado provocando la atrofia de las vellosidades intestinales, lo cual interfiere con 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, ya 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® Pro es una prueba inmunocromatográfica (test de flujo lateral) para la detección de gluten en alimentos de muy diversa naturaleza y grado de procesamiento, desde materias primas hasta alimentos procesados. Además, GlutenTox® Pro permite llevar a cabo un control de la limpieza de las zonas de producción, mediante el análisis de las superficies de trabajo, requisito indispensable para prevenir el riesgo de contaminación en el producto final.

El test consiste en una etapa de extracción mediante un simple procedimiento que es común a todos los tipos de alimentos; y en una etapa de detección que se basa en la capacidad de reacción de los péptidos inmunotóxicos tipo 33mer del gluten, presentes en las muestras, con los anticuerpos conjugados coloreados (microesferas rojas unidas a anticuerpos monoclonales anti-gliadina33mer), fijados previamente en la tira [ref. 3 y 4]. El complejo formado avanza por capilaridad a lo largo de la tira. Si el resultado es positivo, aparece una línea de color ROJO en la zona de resultado de la tira. La ausencia de esta línea ROJA indica un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de gluten, la mezcla de conjugado avanza por la tira hasta la zona de control donde, si el test se ha realizado correctamente, deberá aparecer una línea de color AZUL (línea de control), por acumulación de microesferas de este color también incluidas en la tira.

Este test rápido es especialmente útil en el control rutinario del gluten para asegurar que los productos cumplen con un programa de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), y para garantizar el correcto etiquetado. También, permite, la toma rápida de decisiones y acciones correctivas cuando se haya producido alguna contaminación a lo largo de la cadena de producción.

4. Materiales suministrados (para 5 pruebas)

- Tira analítica GlutenTox® Pro (x5) en un tubo.
- Pipeta de plástico (x10).
- Cucharilla de plástico desechable (x5).
- Bote de **tapón amarillo** con solución de extracción (x5).
- Bote de **tapón azul** con solución de dilución (x5).
- Instrucciones de uso.

5. Materiales convenientes no suministrados

- Mortero o utensilios para triturar la muestra.
- Reloj, preferentemente con cronómetro.
- Balanza (precisión 0,1 g).
- Guantes desechables sin polvo.
- Alcohol etílico.

6. Condiciones de almacenamiento

Se debe almacenar el producto a una temperatura entre 15 – 25 °C (59 - 77 °F) hasta la vida útil del kit. Para conseguir un óptimo funcionamiento del ensayo, el producto debe almacenarse en su envase original, y utilizarse antes de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del tubo de tiras.

AVISO: El tubo con las tiras no debe abrirse hasta el momento de su uso. Todos los componentes del kit pueden eliminarse como un residuo normal en el hogar o ser reciclados.

7. Precauciones

- Para evitar contaminaciones que interfieran con el análisis, se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo. Si no se dispone de ellos, extreme las precauciones lavándose las manos cuidadosamente antes del test.
- Una vez sacada la tira GlutenTox® Pro del tubo, debe utilizarse lo antes posible bajo estrictas condiciones de limpieza. Posteriormente cierre el tubo.
- No usar ningún elemento del kit después de la fecha de caducidad.
- No ingerir ninguna solución (líquido) del kit (la solución de extracción contiene alcohol [etanol]).
- Manténgase fuera del alcance de los niños.

8. Advertencias y limitaciones

- En cierto tipo de muestras, el gluten puede extraerse con menor eficiencia, por lo que se recomienda trabajar en condiciones de máxima sensibilidad (10 gotas del extracto sobre el bote de dilución de tapón azul), para garantizar la detección de un mínimo de 10 ppm. Estas muestras son las siguientes:
 - Alimentos que contienen ingredientes (hasta un 70%) con altas concentraciones de polifenoles o taninos (chocolate, té, café, vino, frutos rojos, legumbres como garbanzo y lenteja, etc.).
 - Muestras con antioxidantes, como son vitaminas A, E y C.
 - Alimentos tratados con temperaturas superiores a 180 °C / 356 °F.
- En matrices muy hidrolizadas como siropes, masa madre o cerveza, el contenido de gluten de la muestra se puede subestimar.

¡NOTA IMPORTANTE!

- En estos casos se ha comprobado que siempre se consigue como mínimo una extracción del 50% del contenido total de gluten presente en la muestra. Por consiguiente, si se obtiene un resultado negativo realizando el ensayo al máximo de sensibilidad (con 10 gotas), se puede garantizar que el alimento contiene menos de 10 ppm de gluten, y, por lo tanto, se trata de un alimento “sin gluten” o “exento de gluten” apto para celíacos de acuerdo con la normativa en vigor.
- En algunas muestras de alimentos con muy alto contenido en polifenoles o taninos, es decir, alimentos en los que el componente mayoritario (> 70%) sea chocolate, té, café, vino, frutos rojos, legumbres como garbanzo y lenteja, etc., el proceso de extracción puede ser insuficiente y, por tanto, subestimar la cantidad de gluten en la muestra. En estos casos se recomienda recurrir a GlutenTox® Sticks Plus*.
- Muestras de carácter gomoso pueden ser difíciles de analizar debido a la pasta densa que se forma cuando se mezcla con la solución de extracción provista con el kit GlutenTox® Pro. Por favor, contacte con su proveedor para que le asesore.

*Para más información consulte con su proveedor.

9. Análisis de alimentos

9.1. Preparación y análisis de las muestras

¡NOTA IMPORTANTE!

- Antes de utilizar el kit, límpie con agua y jabón los materiales y las zonas con las que la muestra vaya a estar en contacto y aclare después con abundante agua. Tras la limpieza, es muy aconsejable pasar un trapo limpio humedecido con alcohol. Los materiales incluidos en el kit GlutenTox® Pro vienen listos para usar, y son desecharables tras su uso.

9.1.1. Si la muestra es líquida, agítela vigorosamente para homogeneizarla completamente antes de la toma de muestra.

Si la muestra es semilíquida o pastosa, remuévala con la ayuda de una varilla o cuchara perfectamente limpia para conseguir una mezcla homogénea.

Si la muestra es sólida, tritúrela lo máximo posible utilizando un mortero y/o una picadora doméstica perfectamente limpia. Si la muestra es muy dura (turrón, caramelos, etc.), rómpala previamente con un cuchillo o martillo para facilitar un triturado eficaz.

¡NOTA IMPORTANTE!

- 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 resultado falso negativo.

9.1.2. Utilice medidas de enrase del alimento con la cucharilla suministrada siguiendo la Tabla 1 o si dispone de una balanza adecuada⁽¹⁾, pese 1 gramo de muestra. Si la muestra es líquida, use una medida de la cucharilla suministrada o, tome 1 mililitro de líquido.

⁽¹⁾ El uso de la balanza aumenta la precisión del proceso de análisis.

Tabla 1. Cantidad de muestra según tipo de alimento

Tipo Alimento	Ejemplos	Cucharadas
Harinas y alimentos en polvo	Harina de maíz, harina de arroz*, leche en polvo, especias, copos de avena*, etc.	
Alimentos porosos	Pan*, galletas, bizcochos, snacks, etc.	
Líquidos y salsas	Agua, agua de lavado, leche, zumo, leche condensada, yogur*, sopa, salsas, cremas, etc.	
Carnes, pescados y embutidos	Carnes, pescados, salchicha, morcilla, paté, conservas de carne y pescados, etc.	

* Matrices aprobadas por la AOAC.

- 9.1.3.** Abra el bote de extracción de **tapón amarillo**. Añada el contenido de la cucharilla suministrada, 1 gramo o el mililitro, al **bote de extracción de tapón amarillo**.
- 9.1.4.** Cierre el bote, agítelo vigorosamente durante al menos 2 minutos y déjelo reposar durante unos 5 minutos de forma que se queden los restos sólidos en el fondo del tubo. El tiempo de reposo dependerá del tipo de muestra.
- 9.1.5.** Abra un **bote de dilución de tapón azul**. Con una pipeta de plástico desechable, tome aproximadamente, 1 mL de la muestra extraída, del **bote de extracción de tapón amarillo**. Añada **10, 4, 2 o 1 gotas** al **bote de dilución de tapón azul** según el límite de detección (LD) que se quiera conseguir (Tabla 2. Relación entre el nº de gotas de la muestra extraída y el Límite de Detección del test).

Tabla 2.

Agítelo suavemente durante al menos 15 segundos.

no. gotas	LD
10	5 ppm
4	10 ppm
2	20 ppm
1	40 ppm

- 9.1.6.** Añada con una pipeta desechable nueva **10 gotas** del **bote de dilución de tapón azul** al tapón del mismo bote invertido. Ponga la zona algodonosa de la tira en contacto con el líquido del tapón azul hasta que este se absorba completamente. Déjela reposar en el tapón azul.
- 9.1.7.** **Espere 10 minutos** para ver el resultado de la tira (si hay una alta concentración de gluten, los resultados pueden aparecer en menos tiempo, 1-2 minutos).

¡NOTA IMPORTANTE!

- **Esperar 10 minutos antes de leer el resultado. No deje la tira más tiempo del indicado sin leer, ya que el resultado podría variar.**

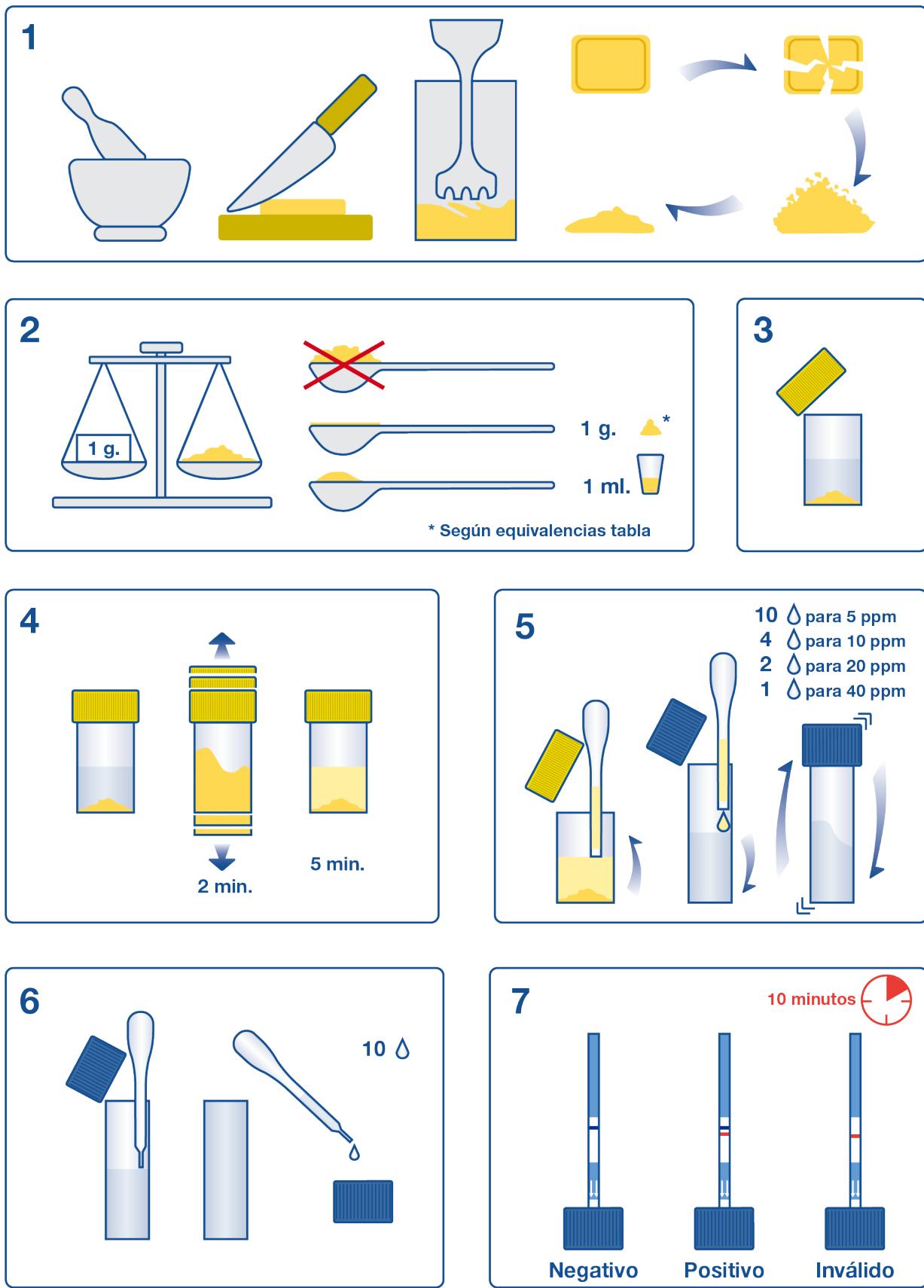


Figura 1. Preparación y análisis de las muestras.

9.2. Interpretación de resultados

Resultado negativo: Aparece una sola línea de color AZUL (línea de control) en la parte central de la tira.

Resultado positivo: Además de la línea de control (AZUL), también aparece una línea ROJA en la zona de resultado de la tira. La intensidad de la línea roja variará dependiendo de la concentración de gluten que contenga la muestra.

El límite de detección del ensayo depende del número de gotas (**10, 4, 2 o 1 gotas**) añadidas al bote de dilución de tapón azul en el paso 9.1.5. (ver Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación de resultados ⁽²⁾

		Contenido de gluten en la muestra			
		10 gotas	4 gotas	2 gotas	1 gotas
Resultado del test	Positivo	> 5 ppm	> 10 ppm	> 20 ppm	> 40 ppm
	Negativo	< 5 ppm	< 10 ppm	< 20 ppm	< 40 ppm

⁽²⁾ Estos resultados son cualitativos en cada límite de detección.

Resultado inválido: La línea de color AZUL no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de color ROJO. Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una cantidad insuficiente de muestra, realizar algún paso de forma incorrecta o el deterioro de los reactivos. Si esto ocurre, repita el test con una nueva tira siguiendo siempre el procedimiento correcto. Si el problema persiste deje de usar el test y contacte con su proveedor.

El propósito del test es la detección. Un resultado positivo podría requerir confirmación o pruebas adicionales.

10. Análisis de superficies

10.1. Preparación y análisis de las muestras

10.1.1. Frote la zona algodonosa de la tira (extremo inferior) sobre una superficie mínima de 16 cm² / 2,46 in² o sobre una línea de 40 cm / 15,6 in. La superficie seleccionada para analizar debe ser representativa de la superficie total objeto de estudio.

10.1.2. Abra el bote de dilución de tapón azul y coloque el tapón del mismo bote invertido sobre una superficie limpia. Añada con una pipeta desechable nueva **10 gotas del bote de dilución de tapón azul** al tapón del mismo bote. Ponga la zona algodonosa de la tira en contacto con el líquido del tapón azul hasta que éste se absorba completamente. Déjela reposar en el tapón azul.

10.1.3. **Espere 10 minutos** para ver el resultado de la tira (si hay una alta concentración de gluten, los resultados pueden aparecer en menos tiempo, 1-2 minutos).

¡NOTA!: Las superficies aprobadas por la AOAC se enumeran en el Anexo 1.

¡NOTA IMPORTANTE!

- **Esperar 10 minutos antes de leer el resultado. No deje la tira más tiempo del indicado sin leer, ya que el resultado podría variar.**

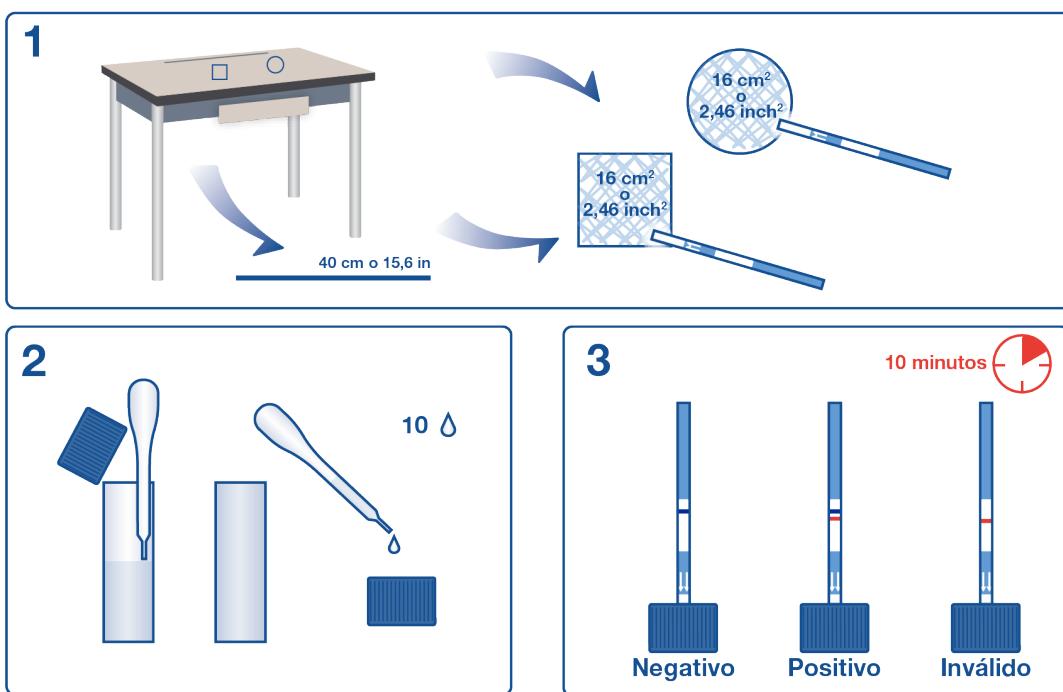


Figura 2. Procedimiento para análisis de superficies.

10.2. Interpretación de resultados

Resultado negativo: Aparece una sola línea de color AZUL (línea de control) en la parte central de la tira.

Resultado positivo: Además de la línea de control (AZUL), también aparece una línea ROJA en la zona resultado de la tira.

Resultado inválido: La línea de control AZUL no aparece. Se aplican las mismas consideraciones que para el apartado 9.2. de resultados inválidos.

11. Control de calidad

El control interno está incluido en el test. La línea azul que aparece en la zona de control es el control interno del proceso, el cual verifica que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

12. Características analíticas

12.1. Sensibilidad

Análisis de alimentos

El límite de detección del ensayo es de 5 ppm, trabajando en condiciones de máxima sensibilidad (10 gotas). Este límite de detección se alcanza siempre en muestras simples, tales como materias primas, alimentos con poco grado de procesamiento y alimentos no tratados con calor.

La alta sensibilidad del test permite ampliamente el cumplimiento de las directrices del Codex Alimentarius y del Reglamento (CE)41/2009, que establece un límite de 20 ppm para considerar al alimento como "exento de gluten" o "sin gluten", respectivamente.

Análisis de superficies

El resultado obtenido del ensayo indica la presencia o ausencia de gluten en la superficie analizada, no pudiéndose extrapolar a valores de ppm de gluten.

Analizando una superficie de 16 cm² / 2,46 in² o una línea de 40 cm / 15,6 in el test es capaz de detectar un mínimo de 10 ng/cm² de gluten [ref. 5].

12.2. Especificidad

Este test es capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica (33 mer) de las prolaminas de trigo (gliadina), centeno (secalina), y cebada (hordeína), y algunas variedades de avena [ref. 2] (avenina) que pueden ser tóxicas y, por lo tanto, perjudiciales para los celíacos. Sin embargo, no se observa señal positiva cuando las muestras contienen arroz, maíz, soja, trigo sarraceno, sésamo, mijo, teff, quinoa y amaranto, ingredientes vegetales seguros para los celíacos.

Nota: para calcular el gluten de una muestra con este test, el contenido de prolamina ha sido ajustado multiplicando por el factor = 2.

12.3. Validación interna

Además de las matrices alimentarias y de las superficies validadas según el protocolo AOAC Performance Tested Methods (PTM), enumeradas en el Anexo 1, para garantizar la capacidad del test de analizar un amplio rango de muestras de naturaleza diversa (alimentos, bebidas, productos de higiene bucal), se han ensayado diferentes muestras comerciales. Tras el análisis de las muestras con GlutenTox® Pro, en todos los tipos de matrices (ver Anexo 2) se obtuvieron resultados satisfactorios y concordantes con el contenido de gluten encontrado con el método validado por el Codex Alimentarius, lo cual demuestra la aplicabilidad del test sobre un amplio tipo de muestras.

13. Propiedad intelectual

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

14. 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.; "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide", Am. J. Clin. Nutr, 2008; 87:405-414.
4. 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.
5. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

Anexo 1. Matrices validadas según el protocolo AOAC Performance Tested Methods (PTM)

Grupo	Muestras testadas
Alimentos	Harina de arroz, pan, copos de avena, paté y yogur.
Superficies	Acero inoxidable, goma, plástico, madera pintada grado alimentario y cerámica.

Anexo 2. Muestras ensayadas para la validación interna de GlutenTox® Pro

Grupo	Muestras
Harinas y sémolas	Harina de maíz, harina de maíz precocida, sémola gruesa de maíz, harina de arroz*, harina de trigo sarraceno, copos de avena*
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, galletas con chocolate, magdalenas, bizcocho, copos de maíz, pastas, tortitas de maíz, tortitas de arroz, tortitas de espelta, aperitivos
Carnes y productos cárnicos	Carne de pavo picada, carne de pollo picada, embutido de pavo, paté*, nuggets de pollo, salchichas de cerdo, chorizo
Pescados y productos de la pesca	Bacalao, merluza
Verduras	Mezcla de lechugas variadas, verduras fritas
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	Aderezo de ensalada de yogur, salsa de tomate, salsa de soja, aderezo ensalada, ajo en polvo, pimentón en polvo, nata líquida para cocinar
Azúcares	Azúcar en polvo
Comidas y platos preparados	Albóndigas en salsa con guisantes, raviolis de carne al huevo, 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, agua de lavado, leche, zumo de frutas, bebida de soja, bebida de arroz, bebida de avena, refrescos
Productos de higiene bucodental	Pasta de dientes, enjuague bucal

* Matrices alimentarias aprobadas por la AOAC.

GlutenTox® Pro

Notas

GlutenTox® Pro

Notas

GlutenTox® Pro

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