Kit AlerTox® ELISA Anacardo

Para la detección cuantitativa de proteínas de anacardo en productos alimenticios

REF KIT3053 (96 pocillos)



Índice

1. Introducción ... 3
   - 1.1 Sensibilidad y especificidad del ensayo ... 3
   - 1.2 Preparación de la muestra ... 3
   - 1.3 Fundamento del ensayo ... 4
2. Materiales y almacenamiento ... 4
   - 2.1 Materiales suministrados ... 4
   - 2.2 Condiciones de almacenamiento y estabilidad ... 4
   - 2.3 Material necesario pero no suministrado ... 5
   - 2.4 Materiales/equipos opcionales ... 5
3. Procedimiento de ensayo ... 5
   - 3.1 Preparación de reactivos ... 5
     - 3.1.1 Tampón de Extracción y Dilución de Muestras ... 5
     - 3.1.2 Solución de Lavado ... 6
     - 3.1.3 Placa ELISA ... 6
   - 3.2 Preparación de la muestra ... 6
     - 3.2.1 Visión general del flujo de trabajo ... 7
   - 3.3 Procedimiento ELISA ... 7
     - 3.3.1 Visión general del flujo de trabajo ... 8
4. Cálculo e interpretación de los resultados ... 9
5. Precauciones generales ... 10
6. Información adicional ... 10
   - 6.1 Compatibilidad de la extracción de muestras ... 10
   - 6.2 Kit AlerTox ELISA Anacardo ... 11
     - 6.2.1 Resumen de las especificaciones ... 11
     - 6.2.2 Recuperación ... 11
     - 6.2.3 No reactividad cruzada ... 12
7. Ejemplo de diseño del ensayo ... 13
8. Referencias ... 13
9. Descargo de responsabilidad ... 13
10. Información de contacto ... 14
11. Índice de cambios ... 14

Apéndice A. Procedimientos especializados de extracción de muestras ... 15
   - A.1 Para alimentos y bebidas que contienen polifenoles, taninos o antioxidantes ... 15

1. Introducción

Las alergias a los frutos secos (por ejemplo, anacardos, almendras, avellanas, macadamias, pacanas, pistachos y nueces) suelen aparecer a los dos años de edad y no suelen superarse una vez desarrolladas. La prevalencia de las alergias a los frutos secos oscila entre el <1 y el 3% en todo el mundo, pero puede variar mucho según la región y la edad. Aproximadamente el 30% de las personas alérgicas a los frutos secos son alérgicas a más de un fruto seco, y entre el 20 y el 30% de las personas alérgicas a los cacahuetes son alérgicas a uno o más frutos secos.

Los anacardos contienen aproximadamente un 18 % de proteínas. Hay al menos tres proteínas alergénicas, algunas de ellas resistentes al calor, lo que las hace estables en diversos procesos de producción. Dado que los frutos secos son una de las principales causas de anafilaxia mortal, se consideran uno de los "9 grandes" alérgenos que requieren una detección precisa y fiable para la seguridad del consumidor y el cumplimiento de la normativa sobre etiquetado de alimentos.

Además del kit AlerTox® ELISA Anacardo, algunos fabricantes pueden querer utilizar los kits AlerTox ELISA para otros frutos secos, como almendras, avellanas, macadamias, pistachos y nueces. También hay disponibles kits ELISA AlerTox para cacahuetes y cocos. Se puede utilizar la misma preparación de muestra con todas las pruebas ELISA AlerTox mencionadas anteriormente.

Nota: Lea atentamente este manual antes de iniciar el análisis, el cual debe ser realizado por personal debidamente formado.

1.1 Sensibilidad y especificidad del ensayo

El kit AlerTox ELISA Anacardo detecta y cuantifica las proteínas del anacardo en alimentos frescos y procesados, ya sean crudos, cocidos o horneados. El límite de detección (LOD) es de 0,2 ppm (mg de anacardo por kg o L de muestra), el límite de cuantificación (LOQ) es de 2,0 ppm de anacardo entero (mg/kg o mg/L) y la detección es cuantitativa entre 2,0 y 50 ppm de anacardo entero (véase *la sección 6.2.1, Resumen de especificaciones,* para más detalles). Véase *la sección 4, Cálculo de los resultados,* para obtener más detalles sobre la expresión de los resultados.

La reactividad cruzada con otras matrices alimentarias se muestra en la siguiente tabla:

Matriz reactiva cruzada	Porcentaje de reactividad cruzada (%)
Pistacho	0,002
Semillas de lino	0,0002

Nota: La avellana, la nuez moscada y la nuez mostraron resultados entre 0,5 LC y 1 LC y pueden proporcionar valores superiores al LC.

Ver *Sección 6.2.2, Recuperación* y *Sección 6.2.3, No reactividad cruzada*, para datos adicionales.

Importante: No modifique el protocolo con respecto al tiempo, las temperaturas, el lavado de placas, los volúmenes de pipeteo, los tipos de tampones o los valores de pH de los tampones. Cualquiera de estas modificaciones del protocolo invalidará el sistema de ensayo.

1.2 Preparación de la muestra

El kit AlerTox ELISA Anacardo es uno de una serie de veinte kits de pruebas de alérgenos relacionados de Hygiena®. Con estas diferentes pruebas ELISA específicas para alérgenos se pueden detectar y medir dieciséis alérgenos diferentes, incluidos los anacardos, utilizando un solo extracto de muestra, mientras que algunos requieren extracciones individuales. Consulte *la sección 6.1, Compatibilidad de la extracción de muestras*, para obtener más detalles.

1.3 Fundamento del ensayo

El kit AlerTox ELISA Anacardo funciona según el principio de un ELISA sándwich cuantitativo. La concentración de antígeno es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de ensayo. He aquí un breve resumen del ensayo ELISA sándwich:

1. Los anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas del anacardo se unen a la superficie de una placa de microtitulación. Las muestras estándar o de prueba que contienen anacardo se colocan en los pocillos de la placa de microtitulación. Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F), se lavan los pocillos con Solución de Lavado para eliminar el material no unido.
2. Se añaden a los pocillos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa dirigidos contra proteínas de anacardo y, tras una segunda incubación de 20 minutos, se lava de nuevo la placa.
3. Se añade la Solución de Sustrato y se incuba la placa durante otros 20 minutos, con lo que se desarrolla un color azul en los pocillos positivos. El color se vuelve amarillo con la adición de la Solución de Parada, la cual inhibe el desarrollo del color. El color amarillo se mide fotométricamente a 450 nm ($DO_{450\,nm}$).

2. Materiales y almacenamiento

2.1 Materiales suministrados

Artículo	Descripción	96 pocillos
1	Tiras separables de 8 pocillos, cada una recubierta con anticuerpos primarios anti-anacardo. En una bolsa de aluminio que se puede volver a cerrar y que contiene un marco soporte y un agente desecante. Listo para usar.	12 tiras
2	5 AlerTox Cashew Standards, concentraciones: 0 – 2 – 10 – 25 – 50 ppm. Listo para usar.	5 x 3 mL
3	Conjugado: anticuerpos secundarios anti-anacardo conjugados con peroxidasa. Listo para usar.	1 x 15 mL
4	Solución de Sustrato, que contiene trimetilbenceno (TMB). Listo para usar.	1 x 15 mL
5	Solución de Parada, que contiene ácido sulfúrico (H_2SO_4). Listo para usar.	1 x 15 mL
6	Tampón de Extracción y Dilución de Muestras 10X.	4 x 30 mL
7	Solución de Lavado 10X.	2 x 60 mL

2.2 Condiciones de almacenamiento y estabilidad

- Todos los componentes del kit deben conservarse entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) en la oscuridad. NO CONGELAR.
- Conservar todos los reactivos a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) inmediatamente después de su uso.
- La Solución de Lavado diluida (1X) puede utilizarse durante 4 semanas si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F).

  Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando la Solución de Lavado 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de la dilución. No utilice la solución si el precipitado no se redisuelve.

- El Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) puede utilizarse durante 1 semana si se conserva entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F).

  Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de la dilución. No utilice el tampón si el precipitado no se redisuelve.

- Los extractos de la muestra son estables durante al menos 24 horas a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) o durante más tiempo si se congelan.

2.3 Material necesario pero no suministrado

- Aditivo AlerTox para Polifenoles (Nº de producto ASY3213), solo para muestras con polifenoles y antioxidantes*.
- Pipeta multicanal: 50–200 µL
- Puntas de pipeta estériles
- Pipetas: 10–100 µL, 100–1.000 µL
- Baño de agua, ajustable a 60 °C (140 °F)
- Recipientes de 15–30 mL para las extracciones
- Lector de placas ELISA con filtro (450 nm) (Absorbance 96 ELISA Reader, Nº de producto MCH3005, o similar)
- Centrifugadora
- Agua destilada
- Stomacher (homogeneizador), molino, mortero, batidora, etc.
- Mezclador vórtex

* Algunos ejemplos de alimentos ricos en polifenoles, incluidos los taninos, y antioxidantes son: chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, bayas y legumbres como garbanzo y lenteja.

2.4 Materiales/equipos opcionales

- Homogeneizador para la extracción de muestras
- Pipeta de repetición para minimizar la desviación del ensayo
- *Recomendado*: Un lavador de placas ELISA para reducir el tiempo de lavado y mejorar la consistencia.

Los kits AlerTox ELISA han sido validados en equipos ELISA totalmente automatizados (como el robot ELISA automatizado BEAR). Para conocer los detalles de la validación, póngase en contacto con nosotros en www.hygiena.com/support.

3. Procedimiento de ensayo

3.1 Preparación de reactivos

Aconsejamos preparar los reactivos inmediatamente antes de su uso y solo la cantidad necesaria para el número de muestras más los 5 estándares. Se recomiendan mediciones por duplicado de cada muestra y estándar, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y los requisitos de control de calidad.

Importante: Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F) en el momento de su uso.

3.1.1 Tampón de Extracción y Dilución de Muestras

Diluya 1:10 el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras 10X con agua destilada para crear la solución 1X.

Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de diluirlo. No utilice el tampón si el precipitado no se redisuelve.

Nota: Necesitará las siguientes cantidades de cada muestra para su ensayo:

Tipo de muestra	Cantidad de muestra	Cantidad de Tampón 1X de Extracción y Dilución de Muestras
Sólido	0,5 g	10 mL
Líquido	0,5 mL	9,5 mL

3.1.2 Solución de Lavado

Diluya 1:10 la Solución de Lavado 10X con agua destilada para crear la solución 1X.

Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando la Solución de Lavado 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de diluirlo. No utilice la solución si el precipitado no se redisuelve.

Nota: Necesitará aproximadamente 2,5 mL de Solución de Lavado 1X por pocillo.

3.1.3 Placa ELISA

Para preparar la placa ELISA, abra la bolsa de aluminio, extraiga el número de tiras necesarias para realizar el análisis (muestras más los 5 estándares, todo por duplicado) y coloque las tiras en un marco soporte.

Notas:

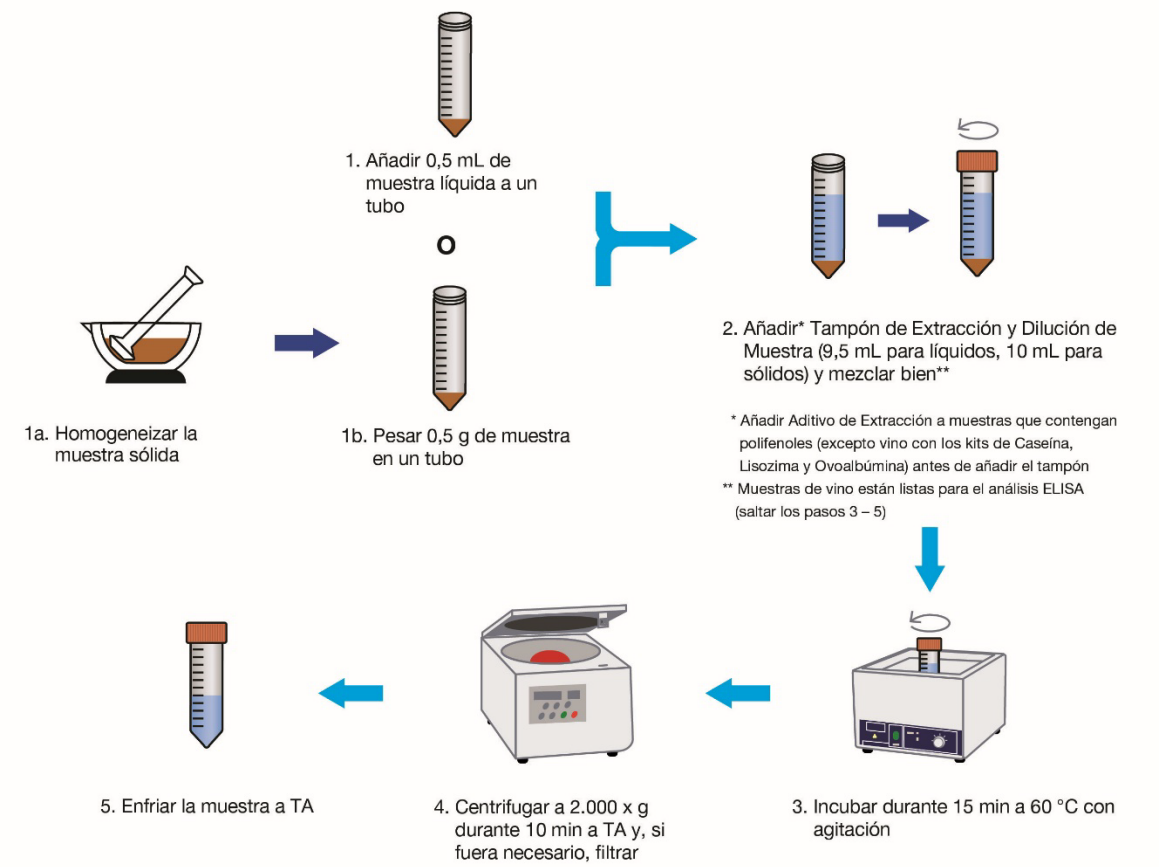
- Al abrir la bolsa de aluminio por primera vez, tenga cuidado de no cortar el cierre de la bolsa.
- Los pocillos no utilizados deben guardarse en la bolsa de aluminio con el agente desecante a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F). Asegúrese de que la bolsa quede bien cerrada.

3.2 Preparación de la muestra

Importante: Véase en *el Apéndice* A el protocolo de preparación de muestras que contienen polifenoles, taninos o antioxidantes. Para otras muestras, siga el procedimiento que se indica a continuación:

1. Resuspender la muestra en el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) según el tipo de muestra:
   a. Para muestras sólidas:
      i. Maximizar la homogeneidad de la muestra pulverizando finamente un mínimo de 5 g de muestra en un mortero, molino de impacto o dispositivo similar.
      ii. Resuspender 0,5 g de la mezcla homogeneizada en 10 mL de Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido 1X.
   b. Para muestras líquidas:
      i. Añadir 0,5 mL de la muestra líquida a 9,5 mL de Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido 1X.
2. Mezclar bien.
3. Incubar la mezcla durante 15 minutos en un baño de agua precalentado a 60 °C (140 °F), agitando las muestras cada 2 minutos para garantizar la homogeneidad.
4. Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 2.000 x *g* a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F). Si el sobrenadante no estuviera completamente separado del precipitado, filtrar el sobrenadante.
5. Enfriar el extracto de la muestra (sobrenadante o filtrado) a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).

3.2.1 Visión general del flujo de trabajo



Importante: Ver las instrucciones especiales para la extracción de muestras para los kits AlerTox ELISA Caseína, Crustáceos, Pescado, Histamina, Lisozima y Leche.

3.3 Procedimiento ELISA

Importante: Los puntos más críticos del procedimiento ELISA son la temperatura, el tiempo y el lavado de los pocillos de la placa. Un lavado insuficiente dará lugar a una precisión deficiente y falsos resultados.

Nota: Para una mayor reproducibilidad, recomendamos utilizar un lavador de placas automatizado en buen estado en los siguientes pasos 3 y 6.

1. Añadir 100 µL de los estándares o los extractos de las muestras por duplicado en los pocillos apropiados de la placa.

   Nota: Consulte *la Sección 7, Ejemplo de diseño del ensayo*. Si tiene un gran número de muestras, pipetee un conjunto de estándares antes de las muestras y el conjunto duplicado de estándares después de las muestras y utilice los valores medios aritméticos para los cálculos.

2. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).

   Importante: No agitar la placa durante esta incubación.

3. Lavar la placa **tres (3)** veces con 300 µL de Solución de Lavado 1X por pocillo.

   Nota: Al final del lavado automático o entre cada lavado manual, invierta la placa y golpéela contra un material absorbente (toallas de papel limpias y secas) para vaciar los pocillos y eliminar el líquido residual.

4. Añadir 100 µL de Solución de Conjugado en cada pocillo.

5. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).

   Importante: No agitar la placa durante esta incubación.

6. Lavar la placa **cinco (5)** veces con 300 µL de Solución de Lavado 1X por pocillo.

   Nota: Al final del lavado automático o entre cada lavado manual, invierta las placas y golpéelas contra un material absorbente (toallas de papel limpias y secas) para vaciar los pocillos y eliminar el líquido residual.

7. Pipetear 100 µL de Solución de Sustrato en cada pocillo.

8. Deje que la reacción se desarrolle en la oscuridad (el sustrato es sensible a la luz) durante 20 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).

   Importante: No agitar la placa durante esta incubación.

9. Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de Solución de Parada (0,5 M H_2SO_4) en cada pocillo.

10. Agite suavemente la placa con la mano y espere 1 minuto.

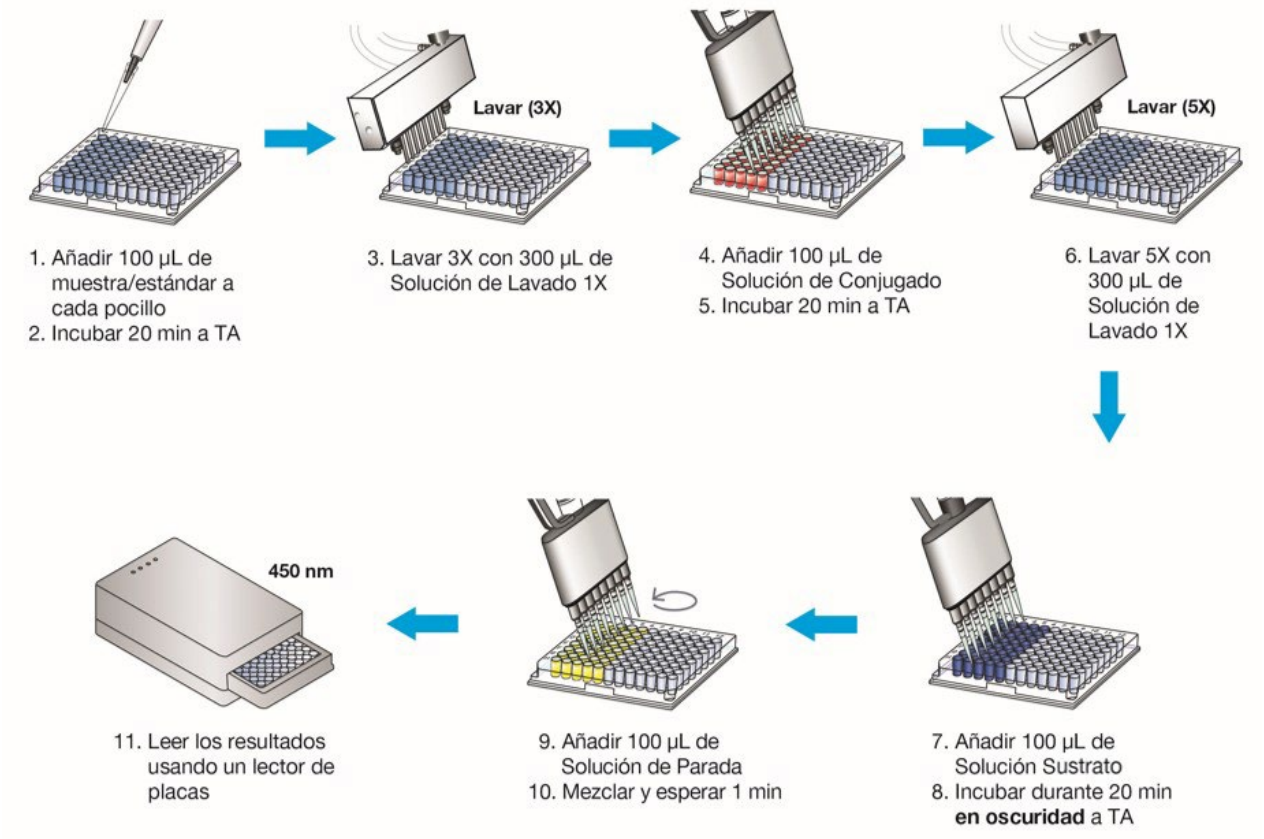
    Nota: Los pocillos que contienen color azul se vuelven amarillos en presencia de proteína de anacardo.

11. Para medir los resultados, utilice un lector de placas ELISA con un filtro de 450 nm ($DO_{450\ nm}$), siguiendo las instrucciones del fabricante del instrumento.

    Nota: Mida el cambio de color dentro del período de 30 minutos.

    Importante: Si alguno de los resultados de las muestras se encuentra fuera del rango de la curva estándar del anacardo, no extrapola los datos. En su lugar, diluya el extracto de la muestra con el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) y repita el ensayo ELISA utilizando este extracto de muestra diluido y los estándares, por duplicado.

3.3.1 Visión general del flujo de trabajo



4. Cálculo e interpretación de los resultados

Los resultados se miden como concentraciones de anacardo entero y no de proteína de anacardo. Véase el paso 5 más abajo para conocer el factor de conversión que permite calcular las concentraciones de proteína de anacardo.

Las normas se han elaborado para determinar directamente las concentraciones totales de anacardo en las muestras. La dilución de las muestras en el proceso de extracción, tal como se describe en los procedimientos de preparación de muestras, ya se tiene en cuenta al calcular los niveles. Sin embargo, los resultados deben tener en cuenta cualquier dilución adicional (por ejemplo, debida a una alta concentración de la muestra o a algunos procedimientos alternativos de extracción de la muestra) (Nota de la etapa 4). Utilice la *hoja de cálculo de AlerTox ELISA* (disponible en www.hygiena.com/documents) o las instrucciones siguientes para calcular los resultados.

Importante: No utilice la *Hoja de Cálculo AlerTox ELISA* si el Estándar Cero en el software del lector de placas está definido como Blanco para el cálculo de $B - B_0$.

A la hora de interpretar los resultados, se utiliza la media aritmética para los cálculos.

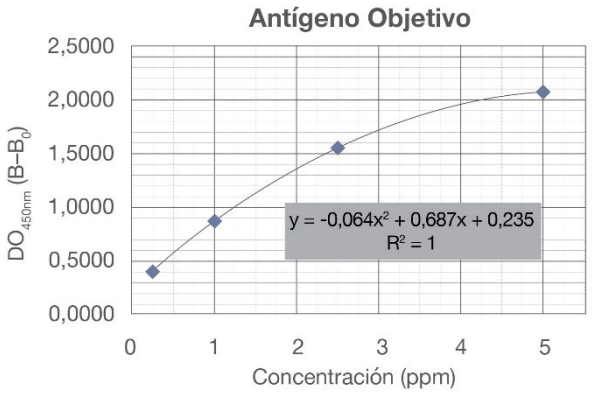
1. Calcular el valor medio de DO ($DO_{450\ nm}$) para cada conjunto de patrones de referencia y muestras duplicados.
2. Reste el valor medio del estándar cero a cada valor medio de DO de los estándares o muestras ($DO - DO_{Estándar\ 0} = B - B_0$). Véase más adelante, *Ejemplo de datos de ensayo*.

   Importante: Si en el software del lector de placas, el estándar cero está definido como blanco para el cálculo de $B - B_0$, omita este paso.
3. Para crear la curva estándar, represente los valores de DO ajustados de los estándares 1 a 4 en el eje Y frente a la concentración de anacardo entero en ppm en el eje X. Véase más adelante*, Ejemplo de una curva estándar típica*.
4. Para cada extracto de muestra, hallar el valor $B - B_0$ en el eje y. A continuación, lea el valor correspondiente en el eje x de la curva estándar para determinar la concentración de anacardo entero.
5. **Nota**: Cuando se utilice el procedimiento estándar de preparación de muestras (Sección 3.2), no es necesario multiplicar la concentración resultante de la muestra de producto alimenticio por el factor de dilución de 20.
6. Para convertir ppm de anacardo entero a ppm de proteína de anacardo, divida los resultados por 5,5 [1].

Ejemplo de datos de ensayo

Estándar	Antígeno diana [ppm]	$DO_{450\ nm}$ medio	$B - B_0$
Cero	0,0	0,108	—
1	2,0	0,265	0,157
2	10,0	0,606	0,498
3	25,0	1,193	1,085
4	50,0	1,928	1,820

Ejemplo de curva estándar típica



5. Precauciones generales

- Si su piel entra en contacto con sustancias tóxicas o irritantes, enjuague la zona afectada con abundante agua y busque atención médica si es necesario. Consulte la SDS, disponible en www.hygiena.com/SDS.
  - La Solución de Sustrato contiene TMB, que es altamente tóxico si se inhala, ingiere o entra en contacto con la piel. Consulte la SDS.
  - La Solución de Parada contiene H_2SO_4, que es corrosivo. Consulte la SDS.
- Manipule el kit de ensayo de acuerdo con las BPL.
  - No utilice reactivos después de la fecha de caducidad del kit.
  - Manipular todas las soluciones con guantes.
  - Durante la extracción de la muestra, evite la contaminación cruzada.
  - Los dispositivos, como la batidora, deben limpiarse después de cada preparación de la muestra.
  - Utilice puntas de pipeta estériles.
  - No intercambie las tapas de los viales de reactivos.
  - No intercambie reactivos entre kits con números de lote diferentes.
- No altere los reactivos. Hacerlo puede causar resultados inexactos.
- Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F) antes de su uso.
- No utilice las soluciones si se enturbian o precipitan. Las únicas excepciones son la Solución de Lavado 10X y el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras 10X, que pueden tener precipitados cristalinos que deben disolverse completamente antes de su uso (véase la sección 2.2).
- La Solución de Sustrato es sensible a la luz. Evite la exposición a la luz directa y guárdela en la oscuridad.
- Utilice únicamente agua destilada para la dilución de tampones concentrados.
- No deje que los pocillos se sequen completamente.
- Evite incubar las placas multipocillos en bancos de trabajo fríos.

6. Información adicional

6.1 Compatibilidad de la extracción de muestras

Los siguientes kits AlerTox ELISA comparten el mismo protocolo de preparación de muestras, lo que significa que el extracto de la muestra puede analizarse utilizando 16 ensayos ELISA diferentes:

Extracciones de muestras compatibles			
AlerTox ELISA Almendra	AlerTox ELISA BLG*	AlerTox ELISA Anacardo	AlerTox ELISA Coco
AlerTox ELISA Huevo	AlerTox ELISA Avellana	AlerTox ELISA Altramuz	AlerTox ELISA Lisozima†
AlerTox ELISA Macadamia	AlerTox ELISA Mostaza	AlerTox ELISA Ovoalbúmina	AlerTox ELISA Cacahuete
AlerTox ELISA Pistacho	AlerTox ELISA Sésamo	AlerTox ELISA Soja (STI‡)	AlerTox ELISA Nuez

* BLG = β-lactoglobulina

† Sólo el extracto de vino es compatible. (El queso y otros extractos de alimentos no son compatibles.)

‡ STI = Inhibidor de la tripsina de soja

Las muestras individuales deben extraerse por separado cuando se utilicen los siguientes kits:

Extracciones de muestras individuales requeridas		
AlerTox ELISA Caseína	AlerTox ELISA Crustáceos	AlerTox ELISA Pescado
AlerTox ELISA Histamina	AlerTox ELISA Lisozima†	AlerTox ELISA Leche

* El kit AlerTox ELISA Histamina se basa en un ensayo ELISA competitivo, mientras que todos los demás kits AlerTox ELISA se basan en ensayos ELISA sándwich.

† El queso y otras muestras de alimentos, excepto el vino, deben extraerse por separado.

6.2 Kit AlerTox ELISA Anacardo

6.2.1 Resumen de las especificaciones

Especificación	AlerTox ELISA Anacardo*
Resultados	Concentración de anacardo entero
Límite de detección (LD)	0,2 ppm
Límite de cuantificación (LC)	2,0 ppm
Rango de concentración de estándares	0,0 a 50 ppm
Rango de cuantificación	2,0 a 50 ppm
Factor de cálculo†	Proteína de anacardo [1] Dividir por 5,5

* ppm = mg de anacardo entero por kg o L de muestra

† Utilice el factor de cálculo para convertir los resultados a la concentración de proteína de anacardo.

Para los datos de ensayo específicos del lote y los criterios de aceptación/rechazo de los valores medidos, véase el Certificado de Análisis (www.hygiena.com/COA).

6.2.2 Recuperación

Matriz*	Recuperación (%)
Galletas	109
Copos de maíz	98
Chocolate negro	102
Helado	93

* Analizado en matrices típicas.

6.2.3 No reactividad cruzada

De las matrices probadas, se comprobó que las siguientes no presentaban reactividad cruzada con el kit AlerTox ELISA Anacardo:

Matrices no reactivas				
Alubia adzuki	Almendra	Albaricoque	Cebada	Frijol blanco
Carne de res	Carne de vacuno (cocida)	Nuez de Brasil	Trigo sarraceno	Col blanca
Anís	Cardamomo	Goma de algarrobo	Zanahoria	Cayena
Apio	Cereza	Perifollo	Castaña	Chía
Pollo	Garbanzo	Chili	Canela	Clavo
Cacao	Coco	Bacalao	Maíz	Cangrejo (cocido)
Cangrejo (crudo)	Comino	Eneldo	Pato	Huevo
Hinojo	Alholva	Berro	Ajo (fresco)	Ajo (granulado)
Gelatina de vaca	Gelatina de pescado	Jengibre (molido)	Jengibre (fresco)	Gliadina
Goma guar	Goma arábiga	Avellana*	Rábano picante	Icing
Alubia	Kiwi	Cordero	Puerro	Lenteja
Lupino	Macadamia	Leche de vaca	Leche de cabra	Mostaza amarilla
Nuez moscada*	Avena	Cebolla	Pimentón	Guisante
Melocotón	Cacahuete	Pacana	Pimienta negra	Semilla de pino
Ciruela	Amapola	Cerdo	Patata	Gambas (cocidas)
Gambas (crudas)	Semillas de calabaza	Rábano	Colza	Arroz
Centeno	Sacarosa	Sésamo	Gambas	Harina de soja
Lecitina de soja	Guisantes partidos	Semillas de girasol	Tomillo	Tofu
Tomate	Pavo	Cúrcuma	Nuez*	Trigo

***** La avellana, la nuez moscada y la nuez mostraron resultados entre 0,5 LC y 1 LC y pueden proporcionar valores superiores al LC.

7. Ejemplo de diseño del ensayo

S0: Estándar cero (sin antígeno): el valor medio = B_0.

S1 - S4: Estándares: el valor medio = B.

SP: Muestras: el valor medio = B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**S0**	**S0**	SP4	SP4	SP12	SP12						
B	**S1**	**S1**	SP5	SP5	Etc.	Etc.						
C	**S2**	**S2**	SP6	SP6	Etc.	Etc.						
D	**S3**	**S3**	SP7	SP7	Etc.	Etc.						
E	**S4**	**S4**	SP8	SP8	Etc.	Etc.						
F	SP1	SP1	SP9	SP9	Etc.	Etc.						
G	SP2	SP2	SP10	SP10	Etc.	Etc.						
H	SP3	SP3	SP11	SP11	Etc.	Etc.						

8. Referencias

1. USDA, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2019) Frutos secos, anacardos, crudos. https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170162/nutrients.

9. Descargo de responsabilidad

Campo de utilización: Utilice el producto Hygiena para investigación y desarrollo, garantía de calidad y control de calidad bajo la supervisión de personas técnicamente cualificadas. La información generada a partir del producto Hygiena sólo debe utilizarse junto con el programa habitual de garantía de calidad del usuario. El producto Hygiena no debe utilizarse como única base para evaluar la seguridad de los productos destinados a los consumidores. Los datos obtenidos con el producto Hygiena no deben utilizarse con fines de diagnóstico o tratamiento humano. Antes de utilizar el producto, lea la *Limitación de garantía y responsabilidad* (disponible en las *Condiciones generales de Hygiena* en www.hygiena.com/terms-and-conditions).

Estos productos están fabricados con materias primas de alta calidad. No se ofrece garantía de ningún tipo, ni expresa ni implícita, en cuanto a su idoneidad más allá de la medición del contenido de antígeno diana cuando se utilizan exactamente de acuerdo con estas instrucciones, excepto en lo relativo a la calidad de estos materiales.

El uso del kit para cualquier otro fin está fuera de su uso previsto. En el caso de matrices que no hayan sido validadas previamente, Hygiena no puede garantizar que el kit sea apto para su uso y que los resultados obtenidos para estas matrices sean precisos. Los clientes pueden optar por utilizar el producto en matrices de

alimentos o superficies no validadas; sin embargo, Hygiena recomienda encarecidamente que los usuarios realicen sus propias pruebas de adecuación para el uso para confirmar la idoneidad y el rendimiento en su aplicación específica. Cualquier daño, incluidos los daños o gastos resultantes o especiales derivados directa o indirectamente del uso de este producto, se limitan al valor de reposición del kit.

Para obtener más información o ayuda con la validación de matrices, póngase en contacto con Hygiena en www.hygiena.com/support. Todos los términos y condiciones de Hygiena son aplicables y se pueden encontrar en: www.hygiena.com/terms-and-conditions.

10. Información de contacto

Para más información, visite www.hygiena.com/contact. Para obtener asistencia técnica, visite www.hygiena.com/support.

11. Índice de cambios

INS3022 REVD, julio 2020
Se han aclarado algunas partes de la tabla de factores de conversión.

INS-KIT3053-001-REVA, junio 2025
Actualización de los datos de recuperación, los datos de selectividad y el número de identificación del documento. Incluido el uso del Aditivo AlerTox para Polifenoles para algunas preparaciones de muestras.

INS-KIT3053-001-REVB, febrero 2026
Clarifica la declaración de reactividad cruzada.

Apéndice A. Procedimientos especializados de extracción de muestras

A.1 Para alimentos y bebidas que contienen polifenoles, taninos o antioxidantes

Siga este protocolo de preparación de muestras cuando analice alimentos y bebidas ricos en polifenoles, incluidos taninos y antioxidantes. En la siguiente tabla se enumeran algunos ejemplos:

Matrices representativas		
Bayas	Chocolate	Maíz morado
Fibra de maíz	Café	Legumbres (por ejemplo, garbanzo, lenteja)
Soja	Té	Vino

Importante: Este procedimiento **no** debe utilizarse con los siguientes kits:

- Kit AlerTox ELISA Crustáceo
- Kit AlerTox ELISA Histamina
- Kit AlerTox ELISA Lisozima
- Extractos de vino para los siguientes kits:
  - Kit AlerTox ELISA Caseína
  - Kit AlerTox ELISA Ovoalbúmina

a. Para muestras sólidas, maximice la homogeneidad de la muestra pulverizando finamente un mínimo de 5 g de muestra en un mortero, molino de impacto o dispositivo similar.

   Nota: Para muestras líquidas, proceder con la etapa b.

b. Mezclar la muestra con el Aditivo AlerTox para Polifenoles (Nº de producto ASY3213) y el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X), según el kit utilizado:

   i. Para los kits AlerTox ELISA excepto Avellana y Pistacho: mezclar primero la muestra y el Aditivo AlerTox para Polifenoles, después añadir el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) (ver tabla abajo) y mezclar bien.

   ii. Para los kits AlerTox ELISA Avellana y Pistacho: Disuelva 1 g de Aditivo AlerTox para Polifenoles en 100 mL de Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) antes de mezclar con la cantidad específica de muestra (ver tabla abajo).

Kit	Muestra	Aditivo AlerTox para Polifenoles	1X Tampón de Extracción y Dilución de Muestras
Kits AlerTox ELISA*	1 g (Etapa a, sólido)	2 g	20 mL
	1 mL	2 g	19 mL
Kit AlerTox ELISA Leche	0,5 g (Etapa a, sólido)	1 g	10 mL
	0,5 mL	1 g	9,5 mL
Kits AlerTox ELISA Avellana y Pistacho	0,5 g (Etapa a, sólido)	10 mL	
	0,5 mL	9,5 mL	

* Es decir, todos los kits AlerTox ELISA excepto los específicos para avellana, pistacho, leche o los excluidos en la nota importante anterior.

c. Incubar durante 15 minutos en un baño de agua precalentado a 60 °C (140 °F), agitando las muestras cada 2 minutos para garantizar la homogeneidad.

d. Centrifugar durante 10 minutos a ≥ 2.500 x *g*.

e. Si el sobrenadante aún no está completamente separado de las partículas, fíltrelo.

f. Proceder con el *Procedimiento ELISA* (Sección 3.3).
Importante: Los cálculos de los resultados **no** requerirán ajustes adicionales del factor de dilución para este procedimiento.

Hygiena

Camarillo, CA 93012

EE. UU.

www.hygiena.com/support

Fabricado por

Hygiena Diagnóstica España S.L.

P. I. Parque Plata

Calle Cañada Real 31 – 35

41900, Camas (Sevilla), España

www.hygiena.com