

# GlutenTox<sup>®</sup> ELISA

## RAPID G12

Kit de determinación de gluten para muestras alimenticias





## 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.....	4
8. Recomendaciones.....	5
9. Preparación de reactivos .....	5
10. Preparación 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 .....	11
15. Propiedad intelectual .....	11
16. Referencias.....	11
 ANEXO 1. Protocolos recomendados.....	 13

## 1. Uso previsto

GlutenTox ELISA Rapid G12 es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para la determinación de gluten (de trigo, cebada, centeno y avena)\*, daño para las personas celíacas, en alimentos (no procesados o procesados)\*\* y bebidas.

\* No apto para fuentes hidrolizadas de gluten.

\*\* Matrices validadas según los protocolos AOAC *Performance Tested Methods (PTM)*:

Alimentos: harina de soja, pan de maíz, sazónador preparado, copos de avena, leche evaporada y pan incurrido.

## 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 inmunotóxica 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) y de la solución sustrato (TMB) permitirá medir la señal (cambio de color).

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 (100 mL)
- Solución de Dilución (60 mL)
- Solución de Extracción (200 mL)
- Anticuerpo conjugado GlutenTox A1- HRP (15 mL)
- Solución Sustrato (12 mL)
- Solución Stop, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M (12 mL)
- 6 Patrones GlutenTox (0 a 50 ng/ml gliadina, 1,25 mL cada uno)
- 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 monocal, 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 HygieneTM.

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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). 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 competitive.

### Consideraciones Generales

- Las muestras con resultado negativo aún podrían contener una contaminación de gluten por debajo del límite de detección del ensayo (0,4 ppm gluten).
- 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. Preparación 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.

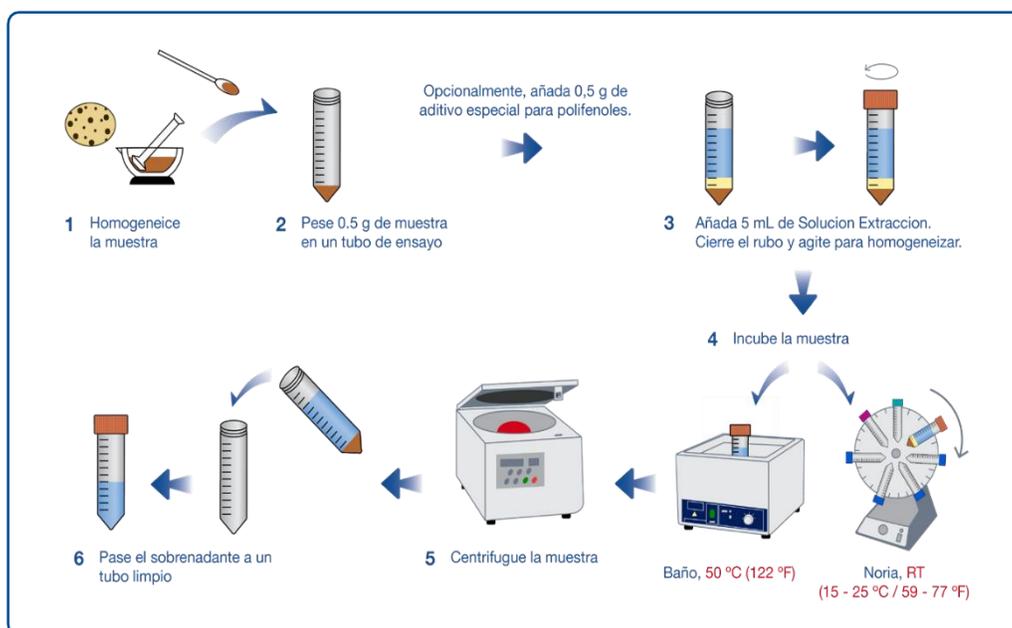


Figura 1. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

## 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 cm<sup>2</sup> 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.

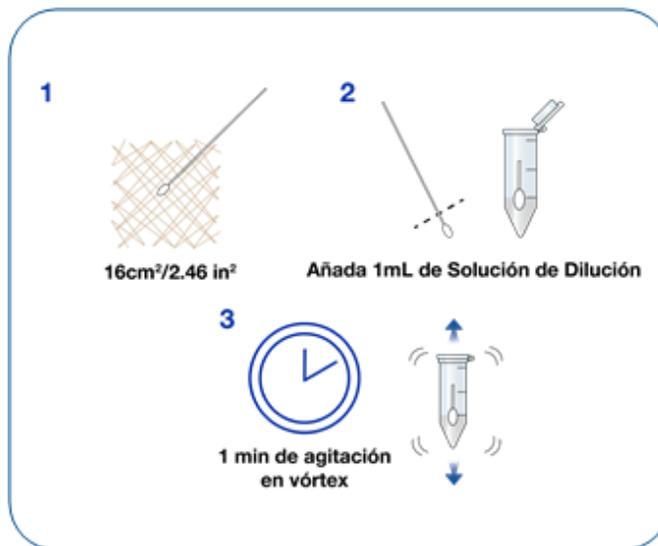


Figura 2. Esquema del procedimiento de preparación de muestra de hisopo

## 11. Procedimiento de análisis

11.1. Se recomienda que todas las condiciones del ensayo (patrones GlutenTox, control positivo, control 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  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$
Bajo contenido de gluten (20 a 50 ppm)	1:50	20 $\mu\text{L}$	980 $\mu\text{L}$
Contenido medio de gluten (50 a 100 ppm)	1:100	10 $\mu\text{L}$	990 $\mu\text{L}$
Alto contenido en gluten (100 a 200 ppm)	1:200	5 $\mu\text{L}$	995 $\mu\text{L}$

11.3. Añada 100  $\mu\text{L}$  de los patrones, los controles y las muestras (a la dilución correspondiente) por pocillo, y por duplicado (cada uno en dos pocillos). Cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15-25  $^{\circ}\text{C}$  / 59-77  $^{\circ}\text{F}$ ) durante 30 minutos.

11.4. **Lavados:** elimine el contenido de los pocillos; añada 300  $\mu\text{L}$  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.** Después 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  $\mu$ L del anticuerpo GlutenTox A1-HRP a cada pocillo, cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15-25  $^{\circ}$ C / 59-77  $^{\circ}$ 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.**

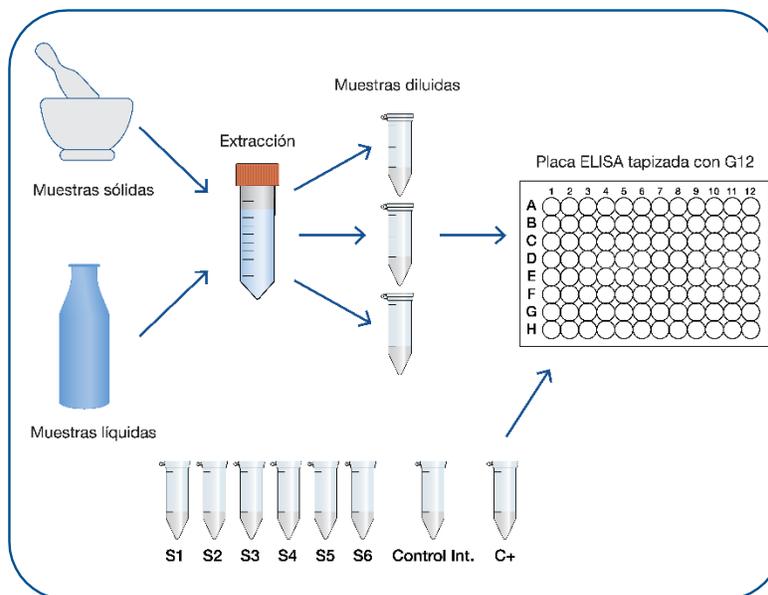


Figura 3. Esquema del procedimiento de análisis

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

11.7. Añada 100  $\mu$ L de Solución Sustrato a todos los pocillos. Cubra la placa e incube a temperatura ambiente (15 - 25  $^{\circ}$ C / 59 - 77  $^{\circ}$ F) durante 30 min **en oscuridad**.

11.8. Añada 100  $\mu$ L 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 Hygiene 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.

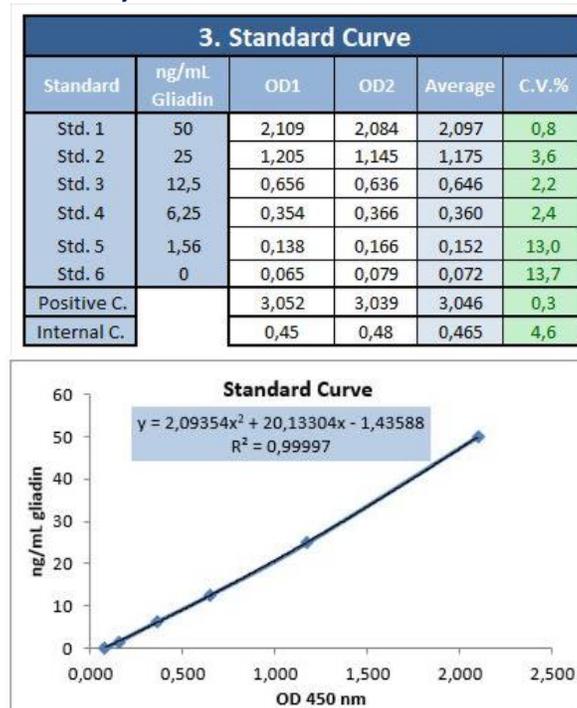


Figura 4. Ejemplo de curva de patron

### 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 Patrón 6 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:

### Sensibilidad

El límite de detección (LD) del ensayo es 0,4 ppm de gluten / 0,2 ppm de gliadina. El límite de cuantificación (LC) es 1,2 ppm de gluten / 0,6 ppm de gliadina. El rango de cuantificación del ensayo es de 1,2-200 ppm de gluten (0,6-100 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):

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

**NOTA:** Si se obtiene un valor de gluten que está por encima del Límite Superior de Cuantificación establecido para la dilución utilizada, se deben realizar diluciones adicionales y reanalizarlas para obtener un resultado válido.

**El límite de detección (LD) del método de análisis de superficie es 1,8 ng gliadina/cm<sup>2</sup> (3,6 ng gluten/cm<sup>2</sup>). 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. Cuando la fuente de gluten es cebada o centeno, esta prueba podría mostrar una sobrestimación ocasional y ligera (2,5%-37%) dependiendo de la matriz y de la concentración de gluten en la muestra. Esporádicamente, la sobreestimación podría ser moderada (46%-85%).

## 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

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



- 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.
- 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 antioxidants.

- 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.