

GlutenTox[®] SticksPlus

Test rápido para la detección del contenido de gluten en alimentos y superficies

Nº de producto KIT3005





Contenidos

1. Uso previsto	3
2. Introducción	3
3. Fundamento del test.....	3
4. Materiales suministrados.....	5
5. Materiales necesarios no suministrados	5
6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad	5
7. Precauciones	5
8. Preparación de muestras de alimentos, bebidas y otros productos de consumo	6
8.1 Muestras sólidas	6
8.2 Muestras líquidas	7
9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción.....	8
10. Interpretación de resultados para alimentos	9
11. Análisis de superficies	10
12. Interpretación de resultados para superficies.....	11
12.1 Lectura final de la tira a los 10 minutos	11
12.2 Lectura parcial de la tira a los 4 minutos	11
13. Control de calidad	11
14. Características analíticas.....	12
14.1 Sensibilidad	12
14.2 Sensibilidad en el análisis de superficies.....	12
14.3 Especificidad.....	12
14.4 Validación interna	13
15. Propiedad intelectual.....	14
16. Referencias.....	14



1. Uso previsto

GlutenTox® Sticks Plus es un test inmunocromatográfico rápido que permite la detección de gluten* inmunotóxico dañino para celíacos en todo tipo de alimentos, bebidas y otros productos de consumo, así como en superficies.

* No apto para fuentes hidrolizadas de gluten.

2. Introducción

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

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

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

** Miligramos de gluten por kilogramo de alimento.

3. Fundamento del test

GlutenTox Sticks Plus es un test inmunocromatográfico (test de flujo lateral) que permite determinar semicuantitativamente la cantidad de gluten en muestras de alimentos de muy diversa naturaleza y grado de procesamiento, desde materias primas hasta alimentos procesados y/o tratados con calor y, también, de productos de consumo de riesgo para los celíacos. Está basado en el anticuerpo anti-gliadina G12, que reconoce específicamente el péptido 33-mer, la fracción más inmunogénica del gluten [3].

GlutenTox Sticks Plus puede aplicarse, además, a la detección de gluten en superficies de trabajo, lo que permite llevar a cabo un control de la limpieza de las zonas de producción, requisito indispensable para prevenir el riesgo de contaminación en el producto final.

Este test es especialmente útil en el control rutinario de las empresas agroalimentarias para asegurar que sus productos cumplen con el programa de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), así como para garantizar su correcto etiquetado. Permite, además, la toma rápida de decisiones y acciones correctivas cuando se haya producido alguna contaminación a lo largo de la cadena de producción.

En todos los métodos de análisis de gluten el primer paso es la extracción del gluten de las muestras, siendo éste uno de los puntos más críticos. La solución de extracción UGES proporcionada en este kit es válida para todo tipo de alimentos gracias a la combinación de agentes disgregantes, reductores y solubilizantes. Para el análisis de alimentos con polifenoles, incluyendo taninos, como son el chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, etc., es necesario añadir un aditivo especial (no incluido en este kit, ver sección 5) en el proceso de extracción, con objeto de evitar las interferencias de estos compuestos (ver Figura 1). Lo mismo ocurre en el caso de productos cosméticos con compuestos antioxidantes como son las vitaminas A, C y E, los carotenos, carotenoides, etc.

Tras la extracción, en la etapa de detección, el gluten presente en la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales anti-gliadina G12 unidos a microesferas rojas) fijados previamente en la tira [3]. Estos complejos avanzan por capilaridad a lo largo de la tira y reaccionan con un segundo anticuerpo anti-gliadina, también previamente inmovilizado en la tira. Para indicar que el resultado es positivo, una línea de color ROJO aparecerá en la zona de resultado de la tira. La ausencia de esta línea indica un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de gluten, la mezcla de conjugado va avanzando por la tira, acumulándose en la región 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. La aparición de esta línea se utiliza para: 1) verificar que se ha añadido un volumen de muestra suficiente, 2) indicar que el flujo ha sido apropiado; y 3) confirmar que las partículas de conjugado se han liberado correctamente. Si la línea azul no aparece, el test debe considerarse inválido.

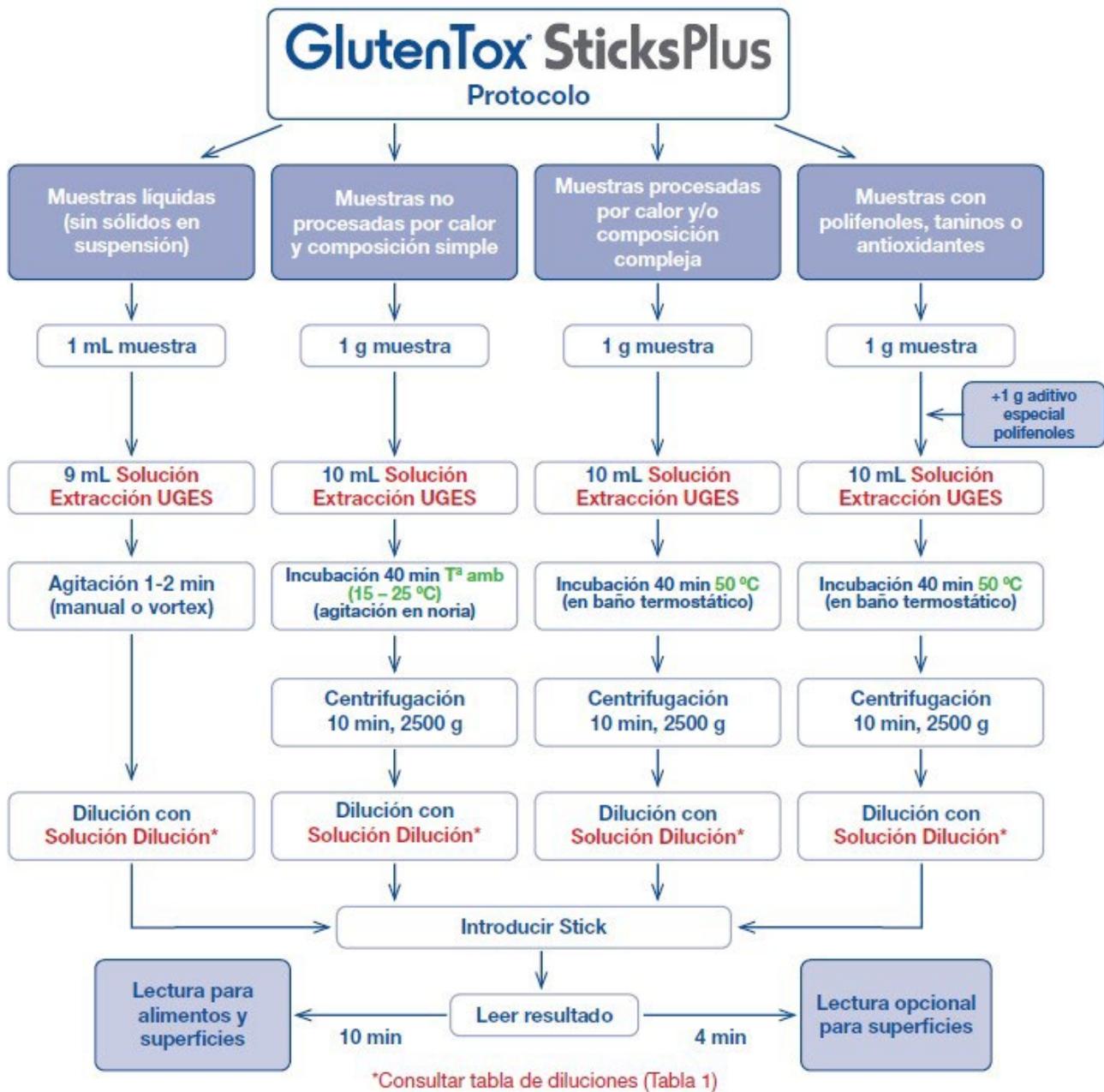


Figura 1. Esquema del protocolo de uso de las tiras GlutenTox Sticks Plus.



4. Materiales suministrados

- GlutenTox Sticks (25 tiras)
- Solución de Extracción UGES (Universal Gluten Extraction Solution) (250 mL)
- Solución de Dilución (30 mL)
- Tiras multipocillo (4 tiras x 8 pocillos)
- Instrucciones de uso

5. Materiales necesarios no suministrados

- Control Positivo (harina integral de avena contaminada con gluten, 10 g) (Nº de producto ASY3052)
- Control Negativo (harina de maíz, 10 g) (Nº de producto ASY3051)
- Balanza analítica (precisión 0,1 g)
- Baño termostático (no necesario en muestras no procesadas por calor y de composición simple)
- Tubos de ensayo con tapón (>10 mL)
- Viales de ensayo
- Centrífuga (opcional)
- Micropipetas y puntas desechables
- Guantes desechables
- Vórtex (opcional)
- Agitador de noria o similar
- Cronómetro

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

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

Importante: 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.

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

* Para más información consulte con su proveedor.

6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Se debe almacenar el producto entre 15 y 25 °C en su envase original, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No debe abrirse hasta el momento de su uso.

AVISO: Mantenga siempre bien cerrado el tubo con las tiras. Una vez que el sellado se rompa, conserve el tubo con las tiras a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) correctamente cerrado. Para evitar la condensación de agua no lo refrigere una vez abierto. Nunca lo congele.

7. Precauciones

- Solo para analizar alimentos, bebidas u otros productos de riesgo para los celíacos y superficies.
- No ingerir ninguna solución (líquido) ni aditivo del kit.
- No usar ningún elemento del kit después de la fecha de caducidad.
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo.

- Solo toque las tiras con guantes o con las manos limpias. Evite, en todo caso, tocar la zona absorbente del extremo blanco de la tira, ya que esto puede conducir a la aparición de falsos positivos.
- Si un alimento consta de varias partes, asegúrese de tomar una muestra representativa de cada una y de preparar una muestra final homogénea. Si no lo hace así y el gluten estuviera distribuido desigualmente en el alimento, podría obtenerse un falso negativo.

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

8.1 Muestras sólidas

1. Homogeneice y/o triture la muestra.
2. Pese 1 g de muestra y añádalo a un tubo de ensayo.
Importante: Si la muestra, sea sólida o líquida, contiene polifenoles, taninos (p. ej. chocolate, vino) o antioxidantes, pese y añada al tubo con la muestra 1 g de aditivo especial polifenoles (KIT3008) y agítelo vigorosamente para homogeneizar la mezcla.
3. Añada 10 mL de Solución de Extracción UGES. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex). Para preparar los controles positivo y negativo, siga el mismo procedimiento.
4. Dependiendo de la complejidad de la matriz de la muestra y de si la muestra de alimento ha sido procesada o no por calor, el proceso de extracción puede requerir o no tratamiento térmico (ver Figura 2):
 - a) Muestras no procesadas por calor y de composición simple:
Incubar la muestra durante 40 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) mediante el uso de un agitador de noria.
 - b) Muestras procesadas por calor y/o de composición compleja, o muestras con polifenoles, taninos o antioxidantes:
Incubar la muestra a 50 °C en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.
Importante: Si el tipo de muestra es difícil de determinar, recomendamos el uso de calor (opción b) para facilitar la extracción.
5. Separe los sólidos presentes en la muestra por sedimentación o centrifugación (10 min a 2500 x g).
6. Transfiera el sobrenadante clarificado a un tubo limpio.
Importante: Las muestras, una vez extraídas, deben analizarse tan pronto como sea posible.

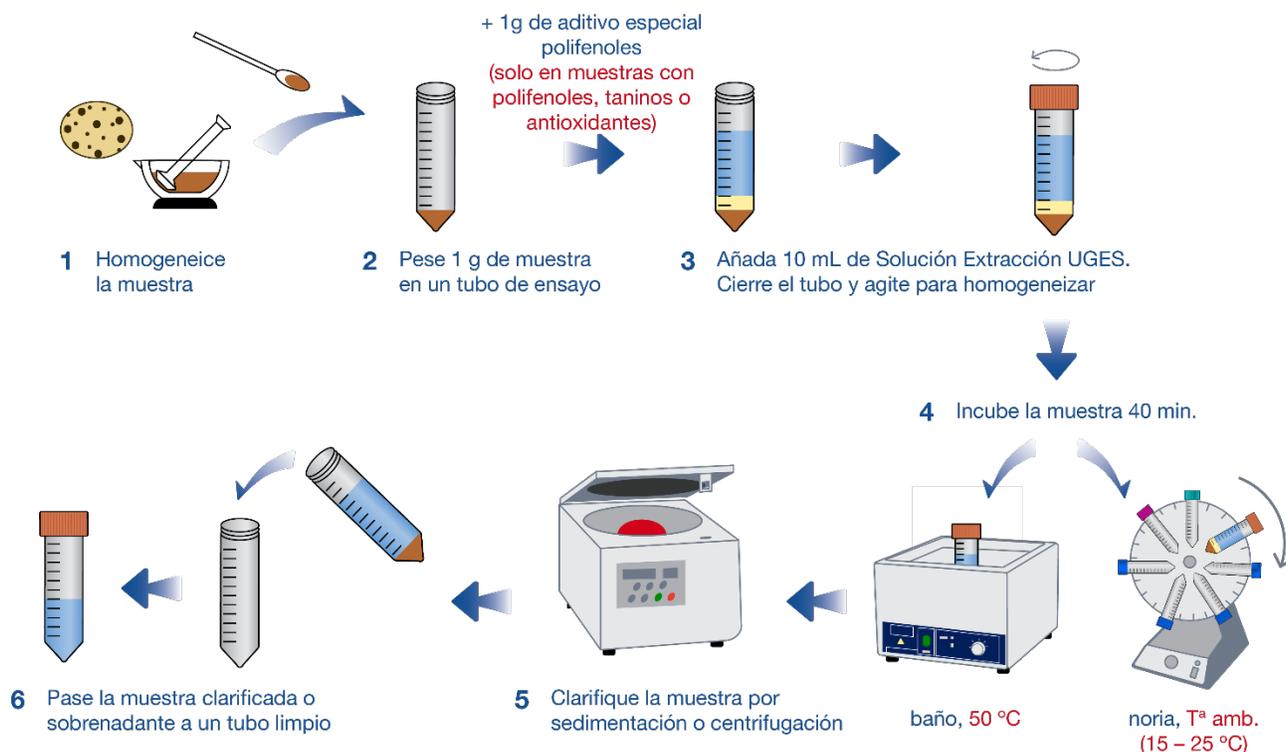


Figure 2. Scheme of the Extraction Procedure of Solid Samples.

8.2 Muestras líquidas

Importante: Muestras líquidas con polifenoles, taninos o antioxidantes deben extraerse según lo indicado en el apartado 8.1, *Muestras sólidas*.

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

1. Añada 1 mL de muestra a un tubo de ensayo.
2. Añada 9 mL de Solución de Extracción UGES. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex).
3. Agite la muestra manualmente (de forma vigorosa) o mediante un vórtex, durante 1 – 2 minutos.

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

9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción

1. Acondicione a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) las muestras y controles clarificados, la Solución de Dilución y el tubo con las tiras GlutenTox Sticks.
2. Diluya la muestra con Solución de Dilución en tubos o viales de ensayo. Un volumen final de 900 – 1000 µL es suficiente para realizar el ensayo.

Tabla 1. Tabla de diluciones.

Dilución	Límite de Detección redondeado (ppm)	Límite de Detección real (ppm)	Volumen de muestra extraída (µL)	Volumen de Solución de Dilución (µL)
1:25	3	3.5	40	960
1:75	10	10.5	13.3	986.7
1:150	20	21	6.6	993.4
1:250	30	35	4	996
1:750	100	105	1.3	998.7

Si se desconoce por completo la cantidad de gluten que se espera encontrar en la muestra, se recomienda realizar el ensayo con la menor dilución (1:25) para trabajar al máximo de sensibilidad. En caso de obtener un resultado positivo puede repetirse el ensayo realizando diluciones mayores para tener una estimación semicuantitativa más acotada del rango de concentración de gluten presente en dicha muestra (véase apartado 14, *Características analíticas*).

Importante: Si se trata de una muestra con polifenoles, taninos o antioxidantes y por tanto en la etapa de extracción ha añadido el aditivo especial para polifenoles, la dilución mínima de ensayo es de 1:75. Nunca realizar en estos casos diluciones menores (es decir, dilución 1:25), ya que la presencia del aditivo especial para polifenoles repercute en el buen funcionamiento de la tira si se realiza una dilución menor de 1:75.

Importante: En muestras con alto contenido en grasas, evitar coger la capa de grasa sobrenadante.

Importante: Las diluciones de las muestras deben analizarse en un corto espacio de tiempo y el material restante debe desecharse.

3. Deposite 100 µL de la muestra diluida en uno de los pocillos de las tiras multipocillo suministradas en el kit.
4. Abra el tubo con los GlutenTox Sticks, saque las tiras necesarias y cierre el tubo inmediatamente.
5. Introduzca el extremo blanco de la tira en el pocillo de ensayo con la muestra diluida.
6. **Espere 10 minutos** y lea el resultado en la tira.

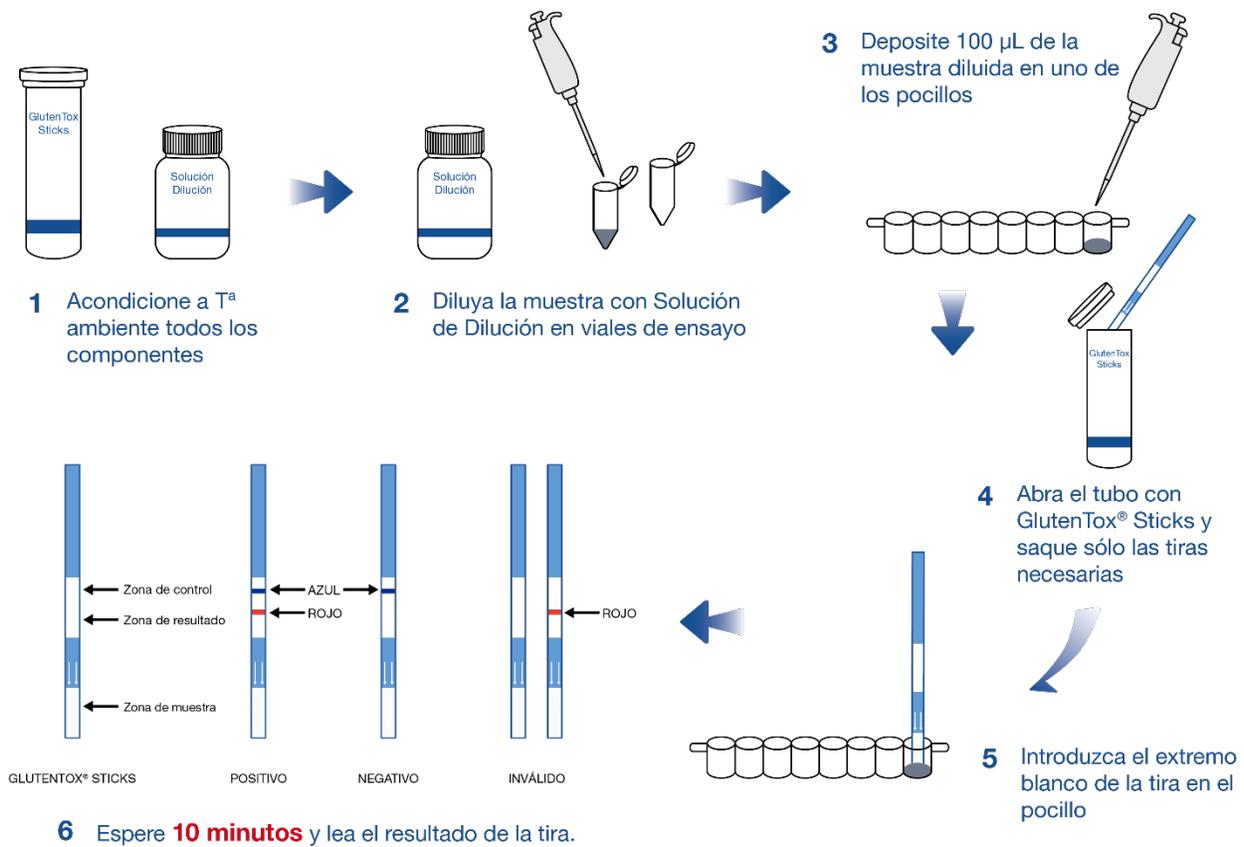


Figura 3. Esquema del procedimiento de análisis de la muestra.

10. Interpretación de resultados para alimentos

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

POSITIVO: Además de la línea de control (AZUL), también aparece una línea ROJA (línea de resultado) en la zona de resultado. Consulte la Tabla 2 para interpretar el resultado en función del límite de detección elegido.

Importante: La intensidad de la línea de color rojo en la zona de resultado de la tira puede variar en función de la concentración de gluten presente en la muestra.

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



11. Análisis de superficies

1. Acondicione a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) la Solución de Dilución y el tubo con las tiras GlutenTox Sticks.
2. Deposite 100 µL de la Solución de Dilución en uno de los pocillos suministrados en el kit.
3. Restriegue la cara algodonosa del extremo blanco de la tira por cinco puntos de 1 cm² o por una línea de 5 x 1 cm (Ver Figura 4).
4. Introduzca el extremo blanco de la tira en el pocillo de ensayo, una vez restregada por la superficie a analizar.
5. **Espera 10 minutos** y lea el resultado en la tira.

1 Restriegue el extremo inferior de la tira por la cara algodonosa por cinco puntos de 1 cm² o por un rectángulo de 5 x 1 cm.

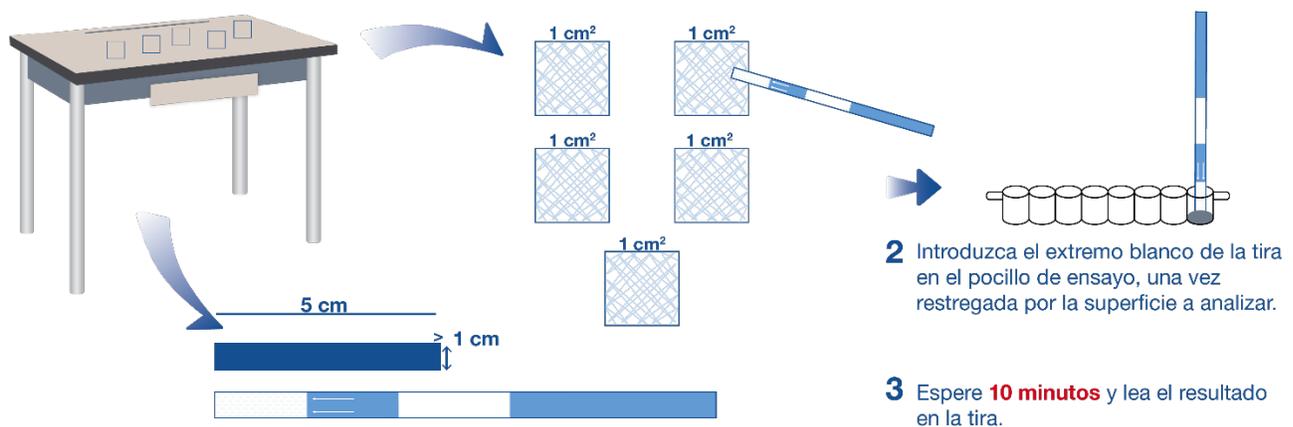
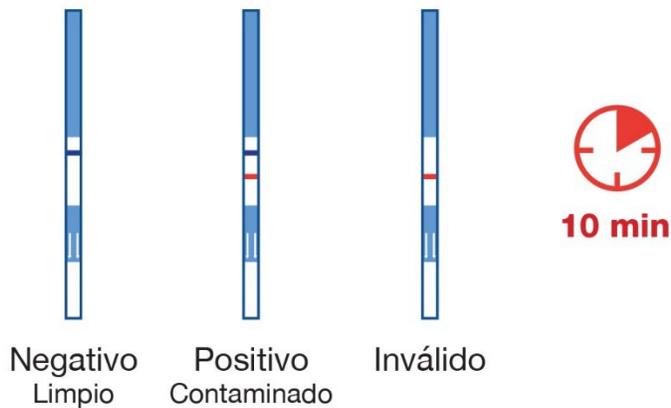


Figura 4. Esquema del procedimiento de análisis de superficies.



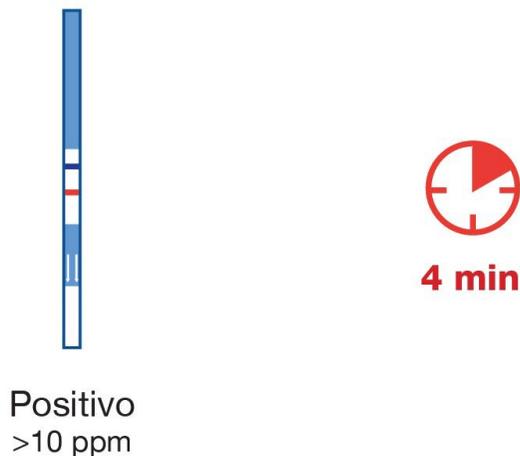
12. Interpretación de resultados para superficies

12.1 Lectura final de la tira a los 10 minutos



12.2 Lectura parcial de la tira a los 4 minutos

De manera opcional, se puede realizar una lectura parcial de la tira pasados 4 minutos para obtener una medida semicuantitativa. Si a los 4 minutos ya se ha desarrollado una línea roja, la superficie tiene una contaminación de gluten equivalente a >10 ppm.



13. Control de calidad

El control interno de funcionamiento viene incluido en el test. La línea azul que aparece en la zona de control es el control interno que confirma que el volumen de muestra es suficiente, que el flujo ha sido adecuado y que se han liberado correctamente las partículas de conjugado. Además, el manual incluye instrucciones de uso de Controles Positivos y Negativos (ver desde el punto 8.1.2. en adelante) para confirmar que la prueba se realiza correctamente. Los resultados que debe obtener son: un resultado positivo con el Control Positivo y un resultado negativo con el Control Negativo, a cualquiera de las diluciones propuestas en la Tabla 1, siempre que el procedimiento seguido haya sido el adecuado.



14. Características analíticas

Se han realizado ensayos con objeto de caracterizar los principales parámetros analíticos del ensayo: sensibilidad y especificidad.

14.1 Sensibilidad

El límite de detección de GlutenTox Sticks Plus es de 3 ppm de gluten. Este valor se ha obtenido analizando soluciones de gliadina (una de las proteínas del gluten) de concentración conocida diluidas en Solución de Dilución.

Para muestras de comida, bebida y otros productos de consumo, el límite de detección del ensayo dependerá de la dilución realizada con la muestra extraída y clarificada después de la extracción.

En la Tabla 2 se esquematiza la dilución que se ha de realizar según el nivel de gluten que se quiera detectar.

Tabla 2. Límite de detección según la dilución de ensayo.

		Límite Detección/ppm Gluten				
		Diluciones				
		1:25	1:75	1:150	1:250	1:750
Resultado del test	Positivo	>3 ppm	>10 ppm	>20 ppm	>30 ppm	>100 ppm
	Negativo	<3 ppm	<10 ppm	<20 ppm	<30 ppm	<100 ppm

14.2 Sensibilidad en el análisis de superficies

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

Analizando cinco puntos de 1 cm² o un rectángulo de 1 x 5 cm, el test es capaz de detectar un mínimo de 40 ng/cm² de gluten. Por tanto, se puede estimar que si la superficie de trabajo examinada tiene por ejemplo una dimensión de 1.000 cm² (40 cm x 25 cm) y el análisis ha salido negativo, trabajando en dicha superficie con una masa alimentaria de 1 kg se tiene la seguridad de que el producto final tendrá menos de 0,04 ppm (0,04 mg gluten/kg alimento). Esta cantidad es unas 500 veces menor que la cantidad permitida por la normativa europea establecida en 20 ppm (20 mg gluten/kg alimento). Esto significa que el método tiene unos grandes márgenes de seguridad y que su empleo es fiable y puede proporcionar tranquilidad a los clientes, asociaciones de celíacos e inspectores de seguridad alimentaria [4].

14.3 Especificidad

Este test es capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica, para los celíacos, de las prolaminas de trigo (gliadina), centeno (secalina), cebada (hordeína), y también, algunas variedades inmunogénicas de avena (avenina) que pueden suponer un riesgo para algunos celíacos [2]. Sin embargo, no se observa señal positiva cuando las muestras contienen ingredientes vegetales seguros para los celíacos como arroz, maíz, soja, trigo sarraceno, sésamo, mijo, teff, quinoa y amaranto.



14.4 Validación interna

Para garantizar la capacidad del test de analizar todo tipo de alimentos (de naturaleza muy diversa), así como otros tipos de muestras no alimentarias se han ensayado diferentes muestras comerciales. Tras el análisis con GlutenTox Sticks Plus, en todos los tipos de muestras ensayadas (ver Tablas 3 y 4) se obtuvieron resultados satisfactorios y concordantes con el contenido de gluten determinado con el método validado por el Codex Alimentarius, lo cual demuestra la aplicabilidad del test sobre un amplio rango de tipos de muestras y superficies (ver Tabla 5).

Tabla 3. Muestras alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox Sticks Plus.

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

Tabla 4. Muestras no alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox Sticks Plus.

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

Tabla 5. Superficies validadas para GlutenTox Sticks Plus.

Grupo	Muestras
Superficies	Acero inoxidable, goma, madera pintada

15. Propiedad intelectual

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

16. Referencias

1. Shan L., et al. (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297:2275 – 2279.
2. Comino I. et al (2011) Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*, 60:915 – 922.
3. Morón B., et al. (2008) 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*, 87:405 – 414.
4. Síglez M.A., et al. (2010) Método de detección de gluten en superficies. *Alimentaria*, 411:67 – 70.

Hygiena

Camarillo, CA 93012

USA

diagnostics.support@hygiena.com

Manufactured by

Hygiena Diagnóstica España S.L.

P. I. Parque Plata

Calle Cañada Real 31 – 35

41900, Camas (Sevilla), Spain

www.hygiena.com