

# GlutenTox® SticksPlus

Gluten detection kit for foods, drinks and working surfaces.

# GlutenTox® SticksPlus

## Contents

1. Intended purpose .....	2
2. Introduction .....	2
3. Test basis.....	2
4. Supplied materials.....	3
5. Necessary materials not supplied .....	3
6. Storage conditions and stability.....	4
7. Precautions .....	4
8. Sample preparation (food, beverages and other consumer products)...	4
8.1. Solid samples .....	4
8.2. Liquid samples .....	5
9. Test implementation for extracted samples .....	6
10. Interpretation of results for food samples .....	7
11. Surface analysis .....	7
12. Interpretation of results for surface analysis .....	8
13. Quality control .....	9
14. Analytical features .....	9
15. Intellectual property.....	12
16. References .....	12

## 1. Intended Purpose

GlutenTox Sticks Plus is a rapid immunochromatographic test for the detection of gluten\*, which is harmful for celiac disease sufferers, in food and on surfaces. This kit is recommended for consumers, commercial kitchens and industry.

\* not for hydrolyzed sources of gluten.

## 2. Introduction

Celiac disease is a disorder that damages the small intestine causing the atrophy of the intestinal villi, which interferes with the absorption of nutrients such as proteins, lipids, carbohydrates, mineral salts and vitamins. This disease is caused by an inappropriate response of the immune system to gluten (a mix of proteins found in cereals) from wheat, barley, rye and, to a lesser extent, from oat [ref. 1 and 2], leading to diarrhea, vitamin and mineral deficiencies, anemia and thin bones (osteoporosis). Celiac disease affects people of all ages.

Currently, the only treatment for celiac disease sufferers is a strict, lifelong gluten-free diet that presents great difficulties because gluten, in addition to being present in many foods, may also be found in food additives and preservatives.

According to the Codex Alimentarius Commission and the EC Regulation 41/2009 on the composition and labeling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten, food can be considered “gluten-free” if its gluten content does not exceed 20 parts per million (ppm\*).

\* Milligrams of gluten per kilo of food.

## 3. Test basis

GlutenTox Sticks Plus is an immunochromatographic (lateral flow) test for the semi-quantitative determination of gluten in foods with different composition and levels of processing, from raw materials to heat-processed food, beverages and other consumer products. It is based on the anti-gliadin G12 antibody, which specifically recognizes the 33-mer peptide, the most immunogenic fraction of gluten [ref. 3].

GlutenTox Sticks Plus can also be used for surface testing, to confirm that these surfaces are suited to produce gluten-free products. This rapid test is useful in routine monitoring of gluten presence, to guarantee that products comply with a program of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), and to ensure proper labeling. It also allows quick decisions and corrective actions in case there is any risk of contamination along the production chain.

In all methods used for gluten analysis in a given sample, the gluten first has to be extracted from the sample's matrix. Extraction is one of the most critical points of the testing process. The extraction solution provided in this kit, Universal Gluten Extraction Solution (UGES), is suited for all types of food thanks to the combination of denaturing agents, reducing agents and solubilizers.

For the analysis of food containing polyphenols, including tannins, such as chocolate, tea, coffee, wine, purple corn and corn fiber, soy, berries, etc., it is necessary to use a special additive (**not included in this kit, see section 5**) that prevents the interference of the above mentioned compounds in the extraction process (see Figure 1). The same applies in the case of cosmetic products with antioxidant compounds such as vitamins A, C and E, carotenes, carotenoids, etc.

After the extraction, during the detection step, the gluten in the sample reacts first with the anti-gliadin G12 antibody [ref. 3] conjugated to red colored particles, previously placed in the stick. The resulting complexes spread by capillarity through the stick and react with a second anti-gliadin antibody, also previously immobilized on 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 sample moves through the stick up to the control region where, if the test was properly performed, a BLUE line will appear, due to the accumulation of blue colored particles also included in the stick.

The presence of this BLUE line indicates that: 1) the sample volume was enough, 2) the sample flow was appropriate; and 3) the conjugate particles included in the test were properly released. If the BLUE line does not appear, the test should be considered invalid.

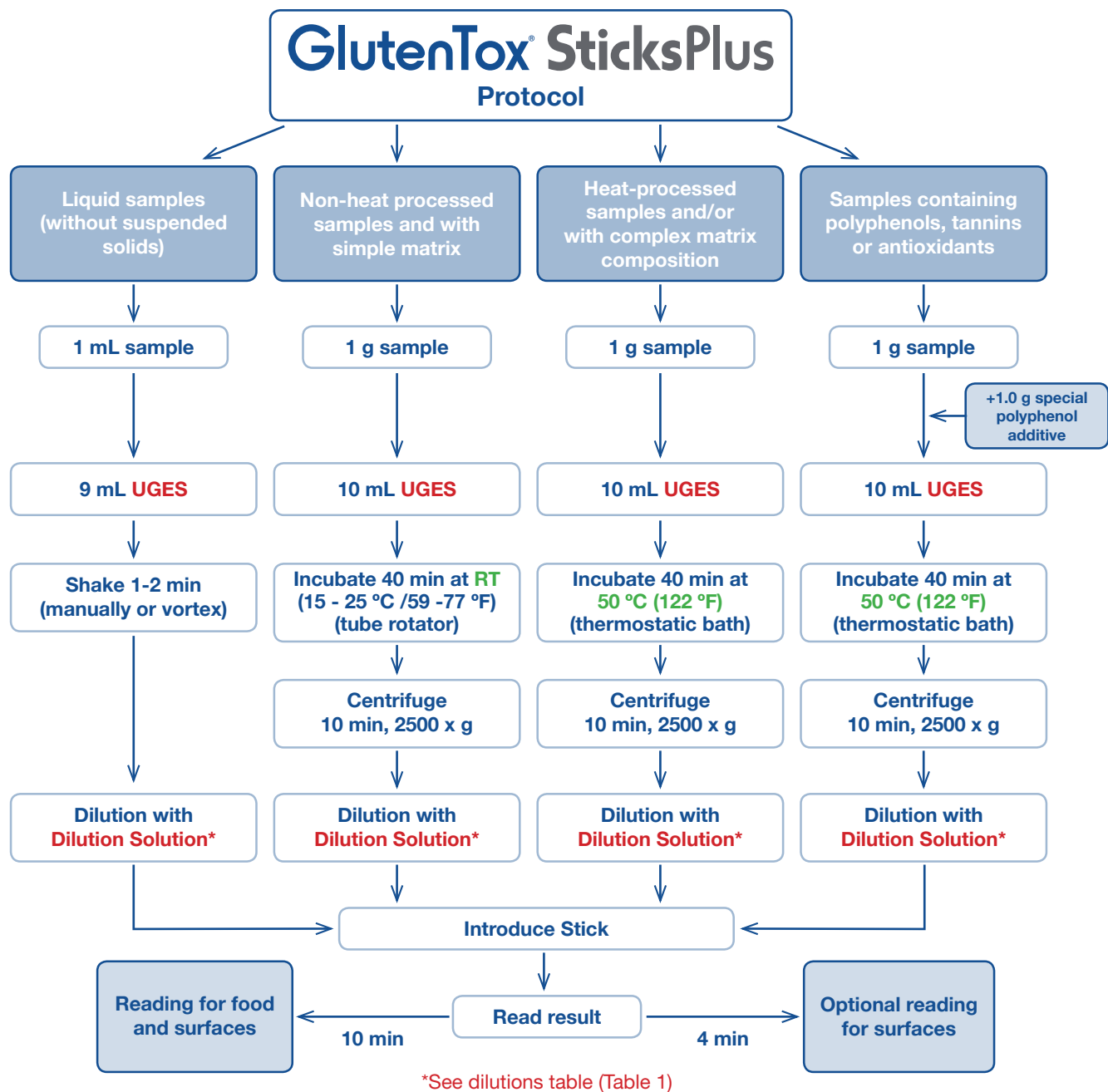


Figure 1. Scheme of use for GlutenTox Sticks Plus

## 4. Supplied materials

- GlutenTox Sticks (25 sticks in a tube)
- Universal Gluten Extraction Solution (UGES) (250 mL)
- Dilution Solution (30 mL)
- Microtiter plate strips (4 strips x 8 wells)
- Positive Control (chickpea flour contaminated with gluten, 10 g)
- Negative Control (corn flour, 10 g)
- Instructions for use

## 5. Necessary materials not supplied

- Analytical scale (accurate to 0.1 g)
- Thermostatic bath (not necessary for non-heat-processed samples with simple matrix composition)
- Capped centrifuge test tubes (>10 mL)
- Test vials (1.5 – 2 mL)
- Centrifuge (optional)
- Pipettes and disposable tips
- Disposable gloves
- Vortex mixer (optional)
- Tube rotator
- Watch/chronometer

For testing **food containing polyphenols (including tannins) and cosmetics containing antioxidants**, please acquire the **Polyphenol Pack (KT-5320/KIT3008)\***, available from Hygiena™. This pack contains:

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

### **IMPORTANT NOTE!**

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

### **IMPORTANT NOTE!**

- **The most common antioxidants in cosmetic products are vitamins A, C and E, carotenes, carotenoids, etc.**

\* For more information contact your supplier.

## **6. Storage conditions and stability**

For optimal test performance, GlutenTox Sticks Plus must be stored in its original packaging, at 15 °C - 25 °C (59 °F - 77 °F) and used before the expiration date printed on the label.

**WARNING:** The tube with the sticks should not be opened until the time of use. Once the seal is broken, keep the tube with the sticks tightly closed at room temperature (15 - 25 °C / 59 - 77 °F). To avoid water condensation, do not refrigerate the tube after opening. Never freeze it.

## **7. Precautions**

- Only for testing food, beverages, other consumer products and surfaces.
- Do not ingest any of the solutions (liquids) and/or additive of the kit.
- Do not use after the expiration date.
- The use of non-powdered disposable gloves is recommended.
- Manipulate the sticks with gloves or washed hands and do not touch the white end.
- If a sample is heterogeneous (e.g. a salad), make sure to take a representative part of each ingredient, and mix them to make a homogenous sample. If the gluten in the sample is unevenly distributed and you do not do this, a false negative could be obtained.

## **8. Sample preparation (food, beverages and other consumer products)**

### **8.1. Solid samples**

1. Homogenize, mill and/or triturate the sample.
2. Weigh 1 g of sample and add it to a test tube.

### **IMPORTANT NOTE!**

- **If the sample, solid or liquid, contains polyphenols, tannins (e.g. chocolate) or antioxidants, weigh and add 1 g of special polyphenol additive (KT-5320/KIT3008) to the sample tube and mix it vigorously to achieve complete homogenization of the mixture.**
3. Add 10 mL of Universal Gluten Extraction Solution (UGES). Close the tube and mix to homogenize (for example, using a vortex mixer). For provided positive and negative controls, perform the same procedure.
  4. Depending on the complexity of the sample matrix and whether the food sample has been processed by heat or not, follow one of the options below (see Figure 2):
    - a) Non-heat processed samples with simple matrix composition:

Incubate the sample at room temperature (15 – 25 °C / 59 – 77 °F) for 40 minutes with a tube rotator.

b) Heat-processed samples and/or with complex matrix composition or samples containing polyphenols, tannins or antioxidants:

Incubate the sample at 50 °C (122 °F) in a water bath for 40 minutes, shaking the tube periodically by tipping it over or using a vortex mixer.

### IMPORTANT NOTE!

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

5. Allow separation of solids by settling or centrifugation (10 min at 2500 x g).

6. Transfer the clarified supernatant to a clean tube.

### IMPORTANT NOTE!

- Once extracted, the samples must be analyzed as quickly as possible.

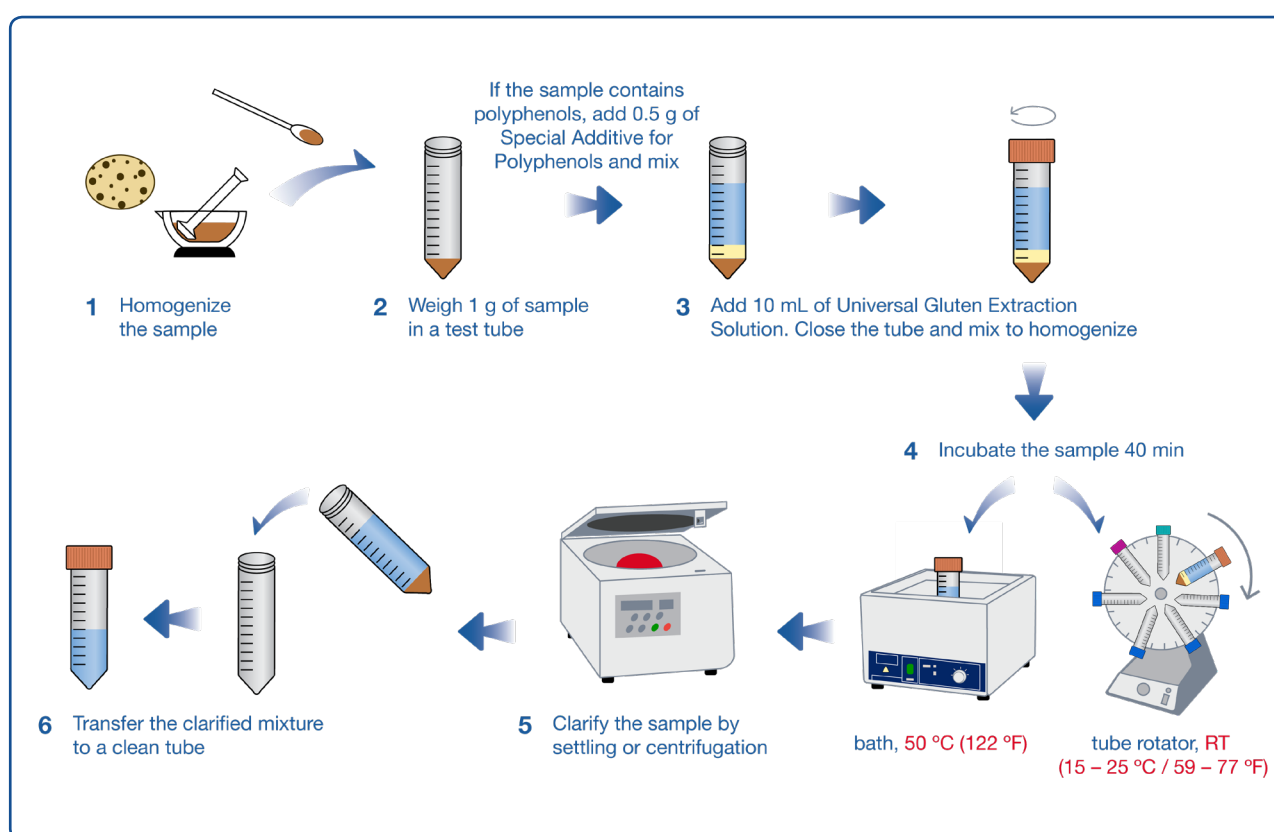


Figure 2. Scheme of the extraction procedure of the solid samples

## 8.2. Liquid samples

### IMPORTANT NOTE!

- Liquid samples with polyphenols, tannins or antioxidants must be extracted according to the point 8.1. Solid samples.

Liquid samples such as milk, juices, soft drinks, organic drinks (soy, rice, oat, spelt drinks), beers and broths do not require intensive extraction, manually shaking for 1 or 2 minutes is sufficient and the extracts do not require a centrifugation or settling step.

1. Add 1 mL of sample to a test tube.

2. Add 9 mL of Universal Gluten Extraction Solution (UGES). Close the tube and mix to homogenize (for example, using a vortex mixer).

3. Shake the sample for 1-2 minutes, manually or using a vortex mixer.

### IMPORTANT NOTE!

- **Once extracted, the samples must be analyzed as soon as possible.**

## 9. Test implementation for extracted samples

1. Bring the extracted samples, controls, Dilution Solution and the tube with the GlutenTox Sticks to room temperature (15 - 25 °C / 59 - 77 °F).
2. Dilute the sample with the Dilution Solution in test tubes or vials. A final volume of 900-1000 µL is sufficient to perform the test.

Table 1. Dilutions table

Dilution	Rounded gluten detection limit (ppm)	Real gluten detection limit (ppm)	Volume of extracted sample (µl)	Volume of Dilution Solution (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

If the expected amount of gluten in the sample is unknown, we recommend testing with the lowest dilution (i.e., dilution 1:25) allowing maximum sensitivity. In case of a positive result (appearance of RED line), the test can be repeated with a greater dilution for a semi-quantitative estimation of the gluten concentration in the sample (see section 14 "Analytical Features").

### IMPORTANT NOTE!

- **In samples with polyphenols, tannins or antioxidants, in which the special polyphenol additive is added in the extraction step, the minimum dilution admitted is 1:75. Never perform at lower dilutions (i.e., dilution 1:25), since the presence of the special polyphenol additive affects the proper performance of the stick if the dilution is less than 1:75.**

### IMPORTANT NOTE!

- **In samples with high levels of fat, avoid taking the upper layer that contains the fat.**

### IMPORTANT NOTE!

- **The diluted samples must be analyzed as quickly as possible and the remaining material should be discarded.**

3. Place 100 µL of the diluted sample in a well of the microtiter strip supplied in the kit.
4. Open the tube with GlutenTox Sticks, take out the number of sticks necessary and close the tube immediately.
5. Introduce the white end of the stick vertically into the well with the diluted sample.
6. **Wait 10 minutes** and read the result on the stick.

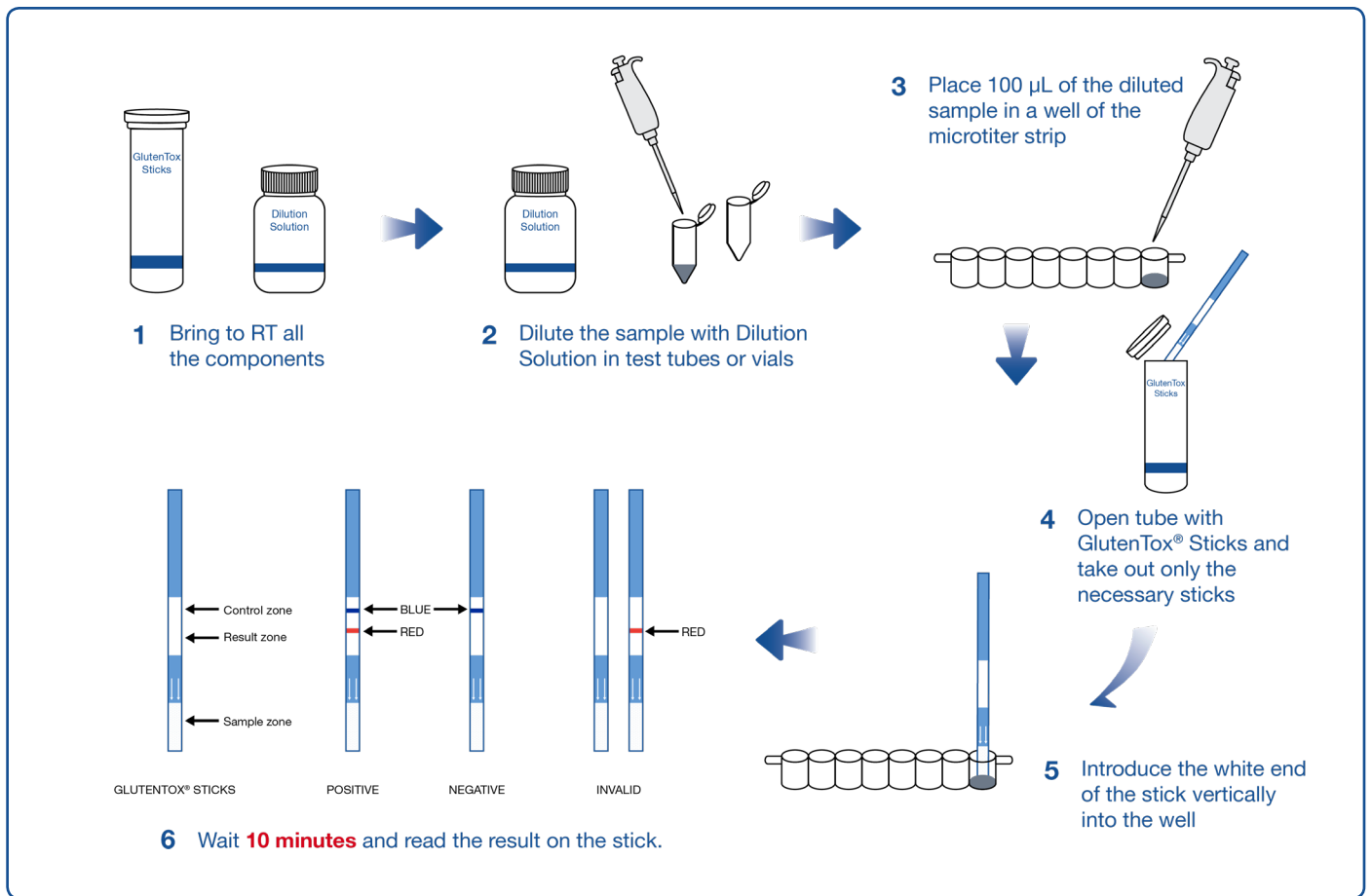


Figure 3. Procedure to follow for the sample analysis

## 10. Interpretation of results for food samples

**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. See Table 2 to read the result depending on the selected Detection Limit.

### IMPORTANT NOTE!

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

**INVALID:** The control line (BLUE) does not appear, whether or not the result line (RED) appears. The most common causes of an invalid result are using an insufficient (< 100 µL) volume of sample in the microtiter well, performing an incorrect procedure, or deterioration of the kit reagents. In the case of an invalid result, it is necessary to revise the procedure and repeat the experiment with a new test. If the problem persists, please contact your supplier.

## 11. Surface Analysis

1. Bring the Dilution Solution and the tube with the GlutenTox Sticks to room temperature (15 - 25 °C / 59 - 77 °F).
2. Place 100 µL of the Dilution Solution in a well of the microtiter strip supplied in the kit.
3. Rub the cotton wool side of the white end of the stick against five areas of 1cm<sup>2</sup> or along a line of 1 x 5 cm (see Figure 4).
4. After the stick has been rubbed on the surface to be analyzed, introduce its white end into the well.
5. **Wait 10 minutes** and read the result on the stick.



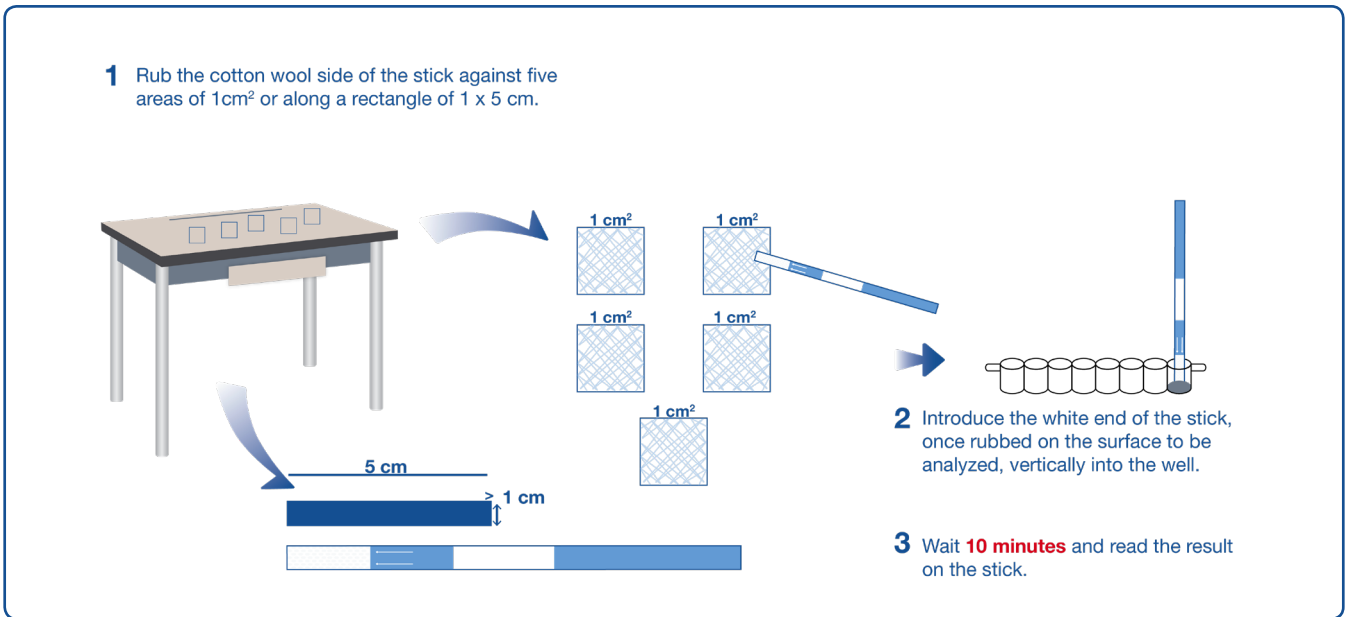
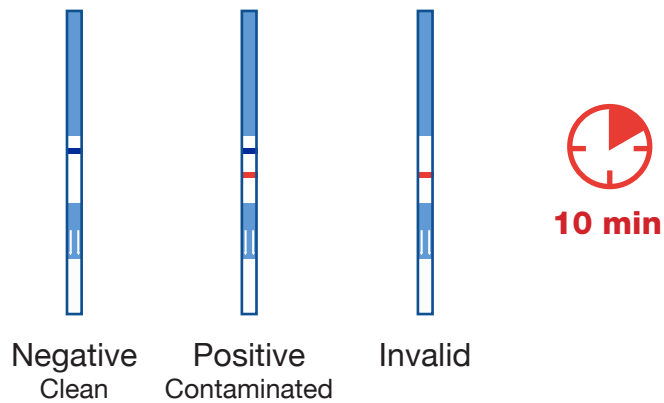


Figure 4. Procedure for surface analysis

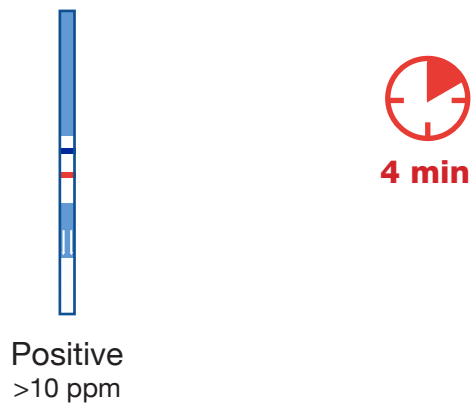
## 12. Interpretation of results for surface analysis

Final reading of the stick at 10 minutes



Initial reading of the stick at 4 minutes

Optionally, an initial reading of the stick after 4 minutes can be done to obtain a semiquantitative measurement. If a red line appears already after 4 minutes, the surface area tested had a gluten content equivalent to > 10 ppm.



## 13. Quality control

Internal procedural quality control is included in the test. The blue line in the control zone is a built-in feature that indicates both a sufficient volume and a correct flow of the sample, with proper release of the conjugate particles. In addition, the kit includes Positive and Negative Controls that can be used, according to the instructions in point 8.1.2 and onwards, to confirm a correct test performance; these control materials must provide clear positive and negative results, respectively, and at any tested dilutions if the test procedure was conducted properly.

## 14. Analytical features

Different assays have been carried out to characterize the main analytical parameters of the test, i.e., sensitivity and specificity.

### Sensitivity

The detection limit of GlutenTox Sticks Plus is 3 ppm of gluten. This value was obtained using different solutions of known concentrations of gliadin (one of the proteins in gluten) in the Dilution Solution.

For food, beverages and other consumer products, the detection limit of the test, in ppm of gluten, will depend on the dilution factor applied to the sample, once extracted.

Table 2 outlines the dilution to be carried out according to the level of gluten to detect.

Table 2. Detection limit in ppm of gluten in the sample before extraction.

		Detection Limit / ppm Gluten				
		Dilutions				
		1:25	1:75	1:150	1:250	1:750
Test Result	Positive	>3 ppm	>10 ppm	>20 ppm	>30 ppm	>100 ppm
	Negative	<3 ppm	<10 ppm	<20 ppm	<30 ppm	<100 ppm

### Sensitivity in surface analysis

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

By analyzing five areas of 1 cm<sup>2</sup> or a rectangle of 1 x 5 cm a minimum of 40 ng/cm<sup>2</sup> is detected. If the test result is negative, it can be "estimated" that for an analyzed working surface of 1000 cm<sup>2</sup> (40 cm x 25 cm), working with a food mass of 1 Kg, the final product will have less than 0.04 ppm (0.04 mg gluten/Kg of food). This quantity is about 500 times less than the quantity recommended by the European norms established at 20 ppm (20 mg gluten/Kg of food).

This means that the method has a large safety margin and that its use provides a guarantee to clients, celiac associations and food safety inspectors [ref. 4].

### Specificity

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

## Internal Validation

To ensure the test's performance with all types of food and other materials such as cosmetics and personal care products, as well as with common working surface materials, a broad range of commercial products has been tested. After analyzing the samples with GlutenTox Sticks in all types of matrices tested (see Tables 3 and 4) the results were satisfactory and consistent with the gluten contents determined with the approved method of Codex Alimentarius. Results also showed the applicability of the test to common working surface materials (Table 5).

**Table 3.** Food samples tested for validation of GlutenTox Sticks Plus

<b>Group</b>	<b>Tested samples</b>
<b>Flour and semolina</b>	Corn flour, precooked corn flour, corn semolina, rice flour, wheat flour, buckwheat flour
<b>Milk products</b>	Cow milk, milk with soluble fiber, milk with cereals, flavoured or natural yogurt, cheese spread, shredded cheese blend
<b>Baked and cereal products</b>	Toast, bread stick, biscuits (Rich tea), chocolate cookies, Madeleine, cake, cornflakes, pastas, corn pancakes, rice cakes, spelt cake, snacks
<b>Meat products</b>	Minced turkey, minced chicken, turkey sausage, chicken nuggets, pork sausages, chorizo, pork liver pâté
<b>Fishery products</b>	Cod and Hake
<b>Vegetables</b>	Lettuce mix, fried vegetables
<b>Broth, soups, creams and dry mixes</b>	Vegetable broth, chicken rice soup, dehydrated vegetable soup, stock cubes, vegetable soup, peanut butter
<b>Sauces, dressing, spices and condiments</b>	Yogurt salad dressing, ketchup, soy sauce, salad dressing, garlic powder, paprika powder, cooking cream
<b>Sugars</b>	Glucose syrup, powdered sugar
<b>Prepared meals and dishes</b>	Meatballs in sauce with peas, Meat Ravioli in Egg Dough, bean stew
<b>Fatty foods</b>	Olive oil, sunflower oil, butter, margarine, cream
<b>Acidic foods</b>	Tomate sauce, wine vinegar, apple cider vinegar, lemon juice
<b>Beverages</b>	Water, milk, fruit juices, beer, soy drinks, rice drinks, oat drinks, soft drinks

Table 4. Non-food samples tested for validation of GlutenTox Sticks Plus

Group	Tested samples
<b>Personal care products</b>	Bath gel, shampoo, deodorant, toothpaste, mouthwash
<b>Cosmetics</b>	Creams (face, body and hands), cleanser, lip balm
<b>Others</b>	Pet food (dry food, wet food), cleaning products, drugs (tablets, capsules and syrups)

Table 5. Surfaces validated for GlutenTox Sticks Plus

Group	Tested samples
<b>Surfaces</b>	Stainless steel, rubber, painted wood

## 15. Intellectual Property

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

## 16. References

1. SHAN L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-2279.
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", 2008;87:405-414.
4. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

# GlutenTox® SticksPlus

## Notes

# GlutenTox® SticksPlus

## 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 51321081, 51321077/8/9

**Hygiena Diagnóstica España S.L.**

P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,  
41900, Camas (Sevilla), Spain  
+34 954 08 12 76

[www.hygiena.com](http://www.hygiena.com)

[enquiries@hygiena.com](mailto:enquiries@hygiena.com)



# GlutenTox® SticksPlus

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

# GlutenTox® SticksPlus

## Contenidos

1. Uso previsto .....	2
2. Introducción .....	2
3. Fundamento del test .....	2
4. Materiales suministrados .....	3
5. Materiales necesarios no suministrados .....	3
6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad.....	4
7. Precauciones.....	4
8. Preparación de muestras de alimentos, bebidas y otros productos de consumo ..	4
8.1. Muestras sólidas .....	4
8.2. Muestras líquidas .....	5
9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción.....	6
10. Interpretación de resultados para alimentos.....	7
11. Análisis de superficies.....	7
12. Interpretación de resultados para superficies.....	8
13. Control de calidad .....	9
14. Características analíticas .....	9
15. Propiedad intelectual.....	12
16. Referencias.....	12

## 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 [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 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 [ref. 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 [ref. 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.

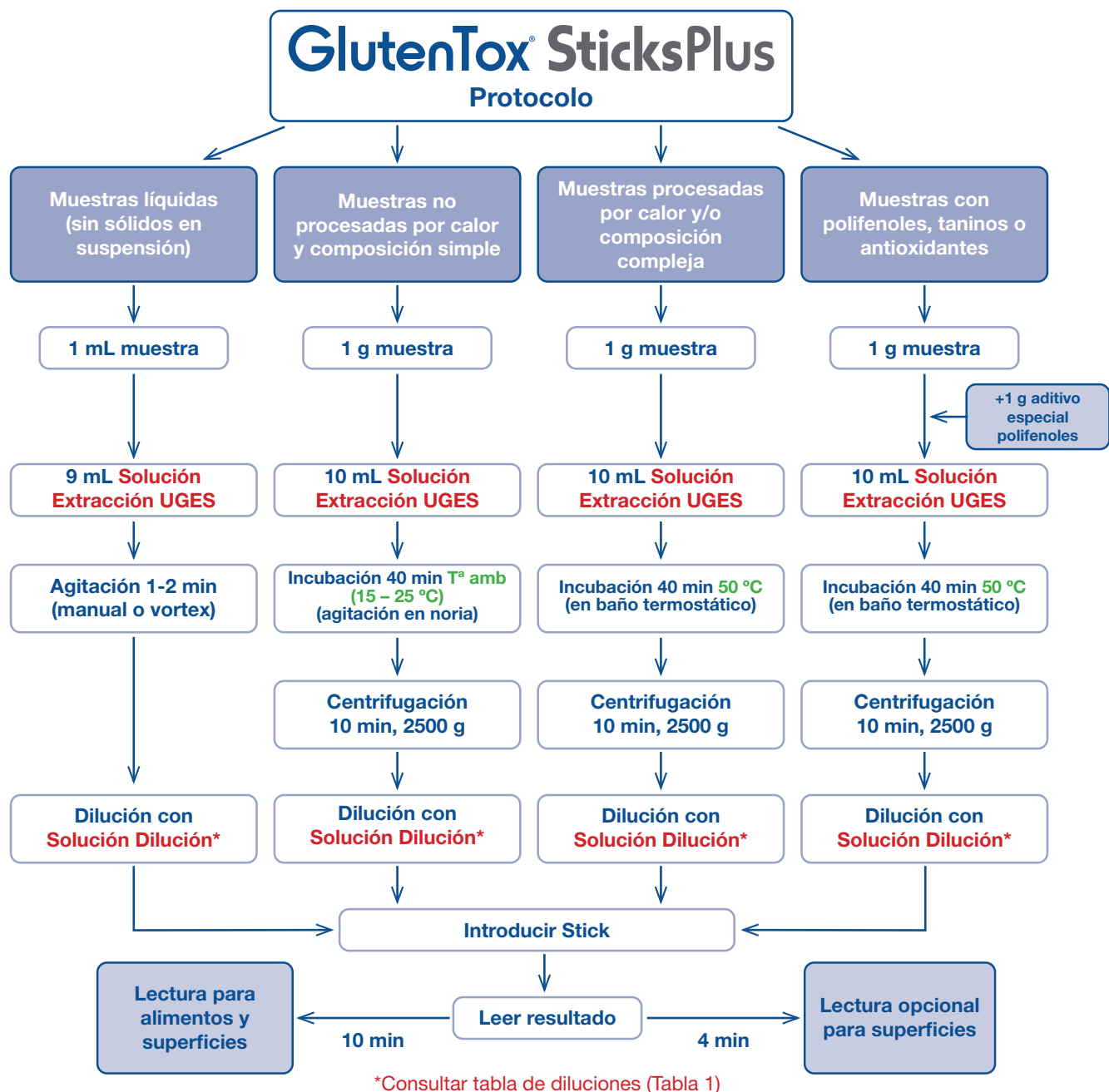


Figura 1. Esquema del protocolo de uso de las tiras GlutenTox Sticks Plus

## 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)
- Control Positivo (harina integral de avena contaminada con gluten, 10 g)
- Control Negativo (harina de maíz, 10 g)
- Instrucciones de uso

## 5. Materiales necesarios no suministrados

- 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** (KT-5320/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)

### ¡NOTA 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.**

### ¡NOTA 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 °C 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 (15 - 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.

### ¡NOTA 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 (KT-5320/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 (15 – 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.

### ¡NOTA 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.

### ¡NOTA IMPORTANTE!

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

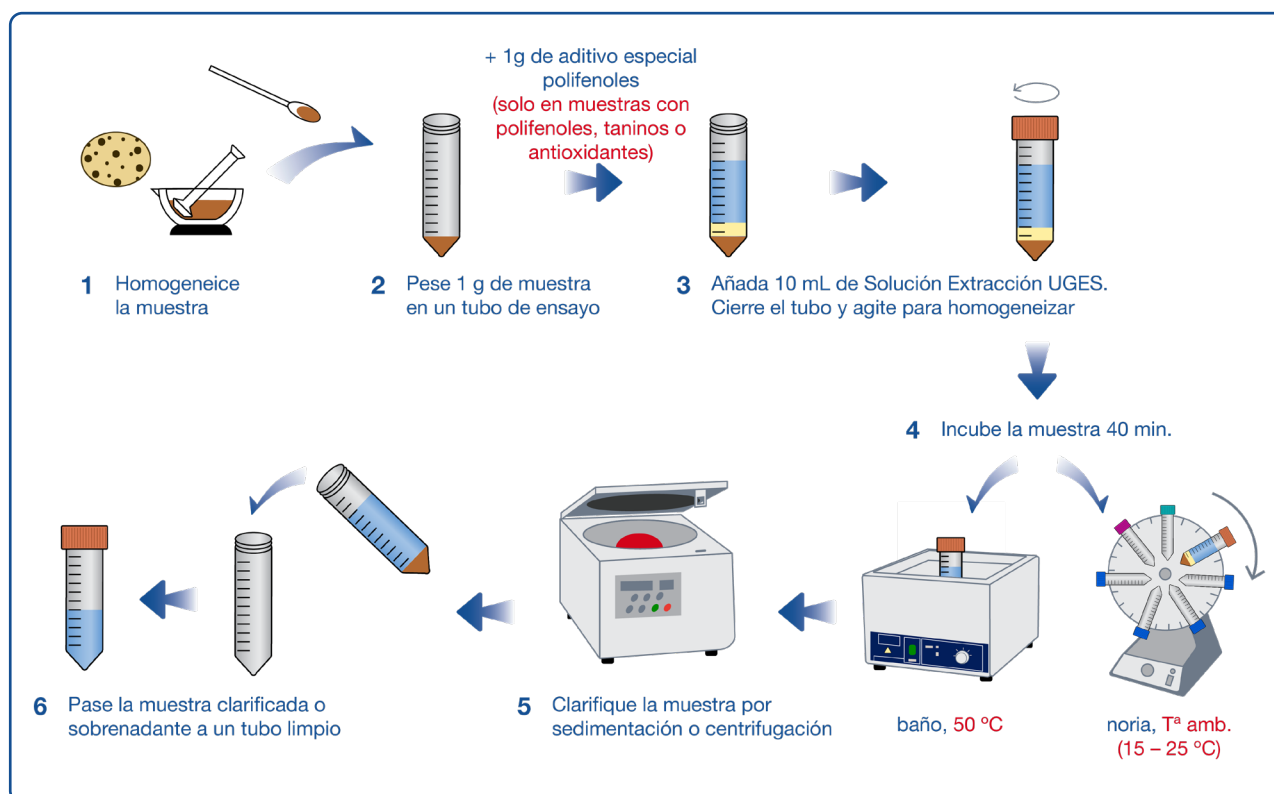


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

## 8.2. Muestras líquidas

### ¡NOTA 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.

## ¡NOTA 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 (15 - 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").

## ¡NOTA 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.

## ¡NOTA IMPORTANTE!

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

## ¡NOTA 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.

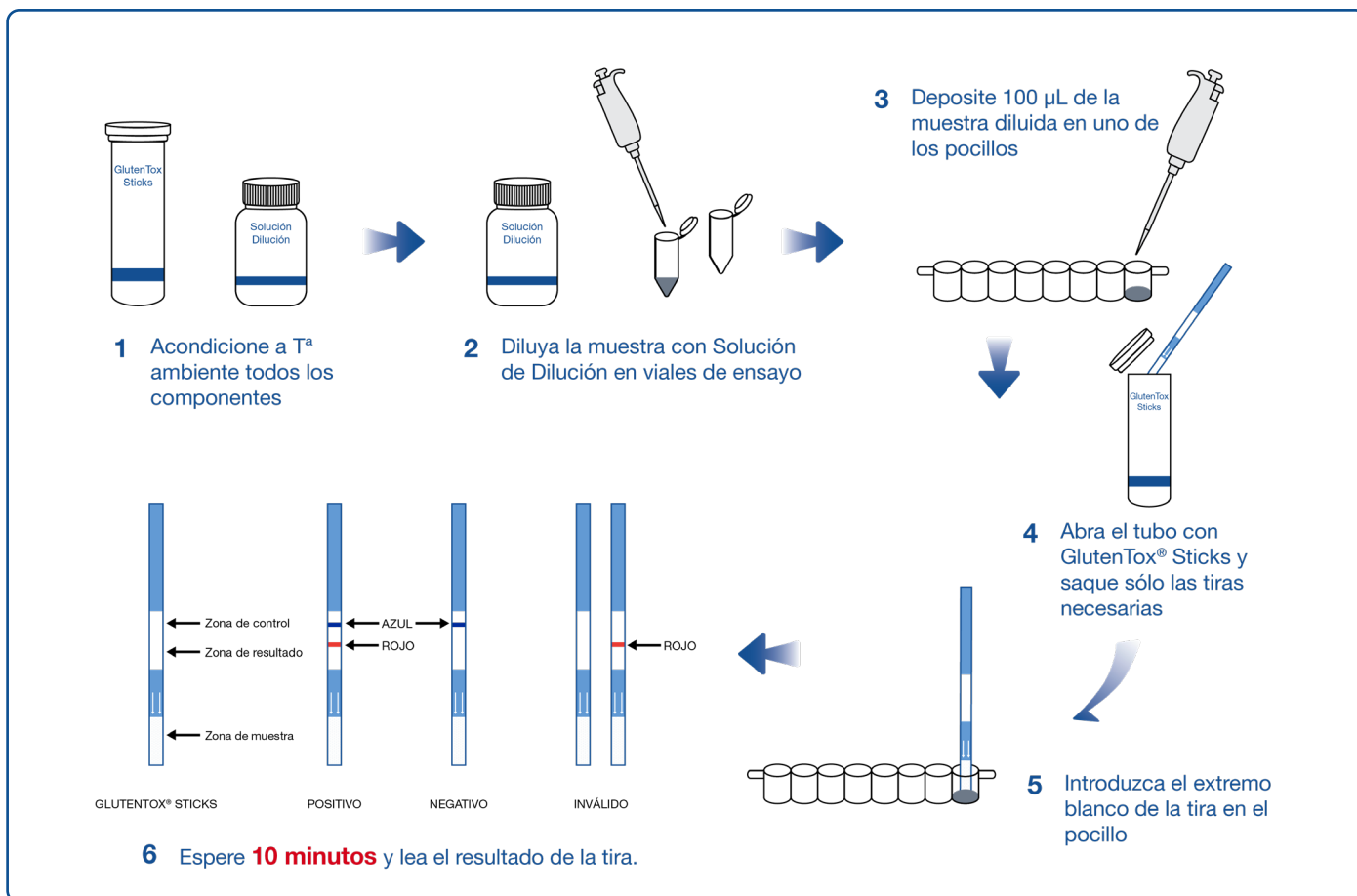


Figura 3. Esquema del procedimiento de análisis de la muestra

## 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.

### ¡NOTA 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 (15 - 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 cm<sup>2</sup> 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. Espere **10 minutos** y lea el resultado en la tira.



- 1 Restriegue el extremo inferior de la tira por la cara algonosa por cinco puntos de 1 cm<sup>2</sup> o por un rectángulo de 5 x 1 cm.

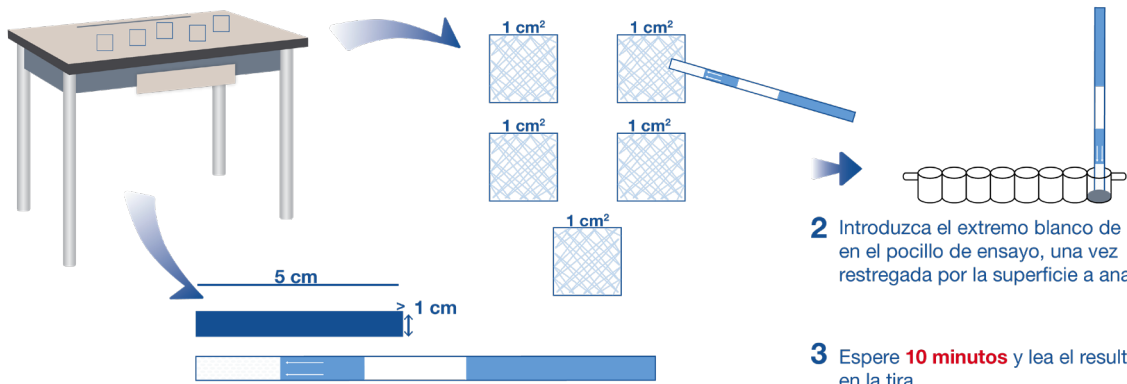
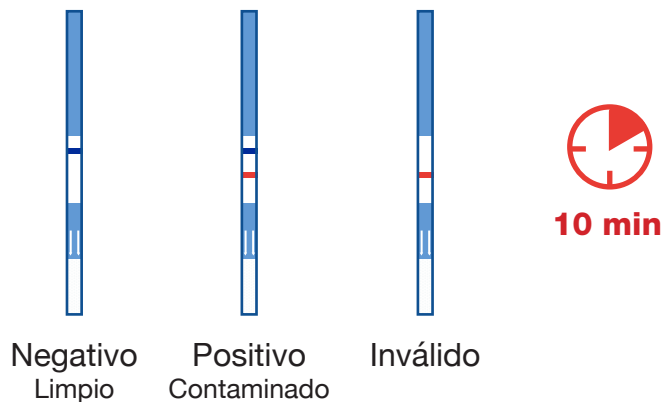


Figura 4. Esquema del procedimiento de análisis de superficies

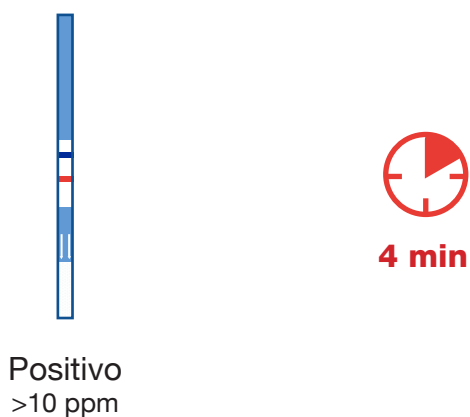
## 12. Interpretación de resultados para superficies

### Lectura final de la tira a los 10 minutos



### 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 kit incluye un Control Positivo y un Control Negativo que se pueden procesar siguiendo las instrucciones desde el punto 8.1.2. en adelante para asegurarse de que está usando el kit de manera apropiada. 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.

### 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

### 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 cm<sup>2</sup> o un rectángulo de 1 x 5 cm, el test es capaz de detectar un mínimo de 40 ng/cm<sup>2</sup> de gluten. Por tanto, se puede estimar que si la superficie de trabajo examinada tiene por ejemplo una dimensión de 1.000 cm<sup>2</sup> (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 [ref. 4].

### 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 [ref. 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.

## 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

<b>Group</b>	<b>Tested samples</b>
<b>Harinas y sémolas</b>	Harina de maíz, harina de maíz precocida, sémola gruesa de maíz, harina de arroz, harina de trigo, harina de espelta
<b>Leche y productos lácteos</b>	Leche de vaca, leche con fibra soluble, leche con cereales, yogur natural y sabores, queso de untar, mezcla de quesos rallados
<b>Productos de panadería y productos elaborados a partir de cereales</b>	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
<b>Carnes y productos cárnicos</b>	Carne de pavo picada, carne de pollo picada, embutido de pavo, nuggets de pollo, salchichas de cerdo, chorizo rojo, paté de hígado de cerdo
<b>Pescados y productos de la pesca</b>	Merluza, bacalao
<b>Verduras</b>	Mix de lechugas variadas, revuelto de verduras
<b>Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas</b>	Caldo de verduras, sopa de arroz con pollo, sopa de verduras deshidratadas, pastillas de caldo, crema de verduras, crema de cacahuete
<b>Salsas, aderezos, especias y condimentos</b>	Salsa caesar ensalada, salsa de tomate, salsa de soja, aderezo ensalada, ajo en polvo, pimentón en polvo, nata líquida para cocinar
<b>Azúcares</b>	Glucosa líquida, azúcar en polvo
<b>Comidas y platos preparados</b>	Albóndigas en salsa con guisantes, raviolis al huevo con carne, fabada
<b>Alimentos grasos</b>	Aceite de oliva, aceite de girasol, mantequilla, margarina, nata líquida
<b>Alimentos ácidos</b>	Salsa de tomate, vinagre de vino, vinagre de manzana, zumo de limón
<b>Bebidas</b>	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
<b>Productos de higiene personal</b>	Gel de baño, champú, desodorante, pasta de dientes, enjuague bucal
<b>Productos cosméticos</b>	Cremas (cara, cuerpo y manos), desmaquillante, cacao o vaselina labial
<b>Otros</b>	Comida animal (pienso seco, comida húmeda), productos de limpieza, medicamentos (comprimidos, cápsulas y jarabes)

Tabla 5. Superficies validadas para GlutenTox Sticks Plus

Grupo	Muestras
<b>Superficies</b>	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.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-2279.
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", 2008;87:405-414.
4. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

# GlutenTox® SticksPlus

## Notes

# GlutenTox® SticksPlus

## 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 51321081, 51321077/8/9

**Hygiena Diagnóstica España S.L.**

P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,  
41900, Camas (Sevilla), Spain  
+34 954 08 12 76

[www.hygiena.com](http://www.hygiena.com)

[enquiries@hygiena.com](mailto:enquiries@hygiena.com)