

# GlutenTox<sup>®</sup> SticksPlus para Cube





## GlutenTox® Sticks Plus Para Cube

Test rápido para la cuantificación del contenido de gluten en alimentos y bebidas con Hygiena® Cube

### Contenidos

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



## 1. Uso previsto

GlutenTox® Sticks Plus para Cube es un test inmunocromatográfico que permite la cuantificación de gluten inmunotóxico dañino para celíacos en todo tipo de alimentos, bebidas y otros productos de consumo.

## 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. 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 para Cube es un test inmunocromatográfico (flujo lateral) que permite determinar 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]. 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.

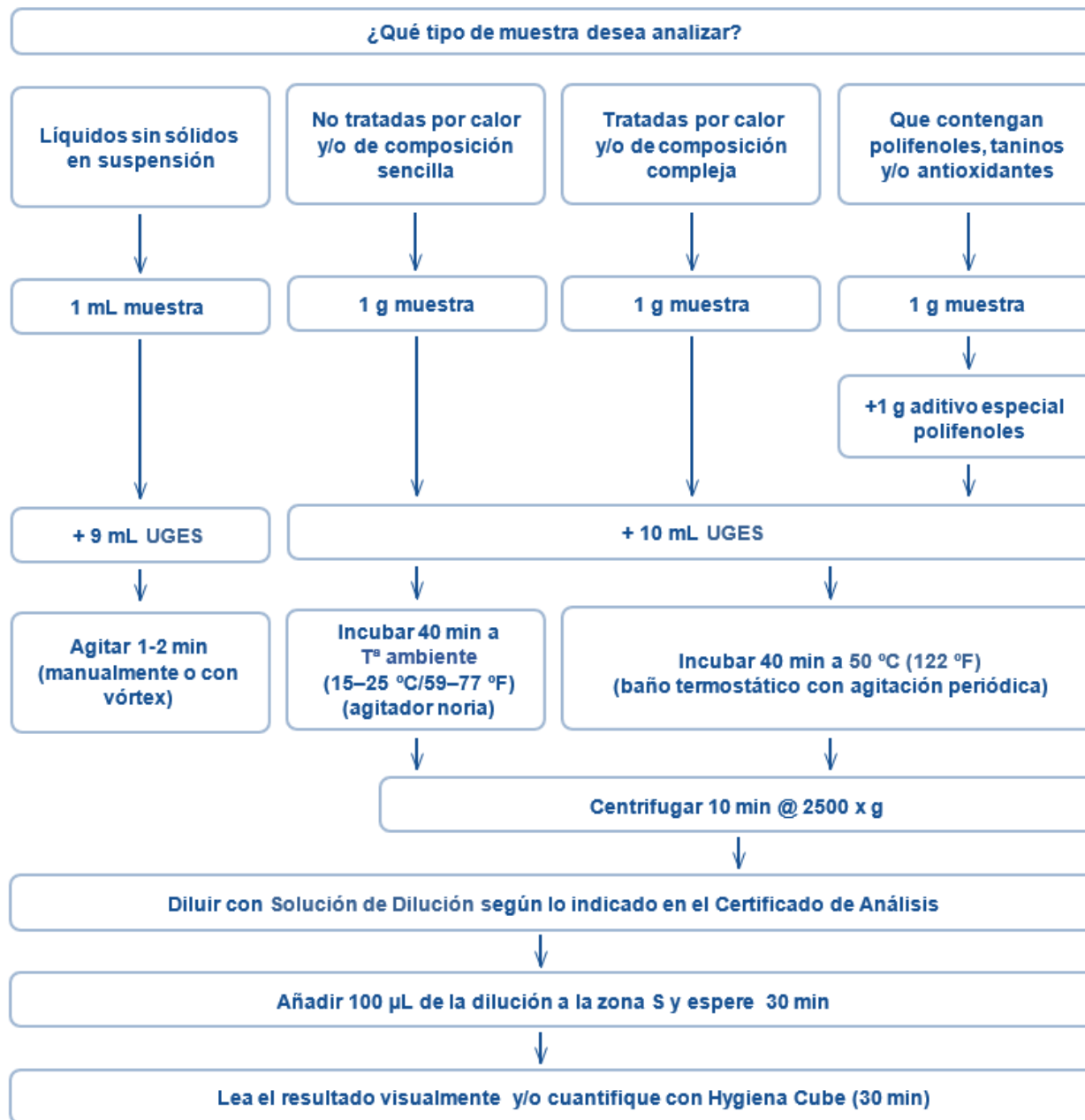
En todos los métodos de análisis de gluten el primer paso es la extracción del gluten de las muestras, siendo éste uno de los puntos más críticos. La Solución de Extracción UGES proporcionada en este kit es válida para todo tipo de alimentos gracias a la combinación de agentes disgregantes, reductores y solubilizantes.

Para el análisis de alimentos con polifenoles, incluyendo taninos, como son chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, legumbres como garbanzos y lentejas, 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, durante el paso de detección, la muestra se añade al casete que contiene la tira inmunocromatográfica. El gluten presente en la muestra reacciona primero con un conjugado coloreado (anticuerpo monoclonal anti-gliadina G12 [ref. 3] unido a microesferas rojas), previamente incluido en la tira. Los complejos resultantes avanzan por capilaridad a lo largo de la tira y reaccionan con un segundo anticuerpo anti-gliadina, también previamente inmovilizado en la Zona Test (T) del casete donde, si el resultado es positivo, aparecerá una línea de color ROJO (línea de resultado). La ausencia de la línea ROJA indica un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de gluten, la muestra avanza por la tira, acumulándose en la Zona Control (C) 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 AZUL se utiliza para: 1) para 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 GlutenTox Sticks Plus para Cube

*Esta técnica permite dos opciones de lectura de resultados: visual y/o evaluación cuantitativa mediante el uso del lector Hygiena Cube. Además, el lector Hygiena Cube cumple con la normativa europea de marcado CE y ha sido fabricado de acuerdo con las Normas ISO 9001 e ISO 13485.*



## 4. Materiales suministrados

- GlutenTox casetes (12 casetes)
- Solución de Extracción UGES (Universal Gluten Extraction Solution) (125 mL)
- Solución de Dilución (15 mL)
- Tarjeta RFID para usar con el lector Hygiena Cube
- Descargar instrucciones de la página web

## 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)
- Cronómetro
- Agitador de noria o similar
- Polyphenol Pack (KIT3008)\*. Este pack contiene:
  1. Aditivo especial polifenoles (25 g)
  2. Control Positivo especial polifenoles (cacao con gluten, 10 g)
  3. Control Negativo especial polifenoles (cacao sin gluten, 10 g)

\*Alimentos ricos en polifenoles o taninos son: chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, legumbres como garbanzos y lentejas, etc.

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

## 6. Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Se debe almacenar el producto entre 15 °C - 25 °C en su envase original, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

*Nota: El envoltorio con los casetes no debe abrirse hasta el momento de su uso. Nunca lo congele o refrigere.*

## 7. Precauciones

- Solo para analizar alimentos, bebidas y otros productos de riesgo para los celíacos.
- 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.
- Se recomienda analizar las muestras por duplicado
- Solo toque el casete con guantes o con las manos limpias. Evite, en todo caso, tocar la zona S del casete 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. Homogenice y/o triture la muestra.
2. Pese 1 g de muestra y añádalo a un tubo de ensayo.
  - a. Si la muestra contiene polifenoles, taninos (p. ej. Chocolate, vino) o antioxidantes, pese y añada al tubo con la muestra 1 g de aditivo especial polifenoles 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).
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 según las dos siguientes opciones (ver Figura 2):

Opción 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.

Opción B - Muestras procesadas por calor y/o de composición compleja, o muestras con polifenoles, taninos o antioxidantes y/o si el tipo de muestra es difícil de determinar:

Incubar la muestra a 50 °C en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.

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

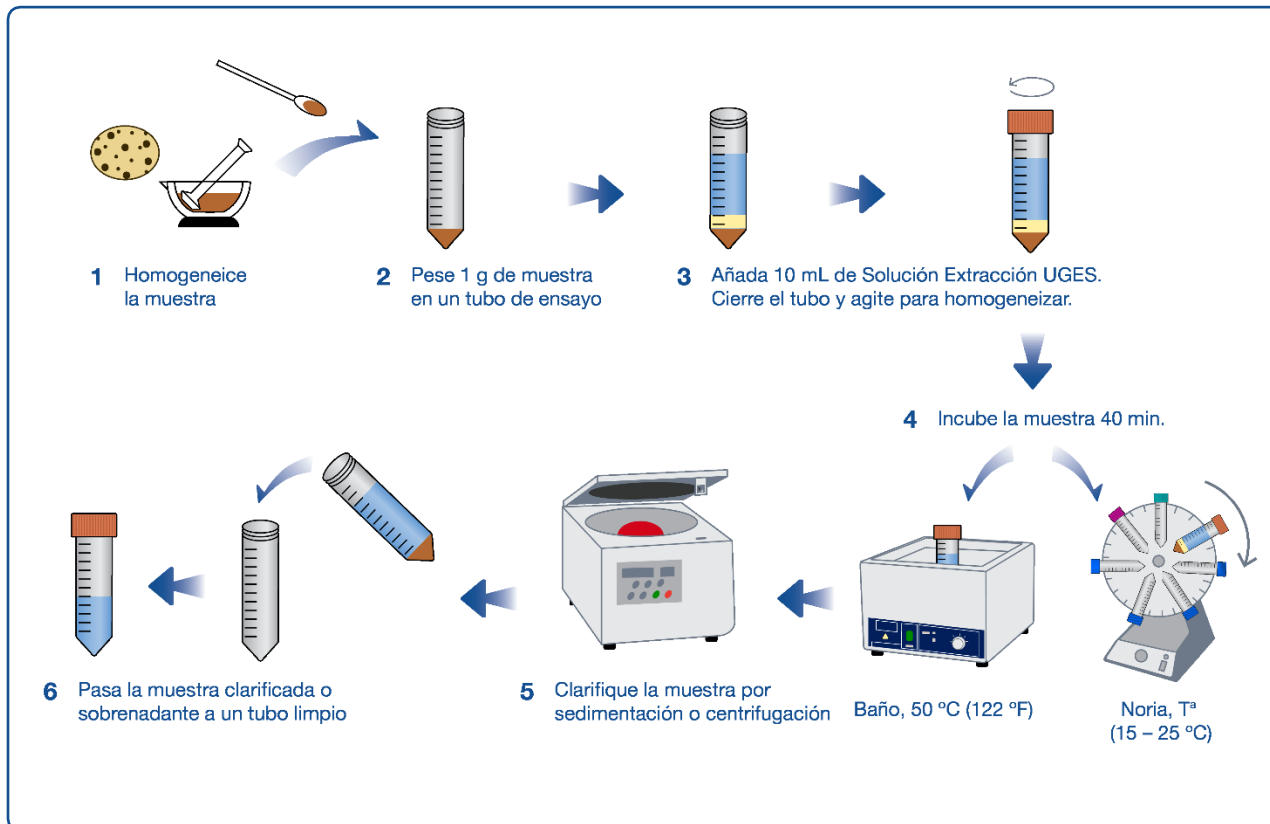


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

## 8.2 Muestras líquidas

Las muestras líquidas tales como leche, zumos, bebidas carbonatadas (refrescos), bebidas ecológicas (de soja, arroz, avena, espelta), 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.
  - a. Si la muestra contiene polifenoles, taninos (p. ej. Chocolate, vino) o antioxidantes, pese y añada al tubo con la muestra 1 g de aditivo especial polifenoles y agítelo vigorosamente para homogeneizar la mezcla.
2. Añada 9 mL de Solución de extracción UGES y cierre bien el tubo.
3. Agite la muestra manualmente (de forma vigorosa) o mediante un vórtex, durante 1-2 minutos.

## 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 los casetes GlutenTox.
2. Diluya la muestra con Solución de Dilución en tubos o viales de ensayo **según lo indicado en el Certificado de Análisis que acompaña a cada kit.**

Nota: En muestras con un elevado contenido en grasas, evite coger la capa de grasa sobrenadante. La dilución varía con el lote de casetes GlutenTox. Un volumen final de 900 - 1000 µL es suficiente para realizar el ensayo.





3. Abra el envoltorio del casete. En caso de que desee realizar los controles positivos y negativos, necesitará un casete para cada prueba. Deposite con una pipeta 100 µL de la muestra diluida o del control correspondiente en la Zona S del casete.
4. Espere 30 minutos y lea visualmente el resultado en el casete (ver sección 11).
5. Para cuantificar el contenido en gluten de la muestra, espere 30 minutos y analice el casete con el Hygiena Cube (no espere ni más ni menos de los 30 minutos para realizar el análisis).
6. Se recomienda analizar las muestras por duplicado para obtener resultados concluyentes. Las diluciones de la muestra deben analizarse en un corto espacio de tiempo, y el material restante no se puede conservar.

### No analice el casete con el Hygiena Cube:

- Si en la Zona Test (T) del casete aparecen puntos (en la zona central o en alguno de los extremos) en vez de una línea homogénea
- Si las líneas test y control aparecen desplazadas de las Zonas Test (T) y Control (C) del casete, respectivamente.

## 10. Uso del Hygiena Cube

El Lector está diseñado para la cuantificación de gluten con GlutenTox Sticks Plus para Cube, con un rango de cuantificación de entre 3 ppm y 40 ppm de gluten. Leer atentamente los manuales de uso del Hygiena Cube y del programa Hygiena Cube DataReader antes de usarlo por primera vez.

Para cuantificar su muestra, siga los siguientes pasos:

- a. Usando el Hygiena Cube de manera independiente.



1. Encender el dispositivo presionando el botón brevemente (< 1 sec). La pantalla mostrará "ON".
2. Colocar el test en el adaptador 30 minutos después de añadir la muestra al casete. Asegurarse de que el adaptador y el casete están colocados correctamente.
3. Colocar el Hygiena Cube encima del adaptador y el casete. Asegurarse de que de que el Hygiena Cube está colocado correctamente.
4. Presionar el botón brevemente. La pantalla mostrará "RFID TEST". Colocar la tarjeta RFID del lote específico encima del dispositivo.
5. La pantalla mostrará "TEST". Presionar el botón brevemente. La pantalla mostrará "RUN".
6. El resultado se mostrará en la pantalla.
7. Presionar el botón brevemente para volver al paso 1.

**No puede usar medida con temporizador.**



- b. Usando el Hygiena Cube en modo remoto.
  1. Encender el dispositivo presionando el botón brevemente (< 1 sec). La pantalla mostrará "ON".
  2. Conectar el Hygiena Cube al ordenador utilizando el cable USB suministrado.
  3. Abrir el programa Hygiena Cube DataReader. Comprobar que el Hygiena Cube está conectado correctamente.
  4. Colocar el test en el adaptador 30 minutos después de añadir la muestra al casete. Asegurarse de que el adaptador y el casete están colocados correctamente.
  5. Colocar el Hygiena Cube encima del adaptador y el casete. Asegurarse de que el Hygiena Cube está colocado correctamente.
  6. Pinchar en el botón "Iniciar la Medición".
  7. Aparecerán distintas ventanas dependiendo de la configuración seleccionada previamente.
  8. Colocar la tarjeta RFID del lote específico encima del dispositivo. Presionar "OK".
  9. La medida comenzará inmediatamente.
  10. El resultado se añadirá a la lista y el diagrama 2D aparecerá en pantalla.

**No puede usar medida con temporizador.**

***¡NOTA IMPORTANTE!***

***Cuando el contenido de gluten en la muestra es menor de 3 ppm (o cuando la muestra no tiene gluten) el resultado en el Hygiena Cube aparecerá como < 3 ppm y < LOQ (Limit of Quantification), sin embargo, si la muestra tuviera trazas de gluten (< 3 ppm) éstas podrían visualizarse como una línea roja tenue en la Zona Test (T) del casete.***

## **11. Interpretación visual de los resultados**

Para cuantificar la cantidad de gluten en la muestra, use Hygiena Cube (ver sección 10). Para una interpretación visual, el resultado puede ser:

**NEGATIVO:** Si después de esperar 30 minutos aparece una sola línea AZUL (línea de control) en la Zona Control (C). La muestra contiene menos de 3 ppm de gluten.

**POSITIVO:** Si después de esperar 30 minutos, además de la línea de control (AZUL) también aparece una línea ROJA (línea de resultado) en la Zona Test (T) (esta línea roja puede aparecer antes de los 30 minutos). La muestra (\*) podría contener más de 3 ppm de gluten y ser cuantificable con el Hygiena Cube (si los casetes fueran inválidos o no aptos para cuantificación no los analice).

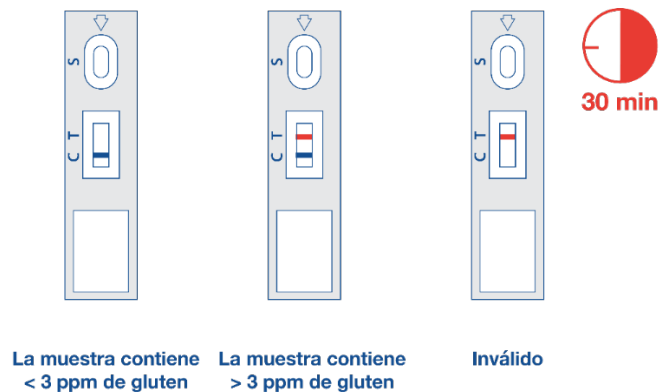
(\*) Puede ocurrir que la línea ROJA en la Zona Test (T) sea tenue y el resultado en el Hygiena Cube sea < LOQ. Esto significaría que la muestra contiene menos de 3 ppm de gluten; contiene trazas de gluten que no se pueden cuantificar con el Hygiena Cube.

**INVÁLIDO Y/O NO APTO PARA CUANTIFICACIÓN:** Cuando la línea de control (AZUL) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (ROJO).

Si en la Zona Test (T) del casete aparecen puntos (en la zona central o en alguno de los extremos) en vez de una línea homogénea; Si las líneas test y control aparecen desplazadas de las Zonas Test (T) y Control (C) del casete, respectivamente. Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido y/o no apto para cuantificación son: un volumen insuficiente (< 100 µL) de muestra en la Zona S, un error durante el



procedimiento, un deterioro de los reactivos o un defecto en el casete. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si el problema persiste, debe contactar con su proveedor.



**Figura 3.** Interpretación visual de los resultados

## 12. Control de calidad

El control interno de funcionamiento viene incluido en el test. La línea azul que aparece en la Zona de Control (C) 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, están a su disposición 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.

## 13. Características analíticas

Se han llevado a cabo diferentes ensayos para caracterizar los principales parámetros analíticos del test: sensibilidad y especificidad.

### Sensibilidad

El límite de cuantificación de GlutenTox Sticks Plus para Cube es de 3 ppm de gluten. Este valor se ha obtenido analizando muestras contaminadas con harina de trigo de concentración conocida.

Nota: Para cuantificar con precisión el gluten en una muestra, utilice GlutenTox ELISA Rapid G12 (KIT3075).

### Especificidad

El test es capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica para los pacientes celíacos de las prolaminas del trigo (gliadina), centeno (secalina), cebada (hordeína) y cantidades suficientemente elevadas de las de algunas avenas (aveninas) que pueden desencadenar la respuesta inmune en pacientes 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. Hasta ahora no se han reportado falsos positivos.

### 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 con GlutenTox Sticks Plus. En todos los tipos de muestras ensayadas (ver Tablas 1 y 2), 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 tipo de muestras.

**Tabla 1.** 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 para ensalada César, salsa de tomate, salsa de soja, aderezo en-salada, 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 2.** 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)



## 14. Propiedad intelectual

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

## 15. 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", *AJCN* 2008;87:405-414.
4. S Síglez, M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; *Alimentaria*; 2010; 411:67-70.