

GLUTEN

COD 31000 1 x 20 mL + 1 x 5 mL	COD 31001 2 x 20 mL + 2 x 5 mL
Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio	

GLUTEN
INMUNOTURBIDIMETRÍA

USO PREVISTO

Reactivo para la medición de contaminaciones por prolaminas de trigo (gliadina), centeno (secalina) y cebada (hordeína) en productos crudos como harinas (trigo sarraceno, arroz, maíz, avena) y especias, así como en alimentos procesados como comidas listas para servir, productos de panadería, embutidos, vino y otras bebidas (Notas 1,2).

Usar la Solución de Extracción de Gluten de BioSystems (Ref. 31003), para extraer el gluten de las muestras.

El rango de medida del kit es de 2,5 a 40 mg/kg de gluten (1,25 a 20 mg/kg de gliadina). Las muestras con una concentración superior al límite de linealidad especificado pueden diluirse en consecuencia con Solución de Extracción de Gluten BioSystems.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La gliadina en la muestra provoca una aglutinación de las partículas de látex recubiertas con un anticuerpo específico para la secuencia 33-mer. La aglutinación de las partículas de látex es proporcional a la concentración de gliadina y puede ser cuantificada por turbidimetría.

CONTENIDO

	COD 31000	COD 31001
A. Reactivo	1 x 20 mL	2 x 20 mL
B. Reactivo	1 x 5 mL	2 x 5 mL
S. Patrón	5 x 5 mL	5 x 5 mL

COMPOSICIÓN

- A. Reactivo. Tampón, azida de sodio 0,95 g/L.
- B. Reactivo. Suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-Gliadina 33-mer, azida de sodio 0,95 g/L.
- S1. Patrón. 1 x 5 mL. Gliadina PWG 0,031 mg/L. Patrón primario acuoso.
- S2. Patrón. 1 x 5 mL. Gliadina PWG 0,063 mg/L. Patrón primario acuoso.
- S3. Patrón. 1 x 5 mL. Gliadina PWG 0,125 mg/L. Patrón primario acuoso.
- S4. Patrón. 1 x 5 mL. Gliadina PWG 0,250 mg/L. Patrón primario acuoso.
- S5. Patrón. 1 x 5 mL. Gliadina PWG 0,500 mg/L. Patrón primario acuoso. (Nota 3)

PELIGRO: H226: Líquidos y vapores inflamables. H319: Provoca irritación ocular grave. P210: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P403+P235: Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 °C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro: Absorbancia del blanco superior a 0,800A.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Ejerza las precauciones habituales requeridas para manipular todos los reactivos de laboratorio. Las fichas de seguridad están disponibles para el usuario bajo petición. La eliminación de todos los residuos debe ser conforme a las normativas locales. Cualquier incidente grave que pueda ocurrir en relación con el dispositivo debe ser comunicado a BioSystems S.A.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS

Analizador, espectrofotómetro o fotómetro BioSystems con cubeta termostatzable a 37 °C para lecturas a 520 nm.

Balanza analítica

Viales de microcentrífuga y/o tubos cónicos para centrífuga.

Homogenizador: picadora/trituradora de laboratorio y vortex.

Centrífuga.

Incubadora o baño de agua (50 °C).

Filtros de jeringa (p. ej., Whatman Cat. No. 6884-2510 o similar).

BioSystems Gluten Extraction Solution (Ref. 31003).

BioSystems Gluten Spike Solution (Ref. 31002) (Nota 4).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos y los patrones están listos para su uso.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra

Sólidos:

- Tratar, preparar y homogeneizar la muestra según un protocolo que garantice una muestra representativa sin alteraciones en el contenido natural de gluten. Se recomienda triturar y homogeneizar minuciosamente una cantidad representativa de la muestra (por ejemplo, 200 g) antes de extraer la porción de análisis.
- Pesar 0,25 g ($\pm 0,01$ g) de muestra sólida homogeneizada en un vial con tapón de rosca y agregar 10 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems (Ref. 31003).

- En casos donde la distribución de gluten dentro de la muestra es altamente heterogénea y/o difícil de homogeneizar (por ejemplo, una muestra de avena), se recomienda aumentar el peso de la muestra homogeneizada y, por consiguiente, el volumen de la Solución de Extracción de Gluten BioSystems. Por ejemplo, extraer una muestra de 0,5 g con 20 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems o una muestra de 1 g con 40 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems.
- No es necesario aplicar un tratamiento especial a las muestras de alimentos que contengan taninos y/o polifenoles (por ejemplo, chocolate, café, cacao, harina de castaña, trigo sarraceno, mijo, especias...).
- Cerrar el vial y agitar utilizando un agitador de vórtex u otro similar durante 30 segundos, hasta que la muestra esté suspendida de manera homogénea.
- Incubar la mezcla durante 40 minutos a 50 °C en un baño de agua.
- Retirar las muestras del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente (5-10 minutos).
- Centrifugar durante 10 minutos, al menos a 2000 g o transferir una porción de la suspensión (p. ej., 1,5 mL) a un vial de microcentrífuga y centrifugue a alta velocidad (≥ 10000 g) durante 2 minutos.
- Si se observa una capa de grasa después de la centrifugación, recoger el sobrenadante a través de la capa, pipetee en otro vial y centrifugar nuevamente. Si el sobrenadante es turbio, filtrar con un filtro de jeringa (p. ej., Whatman Cat. No. 6884-2510 o similar).
- El gluten en el sobrenadante es estable durante al menos 8 días a 15-25 °C.

Líquidos:

- Tratar, preparar y homogeneizar la muestra según un protocolo que garantice una muestra representativa sin alteraciones en el contenido natural de gluten.
- Pipetear 0,25 mL de muestra en un vial de tapón de rosca y agregar 10 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems.
- En casos donde la distribución de gluten dentro de la muestra es altamente heterogénea y/o difícil de homogeneizar, se recomienda aumentar el volumen de la muestra homogeneizada y, por consiguiente, el volumen de la Solución de Extracción de Gluten BioSystems. Por ejemplo, extraer una muestra de 0,5 mL con 20 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems o una muestra de 1 mL con 40 mL de Solución de Extracción de Gluten BioSystems.
- No es necesario aplicar un tratamiento especial a las muestras de alimentos que contengan taninos y/o polifenoles (por ejemplo, vino)
- Cerrar el vial, agitar e incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Usar la muestra directamente para la determinación de gluten.
- El gluten en la muestra es estable durante al menos 8 días a 15-25 °C.

Procedimiento manual

- Atemperar los reactivos y el fotómetro a 37 °C.
- Pipetear en una cubeta (Nota 5-9):

	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra
Patrón/Muestra	-	100 μ L
BioS GlutExtract Sol.	100 μ L	-
Reactivo A	800 μ L	800 μ L

- Agitar bien, dejar los tubos durante 1 minuto a 37 °C y leer la absorbancia (A1) a 520 nm.
- Pipetear en la cubeta:

Reactivo B	200 μ L	200 μ L
------------	-------------	-------------

- Agitar bien, dejar los tubos durante 10 minutos a 37 °C y leer la absorbancia (A2) a 520 nm.
- Calcular el incremento de absorbancia del patrón/muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$A = (A2 - 0,82 \times A1)_{\text{Patrón/Muestra}} - (A2 - 0,82 \times A1)_{\text{RB}}$$

- Calcular la concentración de gliadina utilizando la curva de calibrado, luego convertirla a concentración de gluten multiplicando la concentración de gliadina por 2 (Nota 3).
- Muestras con concentraciones superiores al límite de linealidad especificado deben ser diluidas adecuadamente con Solución de Extracción de Gluten BioSystems. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución (df).
- Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para su preparación, el contenido (mg/kg) (CT) se calcula a partir de la cantidad de muestra pesada (W), el volumen en el que se prepara muestra pesada (V) y la concentración de gluten obtenida en la muestra (C), y el factor de dilución (df) si es necesario, según se describe a continuación:

$$\frac{C_{\text{Muestra}} (\text{mg/L}) \times V (\text{L})}{W_{\text{Muestra}} (\text{kg})} \times df = CT_{\text{Muestra}} [\text{mg/kg}]$$

Procedimiento automatizado

- Transferir al menos 500 μ L del sobrenadante a un vial o tubo adecuado para el analizador BioSystems Y15.
- Colocar las muestras, los calibradores y los reactivos en el analizador según las instrucciones del analizador BioSystems Y15 (Nota 5, 7, 8, 9).

3. Programar la sesión en el analizador BioSystems Y15 siguiendo las pautas proporcionadas en el manual del usuario.
4. Utilizar el test GLIADIN para el análisis. Los parámetros para esta prueba están programados en el analizador como se muestra a continuación:

GENERAL	
Técnica	GLIADIN
Modo de análisis	Diferencial bireactivo
Tipo de muestra	ST1
Unidades	mg/L
Técnica turbidimétrica	Si
Mezcla activa	Si
Tipo de reacción	Creciente
Replicados	2
Decimales	3
PROCEDIMIENTO	
Lectura	Monocromática
Muestra	20
Reactivo 1	160
Reactivo 2	40
Lavado	1,2
Factor predilución	-
Filtro Principal	520
Filtro Referencia	-
Lectura 1	96 s
Lectura 2	600 s
Reactivo 2	120 s
CALIBRACION	
Tipo de calibración	Específica
Puntos curva de calibración	5
OPCIONES	
Solución para blanco	Específica [Diluyente 1] (Nota 9)
Límite absorbancia blanco	0,800
Límite blanco cinético	-
Límite de linealidad	0,5

5. Para obtener la concentración de gluten en mg/L, utilice la Técnica Calculada "GLUTEN (mg/L)". Para obtener la concentración de gluten en mg/kg, utilice la Técnica Calculada "GLUTEN (mg/kg)". Introduzca el peso exacto (g) para cada muestra. Todos los cálculos se realizan automáticamente mediante el software del analizador (Nota 3).
6. Las muestras con concentración por encima del límite de linealidad especificado deben diluirse adecuadamente con la Solución de Extracción Gluten de BioSystems.

CALIBRACIÓN

Debe realizarse un blanco de reactivo (Nota 9) cada día y calibrar después de un cambio de lote de reactivo o cuando lo requieran los procedimientos de control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar un resultado preciso, exento de efectos de matriz, se recomienda analizar muestras con la adición de una concentración conocida de gluten como muestra control. Para este fin, se debe utilizar BioSystems Gluten Spike Solution (Nota 4).

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los resultados de los controles no se encuentren entre los límites de aceptación.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Las características metrológicas descritas se han obtenido utilizando un analizador Y15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

- Límite de cuantificación: 2,5 mg/kg [mg/L] gluten.
- Intervalo de medida: 2,5 - 40 mg/kg [mg/L] gluten.
- Precisión: Se muestra un ejemplo de matrices, fuentes de contaminación y niveles de concentración de gluten. Más datos del estudio de precisión están disponibles bajo solicitud.

- Precisión:

Matriz	Contaminante (gluten)		RSDr
	Origen	mg/kg	
Harina de maíz	Harina de trigo	5	10,7
		20	8,4
Harina de Arroz	Harina de trigo	5	9,2
		20	11,7
Vino tinto	Harina de trigo	5	3,5
		10	3,4
Salchicha	Harina de trigo	5	8,0
		20	10,5
Cacao instantáneo	Gluten Spike Solution	5	7,1
		10	3,6
Galletas	Gluten Spike Solution	2,5	4,1
		10	2,0

- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con un procedimiento de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Especificidad: Este método emplea un anticuerpo dirigido contra la fracción inmunotóxica 33-mer de las prolaminas y es específico contra trigo (gliadina), centeno (secalina) y cebada (hordeína). No se ha detectado reactividad cruzada con otros alimentos libres de gluten (Nota 4).
- Efecto prozona: No se observó ningún efecto de prozona dentro del rango estudiado (0 - 85000 mg/kg gluten).

NOTAS

1. Este método no ha sido validado para alimentos fermentados o hidrolizados (por ejemplo, cerveza o masa madre).
2. En casos donde la presencia de gluten en el vino se relaciona con el empleo de agentes clarificantes de origen vegetal, prácticas enológicas como el sellado de barriles con pasta de trigo o posibles contaminaciones posteriores a la fermentación.
3. Las concentraciones de los patrones se dan en gliadina. Se han preparado a partir del material de referencia PWG-Gliadin (Prolamin Working Group). Para convertir la concentración de gliadina en gluten se debe utilizar un factor de 2 (definición Codex Alimentarius).
4. La evaluación de la reactividad cruzada se llevó a cabo mediante el análisis de una única muestra representativa de cada tipo de matriz individual. Los resultados obtenidos de estas muestras se presentan en el informe de evaluación de prestaciones. Es importante destacar que otras muestras pueden arrojar resultados diferentes, por lo tanto, se recomienda llevar a cabo estudios de recuperación.
5. Homogeneizar el Reactivo B con suavidad antes de usarlo.
6. Los volúmenes propuestos son para el uso de una cubeta semi-micro. Puede utilizarse otros volúmenes si se mantiene la relación entre los reactivos y la muestra.
7. No intercambie reactivos individuales entre kits de diferentes números de lote.
8. Se recomienda medir las muestras por duplicado.
9. Realizar el blanco de reactivo con BioSystems Gluten Extraction Solution (Ref.31003).

BIBLIOGRAFÍA

1. Codex Alimentarius Commission. Codex standard 118-1979. Foods for special dietary use for persons intolerant to gluten, in Codex Alimentarius. rev 2008: FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland.
2. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2019) 21st Ed., AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA (http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf).
3. International Organisation of Vine and Wine (OIV) Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method.
4. Wehling, P. and K.A. Scherf, Preparation of Validation Materials for Estimating Gluten Recovery by ELISA According to SMPR 2017.021. J AOAC Int. 2020. 103(1): p. 210-215.
5. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., OMA 2012.01, AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD.
6. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., OMA 2018.15, AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD.

