

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®]

for Gliadin R5

Refrigerate at 2–8°C (35–46°F) • Do not freeze



GLIADIN/GLUTEN

Gliadin is an alcohol-soluble protein found in wheat that belongs to a group of proteins called prolamins. Other prolamins include secalin, found in rye, and hordein, found in barley. Gluten consists of two groups of proteins (prolamins and glutelins) that are found in differing amounts in wheat, barley, rye and oats.

Gliadin and other prolamins have been identified as major causal agents in a number of disorders, including wheat allergy and gluten intolerance (celiac disease). Wheat allergy is a specific immune response to a number of wheat proteins, including gliadin, albumin, globulin, and glutenin. Celiac disease is a chronic reaction to gluten proteins that results in the poor absorption of nutrients in the small intestine.

Those who must avoid gluten rely upon the correct labeling of food to make appropriate, safe food choices. Testing for the presence of gluten components ensures food manufacturers that an unlabeled—and potentially dangerous—ingredient did not make its way into a food product.

INTENDED USE

Veratox[®] for Gliadin R5 is intended for the quantitative analysis of ingredients, clean-in-place solutions, and finished food products intended to be gluten-free for the presence of gliadin and prolamins found in wheat, barley and rye. Rice flour, cereal, bread and cooked hamburger were validated by AOAC Research Institute. Clean-in-place solutions and other foods were validated internally by Neogen.

INTENDED USER

This test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with foods possibly contaminated by gliadin. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has completed the Neogen training.

ASSAY PRINCIPLES

Veratox for Gliadin R5 is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Gliadin is extracted from samples with a 60% ethanol solution by shaking in a shaker or rotator. The extract is diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) and diluted samples are added to R5 antibody-coated wells (capture antibody) where gliadin will bind to the antibody during an incubation period. Any unbound gliadin is washed away and a second antibody, which is R5 enzyme-labeled (detector antibody) is added. The detector antibody binds to the gliadin during another incubation period. Unbound enzyme-labeled antibody is washed away and a one step substrate is added. Color develops as a result of the presence of bound-labeled antibody. A stopping reagent is added and the color of the solution is observed. Blue indicates samples containing high levels of gliadin while purple or red samples contain little or no gliadin. The optical densities of the controls form a standard curve, and the sample optical densities are plotted against the curve to calculate the exact concentration of gliadin in parts per million (ppm).

STORAGE REQUIREMENTS

The kit can be used until the expiration date on the label when stored refrigerated at 2–8°C (35–46°F).

MATERIALS PROVIDED

1. 48 antibody-coated microwells
2. 48 red-marked transfer wells
3. 6 yellow-labeled bottles of 0, 2.5, 5, 10, 20, and 40 ppm gliadin controls (5, 10, 20, 40, and 80 ng/mL gliadin)
4. 2 blue-labeled bottles of enzyme-labeled antibody conjugate
5. 1 green-labeled bottle of K-Blue[®] Substrate
6. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution
7. 40 mL of 10 mM PBS-Tween washing reagent in a widemouth bottle. Each bottle can prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
8. 1 foil pouch sample diluent concentrate of 10 mM PBS dry powder containing enough powder to prepare 1 L of dilution buffer
9. 50 g of extraction additive in 2 specimen cups
10. Plastic scoop to measure extraction additive

MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Orbital rotator or shaker to hold 50 cc centrifuge tubes for a 1 g sample, or shaker water bath with clamps adjusted to hold 125 mL (4 oz) extraction bottles for a 2 g sample
2. Oven or water bath adjustable to 50°C if analyzing heat-processed samples
3. Scale capable of weighing 0.25 ± 0.01 g if using gliadin renaturing cocktail solution to analyze heat-processed samples
4. Gliadin renaturing cocktail solution for heat processed samples (Neogen item 8515, 8515S, 8515B)
5. Laboratory grade ethanol (190 proof)
6. Microwell reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
7. Pipettor, 50–200 µL adjustable (Neogen item 9276)
8. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
9. Pipette tips (Neogen item 9410, 9417, 9407)
10. Two 1 L bottles to prepare washing solution and sample extract dilution solution (Neogen item 9472)
11. Test tubes to perform sample extract dilution
12. Timer (Neogen item 8426, 9452)
13. 3 reagent boats for 12-channel pipettor (Neogen item 9435)
14. Microwell strip holder (Neogen item 9402)
15. Wash bottle (Neogen item 9400)
16. Paper towels or equivalent absorbent material
17. Waterproof marker
18. Distilled or deionized water
19. Centrifuge (optional)
20. Vortex (Neogen item 9494)

PRECAUTIONS

1. Ethanol solution is highly flammable. Keep container tightly closed, and keep away from heat, sparks, open flame and those smoking. It is toxic if swallowed, or if vapor is inhaled. Avoid contact with skin.
2. Components of Veratox for Gliadin R5, such as controls and extraction additive, may contain one or more of the following potentially allergic materials: gluten, casein and soy protein. If allergic to any of these compounds, use caution when using this product.
3. Concentrated food additives, colors and flavors may cause interferences on ELISA test methods. Contact Neogen's technical services for validation information.
4. Sponges should not be used for sample collection and gliadin testing. Sample collection swabs other than Neogen swabs should be validated prior to use. General sponges and swabs may contain solutions or materials that may interfere with the test kits.
5. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze test kits, and avoid prolonged storage at ambient temperatures.
6. Bring kits to room temperature (18–30°C, 64–86°F) prior to use.
7. Do not use kit components beyond expiration date.
8. Do not mix reagents from one kit lot with reagents from a different lot.

9. Do not run more than 24 wells per test.
10. Follow proper pipetting techniques (e.g., prime tips and use clean tips).
11. Use only incubation times specified; others may give inaccurate results.
12. Use clean pipette tips and glassware for each sample to avoid cross-contamination. Thoroughly wash all glassware between samples.

PROCEDURAL NOTES

1. **Sample extract dilution solution (PBS).** Prepare extract dilution solution by adding a foil pouch of sample dilution concentrate, 10 mM PBS, to 1 L distilled or deionized water. Swirl to mix thoroughly.
2. **Controls.** Six controls are provided with this kit. Neogen recommends using all six or a combination of at least five controls with each assay. This combination may vary. One possible combination is to eliminate the 2.5 ppm control to yield results in the range of 5–40 ppm. If needed, contact Neogen Technical Services for more information on the use of these controls.
3. **Wash buffer.** Prepare the wash buffer solution by pouring the wash buffer concentrate into a 1 L container. Add 960 mL of distilled or deionized water. Swirl to ensure thorough mixing.
NOTE: Discard unused portions of extract dilution solution and wash buffer when the test kit has been used completely.
4. **Extraction additive.** To be used with the provided scoop with all the samples utilizing extraction procedure A or B (non-heat processed samples). Heat processed samples (procedure C) should **only** use the extraction additive if samples contain buckwheat, chestnut flour or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs or fruits.
5. **Substrate.** K-Blue Substrate is ready for use. The substrate should be clear to light blue — discard if it has turned dark blue. Only pour the needed volume of substrate into a reagent boat. **Do not return unused substrate to the bottle.** Cover the reagent boat to keep the substrate protected from light until needed.
6. **Antibody wells.** Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after samples are extracted, and the test procedure is set to begin.

SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

For analyzing heat-processed samples or samples of an unknown origin, follow extraction procedure C. For all commodities that were not heat-processed, follow either extraction procedure A or B.

A. Extraction of non-heat processed samples with orbital shaker or rotator

1. Prepare 60% ethanol extraction solution by combining 6 parts ethanol with 4 parts distilled water. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 1.
2. Add 1 g ground sample, or 1 mL liquid sample, to a clean 50 cc tube.
3. Add 1 level scoop of extraction additive to the tube.
4. Add 10 mL (9 mL for liquid samples) of 60% ethanol to the tube, cap tightly, then shake the tube vigorously by hand for about **1 minute**, or vortex for **30 seconds**, to ensure complete mixing.
5. Extract by shaking (150 rpm) in an orbital shaker or rotator by laying the tube down on its side over the flat pad of the instrument, and holding it tightly using a rubber band or tape. Rotate or shake for **10 minutes** at room temperature.
6. Centrifuge sample (if necessary) for **10 minutes** at ≥ 2500 g at room temperature.
7. Dilute each sample 1:50 by withdrawing 100 μ L of the upper layer of the extract and transferring it to a small tube or vial containing 4.9 mL of sample extract dilution solution (PBS).
8. To mix, vortex the tube for **5 seconds**.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

B. Extraction of non-heat processed samples with shaker or shaker water bath

1. Prepare 60% ethanol extraction solution by combining 6 parts ethanol with 4 parts distilled water. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 1.
2. Add 2 g ground sample, or 2 mL liquid sample, to a 125 mL clean extraction bottle.
3. Add 1 level scoop of extraction additive to the bottle.
4. Add 20 mL (18 mL for liquid samples) of 60% ethanol, cap the bottle tightly, then shake vigorously by hand for about **20 seconds** to ensure complete mixing.
5. Extract by shaking (150 rpm) in a shaker for **10 minutes** at room temperature (a shaker water bath can work, but do not turn the heat on). Remove the bottle from shaker or bath.
6. Centrifuge sample (if necessary) for **10 minutes** at ≥ 2500 g at room temperature.
7. Dilute each sample 1:50 by withdrawing 100 μ L of the upper layer of the extract and transferring it to a small tube or vial containing 4.9 mL of sample extract dilution solution (PBS).
8. To mix, vortex the tube for **5 seconds**.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

C. Extraction of heat-processed or unknown origin commodities

Heat-processed commodities require the gliadin renaturing cocktail solution (Neogen item 8515) that renatures the heated samples and allows the accurate detection of any possible gliadin in a sample. To extract gliadin from heat-processed samples:

1. Prepare 80% ethanol extraction solution by combining 8 parts ethanol with 2 parts distilled water.
2. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 1.
3. Weigh out 0.25 g sample into a 50 cc screw cap centrifuge tube.
4. Add 2.5 mL of renaturing cocktail solution.
5. If samples contain buckwheat, chestnut flour or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs or fruits, add 1 level scoop of extraction additive. For all other commodity types, do not add extraction additive.
6. Cap and vortex **30 seconds** to homogenize cocktail and sample.
7. Incubate **40 minutes** at 50°C (water bath or oven).
8. Remove samples and let cool for **5–10 minutes**.
9. Add 7.5 mL of 80% ethanol and vortex again for **10–20 seconds**.
10. Shake (150–200 rpm) for **1 hour** at room temperature on a rotator (tube on its side).
11. Centrifuge sample (if necessary) for **10 minutes** at ≥ 2500 g at room temperature.
12. Dilute the sample 1:12.5 into PBS (200 μ L sample into 2.3 mL PBS).
13. To mix, vortex the tube for **5 seconds**.
14. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

TEST PROCEDURE

Allow the test kit and all reagents to warm to room temperature (18–30°C, 64–86°F) before using.

1. Remove 1 red-marked mixing well for each sample to be tested plus 1 red-marked well for each control, and place in the well holder.
2. Remove an equal number of antibody-coated wells. Return antibody wells that will not be used immediately to the foil pack with desiccant. Reseal the foil pack to protect the antibody. Mark one end of the strip with a "1," and place strip in the well holder with the marked end on the left.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. The controls (see procedural note 2) are supplied ready to use—do not dilute. Using a new pipette tip for each, transfer 150 µL of controls and diluted samples to the red-market mixing wells as shown in one of the templates below. Only run up to two 12-well strips at a time.

If using all 6 controls for a range of 2.5–40 ppm (AOAC method):

| | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
| S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 |

If using 5 controls for a range of 5–40 ppm:

| | | | | | | | | | | | |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 5 | 10 | 20 | 40 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 |
| S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 |

5. Place tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of the controls and sample extracts to the antibody-coated wells. Mix for 20 seconds by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
6. Incubate microwells 10 minutes at room temperature (18–30°C, 64–86°F). Discard the red-marked transfer wells.
7. Empty the contents of the wells into a sink. With a wash bottle, fill each antibody well with the wash buffer solution and dump out. Repeat the washing 5 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until all washing solution is removed.
8. Pour the needed volume of conjugate from the blue-labeled bottle into a clean reagent boat.
9. Using the 12-channel pipettor and new tips, transfer 100 µL of the conjugate into all the wells and mix for 20 seconds by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
10. Incubate for 10 minutes at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
11. Wash all wells with the wash buffer solution as described in step 7.
12. Pour the needed volume of substrate solution from the green-labeled bottle into a clean reagent boat.
13. Place new tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of substrate into each well and mix for 20 seconds. Do not eject tips.
14. Incubate for 10 minutes at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
15. Pour the needed volume of Red Stop solution from the red-labeled bottle into a clean reagent boat.
16. With the same tips used to dispense the substrate, transfer 100 µL of Red Stop into each well and mix for 20 seconds.
17. Wipe the bottom of the microwells and read in a microwell reader with a 650 nm filter.
18. Interpret the test's results using the Neogen 4700 microwell reader, or an equivalent strip reader. If using a strip reader, calculate the results using Neogen's Veratox Software for Windows.

INTERPRETATION OF RESULTS

Standard controls were made from wheat gliadin and calculated as gliadin. Approximately 50% of the gluten is available as gliadin. Therefore, to calculate the gluten value of the samples, multiply the ppm gliadin results by 2.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of quantitation: From AOAC validation: Cereal–5.71; cooked hamburger–3.15; bread–1.84; and rice flour–3.31. Neogen internally validated commodity LOQs were all under 2.5 ppm (described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect gliadin).

Limit of detection: From AOAC validation: Cereal–2.16; cooked hamburger–1.21; bread–0.63; and rice flour–1.23. Neogen internally validated commodity LODs were all under 2.5 ppm (defined as the mean value of 10 negative samples + 3.3 standard deviations).

Range of quantitation: 2.5–40 ppm (For quantitating samples above 40 ppm, contact a Neogen representative for dilution instructions).

CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Services can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's website at foodsafety.neogen.com, or by calling Neogen at 800/234-5333 or 517/372-9200.

TERMS AND CONDITIONS

For Neogen's full terms and conditions, please visit www.neogen.com/en/terms-and-conditions.

WARRANTY

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen will provide a replacement of the product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

TEST KITS AVAILABLE FROM NEOGEN

Natural toxins

- Aflatoxin, DON, ochratoxin, zearalenone, T-2/HT-2 toxins, fumonisin, histamine

Foodborne bacteria

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

Sanitation

- ATP, yeast and mold, total plate count, generic *E. coli* and total coliforms, protein residues

Food allergens

- Almonds, crustacea, eggs, gliadin, hazelnut, milk, mustard, peanuts, sesame, soy, walnut, multi-treenut

Genetic modification

- CP4 (Roundup Ready®)

Ruminant by-products

- Meat and bone meal, feed

Species identification

- Raw and cooked meat samples



North America

Neogen Headquarters

800-234-5333 (USA/Canada)

foodsafety@neogen.com

www.foodsafety.neogen.com

Europe, Middle East and Africa

Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600

info_uk@neogeneurope.com

www.neogeneurope.com

Mexico

Neogen Latinoamerica

+52 (55) 5254-8235

informacion@neogenlac.com

www.neogenlac.com

Brazil

Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogendobrasil.com.br

China

Neogen Bio-Scientific Technology

Tel: +86 21 6271 7013

info@neogenchina.com.cn

www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582

info@neogenindia.com

www.neogenindia.com

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox[®] **para Gliadina R5**

Refrigerar a 2–8°C (35–46°F) • No congele



GLIADINA/GLUTEN

La gliadina es una proteína soluble en alcohol que se encuentra en el trigo y pertenece a un grupo de proteínas llamadas prolaminas. Otras prolaminas incluyen la secalina, que se encuentra en el centeno, y la hordeína, que se encuentra en la cebada. El gluten consiste en dos grupos de proteínas (prolaminas y glutelinas) que se encuentran en diferentes cantidades en el trigo, la cebada, el centeno y la avena.

La gliadina y otras prolaminas se han identificado como agentes causales principales en varios trastornos como alergia al trigo e intolerancia al gluten (enfermedad celiaca). La alergia al trigo es una respuesta inmune específica a varias proteínas del trigo, incluidas la gliadina, albúmina, globulina y glutenina. La enfermedad celiaca es una reacción crónica a las proteínas del gluten que produce una absorción deficiente de nutrientes en el intestino delgado.

Aquellas personas que deban evitar el gluten confían en el etiquetado correcto de los alimentos para elegir los que sean apropiados y seguros. Analizar para detectar la presencia de componentes de gluten asegura a los fabricantes de alimentos que un ingrediente sin etiquetar—potencialmente peligroso—no llegó al producto alimenticio.

USO PREVISTO

Veratox[®] para Gliadina R5 está destinada para el análisis cuantitativo de ingredientes, soluciones de limpieza-en-sitio y productos alimenticios terminados destinados a estar libres de gluten, para la presencia de gliadina y prolaminas que se encuentran en el trigo, cebada y centeno. La harina de arroz, cereales, pan y hamburguesas fueron validadas por el Instituto de Investigación AOAC. Las soluciones de limpieza-en-sitio y otros alimentos fueron validados internamente por Neogen.

USUARIO PREVISTO

El kit de prueba está diseñado para ser utilizado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con alimentos y piensos posiblemente contaminados con gliadina. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben ser entrenados por un representante de Neogen o alguien que haya completado exitosamente el entrenamiento de Neogen.

FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS

Veratox para Gliadina R5 es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas tipo sándwich (S-ELISA). La gliadina es extraída de las muestras con una solución de etanol al 60% agitando en un agitador o rotador. El extracto se diluye en buffer fosfato salino (PBS) y las muestras diluidas se añaden a los micropocillos recubiertos con anticuerpos R5 (anticuerpo de captura) donde la gliadina se unirá al anticuerpo durante un período de incubación. Cualquier gliadina no unida se elimina por lavado y se añade un segundo anticuerpo que está marcado con la enzima R5 (anticuerpo detector). El anticuerpo detector se une a la gliadina durante otro período de incubación. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina por lavado y se añade un sustrato de un paso. El color se desarrolla como resultado de la presencia de un anticuerpo marcado unido. Se añade un reactivo de parada y se observa el color de la solución. El color azul indica muestras que contienen niveles altos de gliadina, mientras que las muestras de color púrpura o rojo contienen poca o ninguna gliadina. Las densidades ópticas de los controles forman una curva estándar, y las densidades ópticas de la muestra se trazan contra la curva para calcular la concentración exacta de gliadina en partes por millón (ppm).

ALMACENAMIENTO

El kit de prueba puede utilizarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta si se almacena refrigerado a 2–8°C (35–46°F).

MATERIALES PROPORCIONADOS

1. 48 micropocillos recubiertos con anticuerpos
2. 48 micropocillos de transferencia marcados en rojo
3. 6 botellas con etiquetas amarillas de controles de gliadina de 0, 2.5, 5, 10, 20, y 40 ppm (5, 10, 20, 40, and 80 ng/mL de gliadina)
4. 2 botellas con etiqueta azul de conjugado de anticuerpo marcado con enzima
5. 1 botella con etiqueta verde de sustrato K-Blue®
6. 1 botella con etiqueta roja de solución Red Stop
7. 40 mL de reactivo de lavado PBS-Tween 10 mM en una botella de boca ancha; cada botella es suficiente para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7.4)
8. 1 bolsa de aluminio de solvente de extracción en polvo seco PBS 10 mM; cada bolsa es suficiente para preparar 1 L de buffer de dilución
9. 50 g de aditivo de extracción en 2 recipientes de muestras
10. Cuchara plástica para medir el aditivo de extracción

MATERIALES RECOMENDADOS, PERO NO PROPORCIONADOS

1. Agitador o rotador orbital para aguantar tubos de centrifuga de 50 cc para una muestra de 1 g, o baño de maría con agitación con abrazaderas ajustadas para sostener botellas de extracción de 125 mL (4 oz) para una muestra de 2 g
2. Horno o baño de maría ajustable a 50°C si se analizan muestras procesadas térmicamente
3. Balanza capaz de pesar 0.25 ± 0.01 g si usa la solución cóctel de (solución) de renaturalización de gliadina para muestras procesadas térmicamente
4. Solución cóctel de renaturalización de gliadina, para muestras procesadas térmicamente (producto Neogen 8515, 8515S o 8515B)
5. Etanol de calidad de laboratorio (graduación de 190)
6. Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm (producto Neogen 9303)
7. Pipeteador, 50–200 µL ajustable (producto Neogen 9276)
8. Pipeteador, 12 canales (producto Neogen 9273)
9. Puntas de pipeta (producto Neogen 9410, 9417, 9407)
10. 2 botellas de 1 L para preparar la solución de lavado y la solución de extracción (producto Neogen 9472)
11. Tubos de ensayo para diluir el extracto de muestra
12. Cronómetro (producto Neogen 8426, 9452)
13. 3 reservorios para reactivos para pipeteador de 12 canales (producto Neogen 9435)
14. Gradilla para tiras de micropocillos (producto Neogen 9402)
15. Piseta de lavado (producto Neogen 9400)
16. Toallas de papel o un material absorbente equivalente
17. Marcador resistente al agua
18. Agua destilada o desionizada
19. Centrifuga (opcional)
20. Vortex (producto Neogen 9494)

PRECAUCIONES

1. La solución de etanol es altamente inflamable. Mantenga el recipiente bien cerrado y alejado del calor, chispas, llamas y los fumadores. Es tóxico si se ingiere o si se inhala el vapor. Evite el contacto con la piel.
2. Los componentes de Veratox para Gliadina R5 como controles y reactivos de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alergénicos: gluten, caseína, proteína de almendra y proteína de soja. Si usted es alérgico a cualquiera de estos compuestos, tenga precaución al usar este producto.
3. Los aditivos, colores y sabores concentrados de los alimentos pueden causar interferencias con el método de prueba ELISA. Póngase en contacto con los servicios técnicos de Neogen para obtener información de validación.
4. No se deben usar esponjas para la recolección de muestras y las pruebas de gliadina. Los hisopos para recolección de muestra que no sean de Neogen deben validarse antes de su uso. Las esponjas e hisopos generales pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con los kits de prueba.

- Almacene el kit de prueba entre 2–8°C (35–46°F) cuando no lo utilice. No congele los kits de pruebas y evite el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente.
- Permita que el kit alcance una temperatura ambiente entre (18–30°C, 64–86°F) antes de usarlo.
- No utilice los componentes del kit después de su fecha de vencimiento.
- No mezcle reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
- No ejecute más de 24 micropocillos a la vez.
- Siga las técnicas de pipeteo apropiadas (p. ej., cebar las puntas y usar puntas limpias).
- Use los tiempos de incubación especificados; otros tiempos pueden dar resultados inexactos.
- Use puntas de pipeta y cristalería limpia para cada muestra, para evitar la contaminación cruzada. Lave completamente toda la cristalería entre las muestras.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- Solución de dilución de extracto de muestra (PBS).** Prepare la solución de dilución de extracto añadiendo una bolsa de aluminio de concentrado de dilución de muestra, PBS 10 mM, a 1 L de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar completamente.
- Controles.** Se proporcionan seis controles con este kit. Neogen recomienda usar los seis o una combinación de al menos cinco controles con cada ensayo. Esta combinación puede variar. Una posible combinación es eliminar el control de 2.5 ppm para obtener resultados en el rango de 5–40 ppm. Si es necesario, comuníquese con los Servicios Técnicos de Neogen para obtener más información sobre el uso de estos controles.
- Buffer de lavado.** Prepare la solución de buffer de lavado vertiendo el buffer de lavado concentrado en un recipiente de 1 L. Añada 960 mL de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar completamente.
NOTA: Deseche las porciones no utilizadas de la solución de extracción y de buffer de lavado cuando el kit se haya utilizado por completo.
- Aditivo de extracción.** Para ser usado con la cuchara plástica provista con todas las muestras que utilizan el procedimiento de extracción A o B (muestras no procesadas térmicamente). Las muestras procesadas térmicamente (procedimiento C) solo deben usar el aditivo de extracción si las muestras contienen sarraceno, harina de castaño o taninos/compuestos fenólicos como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas.
- Sustrato.** El sustrato K-Blue está listo para su uso. El sustrato debe ser color transparente o azul claro – deséchelo si el líquido se ha vuelto azul oscuro. Solamente vierta el volumen necesario dentro del reservorio para reactivos. **No regrese a la botella el sustrato que no haya utilizado.** Cubra el reservorio para reactivos, para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
- Micropocillos recubiertos con anticuerpo.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio después de la extracción de las muestras y cuando esté listo para comenzar la prueba.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Para analizar muestras procesadas térmicamente o muestras de origen desconocido, siga el procedimiento de extracción C. Para todos los productos que no fueron procesados térmicamente, siga el procedimiento de extracción A o B.

A. Extracción de muestras no procesadas térmicamente con agitador o rotador orbital

- Prepare una solución de extracción de etanol al 60% combinando 6 partes de etanol con 4 partes de agua destilada. Prepare la solución de dilución de extracto de muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
- Añada 1 g de muestra molida, o 1 mL de muestra líquida, a un tubo limpio de 50 cc.
- Añada 1 cucharada de aditivo de extracción al tubo.
- Añada 10 mL (9 mL para muestras líquidas) de etanol al 60% al tubo, tápelo bien; agite el tubo vigorosamente con la mano durante aproximadamente **1 minuto** o mezcle con vortex durante **30 segundos** para asegurar que se mezcle completamente.
- Extraiga agitando (150 rpm) en un agitador o rotador orbital colocando el tubo de lado sobre la almohadilla plana del instrumento y sosteniéndolo firmemente con cinta o banda elástica. Rote o agite durante **10 minutos** a temperatura ambiente.
- Centrifugue la muestra (si es necesario) durante **10 minutos** a $\geq 2,500$ g a temperatura ambiente.
- Diluya cada muestra a una proporción de 1:50 extrayendo 100 μ L del sobrenadante del extracto y transfiriéndolo a un tubo o vial pequeño que contiene 4.9 mL de solución de dilución de extracto de muestra (PBS).
- Para mezclar, coloque el tubo en el vortex durante **5 segundos**.
- Analice las muestras diluidas dentro de **2–3 horas** después de la extracción.

B. Extracción de muestras no procesadas térmicamente con un agitador o un baño maría con agitación

1. Prepare una solución de extracción de etanol al 60% combinando 6 partes de etanol con 4 partes de agua destilada. Prepare la solución de dilución de extracto de muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
2. Añada 2 g de muestra molida, o 2 mL de muestra líquida, a una botella de extracción limpia de 125 mL.
3. Añada 1 cucharada de aditivo de extracción a la botella.
4. Añada 20 mL (18 mL para muestras líquidas) de etanol al 60%, tápela bien; agite la botella vigorosamente con la mano durante **20 segundos** para garantizar una mezcla completa.
5. Extraiga agitando (150 rpm) en un agitador durante **10 minutos** a temperatura ambiente (un baño maría con agitación puede funcionar, pero no encienda el calentador). Retire la botella del agitador o del baño.
6. Centrifugue la muestra (si es necesario) durante **10 minutos** a $\geq 2,500$ g a temperatura ambiente.
7. Diluya cada muestra a una proporción de 1:50 extrayendo 100 μ L del sobrenadante del extracto y transfiriéndolo a un tubo o vial pequeño que contiene 4.9 mL de solución de dilución de extracto de muestra (PBS).
8. Para mezclar, coloque el tubo en el vortex durante **5 segundos**.
9. Analice las muestras diluidas dentro de **2–3 horas** después de la extracción.

C. Extracción de productos procesados térmicamente o de origen desconocido

Los productos procesados térmicamente requieren la solución cóctel de renaturalización de gliadina (producto Neogen 8515) que renaturaliza las muestras calentadas y permite la detección precisa de cualquier gliadina posible en una muestra. Para extraer la gliadina de muestras procesadas térmicamente:

1. Prepare la solución de extracción de etanol al 80% combinando 8 partes de etanol con 2 partes de agua destilada.
2. Prepare la solución de dilución de extracto de muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
3. Pese 0.25 g de muestra y colóquela en un tubo de centrifuga de 50 cc con tapa roscada.
4. Añada 2.5 mL de solución cóctel de renaturalización.
5. Si las muestras contienen sarraceno, harina de castaña o taninos/compuestos fenólicos como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas, añada 1 cucharada de aditivo de extracción. Para todos los demás tipos de productos, no añada aditivo de extracción.
6. Tape y mezcle en el vortex durante **30 segundos** para homogeneizar el cóctel y la muestra.
7. Incube durante **40 minutos** a 50°C (horno o baño de maría).
8. Retire las muestras y déjelas enfriar durante **5–10 minutos**.
9. Añada 7.5 mL de etanol al 80% y mezcle en el vortex nuevamente durante **10–20 segundos**.
10. Agite (150–200 rpm) durante **1 hora** a temperatura ambiente en un rotador (tubo de lado).
11. Centrifugue la muestra (si es necesario) durante **10 minutos** a $\geq 2,500$ rpm a temperatura ambiente.
12. Diluya la muestra a una proporción de 1:12.5 en PBS 10 mM, pH 7.4 (muestra de 200 μ L 2.3 mL de PBS).
13. Para mezclar, coloque el tubo en el vortex durante **5 segundos**.
14. Analice las muestras diluidas dentro de **2–3 horas** después de la extracción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Permita que el kit de prueba y todos los reactivos se calienten a una temperatura ambiente de 18–30°C (64–86°F) antes de usarlos.

1. Retire 1 micropocillo de mezcla marcado en rojo para cada muestra a ser analizada, más 1 micropocillo marcados en rojo para cada control; colóquelos en la gradilla para micropocillos.
2. Retire una cantidad igual de micropocillos recubiertos con anticuerpos. Devuelva inmediatamente los micropocillos que serán utilizados a la bolsa de aluminio con desecante. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio para proteger el anticuerpo. Marque un extremo de la tira con un “1” y coloque la tira en la gradilla para micropocillos con el extremo marcado a la izquierda.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo la botella del reactivo antes de usar.

- Los controles (consulte la nota de procedimiento 2) se suministran listos para usar – no los diluya. Usando una nueva punta de pipeta para cada uno, transfiera 150 µL de controles y de extractos de muestra a los micropocillos de transferencia marcados con rojo, como se muestra en la tabla a continuación. Ejecute solo dos tiras de 12 micropocillos a la vez.

Si se usan los 6 controles para un rango de 2.5–40 ppm (método AOAC):

| | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
| S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 |

Si se usan 5 controles para un rango de 5–40 ppm:

| | | | | | | | | | | | |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 5 | 10 | 20 | 40 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 |
| S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 |

- Coloque puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL de los controles y de extractos de muestras a los micropocillos recubiertos con anticuerpos. Mezcle durante **20 segundos** deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
- Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre (18–30°C, 64–86°F). Deseche los micropocillos de transferencia marcados en rojo.
- Vacíe el contenido de los micropocillos en un fregadero. Con una pisseta de lavado, llene bien cada micropocillo de anticuerpos con la solución buffer de lavado y viértalo. Repita el lavado 5 veces, luego voltee los micropocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel hasta eliminar toda la solución de lavado restante.
- Vierta el volumen necesario de conjugado de la botella con etiqueta azul en un reservorio para reactivo limpio.
- Usando el pipeteador de 12 canales y puntas nuevas, transfiera 100 µL del conjugado a todos los micropocillos y mezcle durante **20 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
- Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
- Lave todos los micropocillos con la solución buffer de lavado como se describe en el paso 7.
- Vierta el volumen necesario de solución de sustrato de la botella con etiqueta verde en un reservorio para reactivo limpio.
- Coloque puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL del sustrato en cada micropocillo y mezcle durante **20 segundos**. No quite las puntas.
- Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
- Vierta el volumen necesario de la solución Red Stop de la botella con etiqueta roja en un reservorio para reactivos limpio.
- Con las mismas puntas usadas para dispensar el sustrato, transfiera 100 µL de la solución Red Stop a todos los micropocillos y mezcle durante **20 segundos**.
- Limpie el fondo de los micropocillos y léalos en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm.
- Interprete los resultados de la prueba usando el lector de micropocillos 4700 de Neogen o un lector de tiras equivalente. Si usa un lector de tiras, calcule los resultados usando el software Veratox de Neogen para Windows.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los controles estándar se hicieron a partir de gliadina de trigo y se calcularon como gliadina. Aproximadamente el 50% del gluten está disponible como gliadina. Por lo tanto, para calcular el valor de gluten en las muestras, multiplique los resultados de ppm de gliadina por 2.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de cuantificación: Validación del AOAC: Cereal–5.71; hamburguesa cocinada–3.15; pan–1.84; harina de arroz–3.31. Los LDC de productos validados internamente por Neogen estaban todos por debajo de 2.5 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración en la que esta prueba puede detectar de manera confiable la gliadina).

Límite de detección: Validación del AOAC: Cereal–2.16, hamburguesa cocinada–1.21; pan–0.63; y harina de arroz–1.23. Los LDC de productos validados internamente por Neogen estaban todos por debajo de 2.5 ppm (definido como el valor medio de 10 muestras negativas + 3.3 desviaciones estándar).

Rango de cuantificación: 2.5–40 ppm (para cuantificar muestras por encima de 40 ppm, comuníquese con un representante de Neogen para obtener instrucciones de dilución).

SERVICIO AL CLIENTE

Puede contactar los Servicios Técnicos y Asistencia al Cliente de Neogen usando la información de contacto en la parte posterior de este folleto. Entrenamiento para este producto, y para todos los kits de Neogen, está disponible.

INFORMACIÓN DE HOJAS DE SEGURIDAD (SDS) DISPONIBLE

Las Hojas de Seguridad (SDS) para este kit, y para todos los kits de Neogen, están disponibles en la página electrónica de Neogen foodsafety.neogen.com/sp, o llamando a Neogen al +1 800-234-5333 o +1 517-372-9200.

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite www.neogen.com/sp/terms-and-conditions para los términos y condiciones completos de Neogen.

GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un reemplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgos resultantes por el uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comerciabilidad de este producto o de la idoneidad de éste para cualquier propósito. Neogen no será responsable de ningún daño, incluyendo daños especiales o consecuenciales, o de gastos derivados directa o indirectamente del uso del producto.

KITS DE PRUEBAS DISPONIBLES DE NEOGEN

Toxinas naturales

- Aflatoxina, deoxinivalenol (DON), ocratoxina, zearalenona, toxina T-2/HT-2, fumonisina, histamina

Bacterias transmitidas por los alimentos

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

Saneamiento

- ATP, mohos y levaduras, recuento total en placa, *E. coli* genérico y coliformes totales, residuos proteicos

Alérgenos alimentarios

- Almendras, crustáceos, huevos, gliadina, avellana, leche, mostaza, maní, ajonjolí, soya, nuez de nogal y múltiples frutos secos

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos de rumiantes

- Harina de carne y huesos, concentrado para animales

Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas



Norteamérica

Oficinas corporativas de Neogen

+1 800-234-5333 (EEUU/Canadá)

foodsafety@neogen.com

foodsafety.neogen.com/sp

Europa, Medio Oriente y África

Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600

info_uk@neogeneurope.com

www.neogeneurope.com

México

Neogen Latinoamérica

+52 (55) 5254-8235

informacion@neogenlac.com

www.neogenlac.com

Brasil

Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogendobrasil.com.br

China

Neogen Bio-Scientific Technology

Tel: +86 21 6271 7013

info@neogenchina.com.cn

www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582

info@neogenindia.com

www.neogenindia.com