

# GlutenTox<sup>®</sup>•Pro

Sada na detekci lepku v potravinách, nápojích a na pracovním povrchu



**REF** KIT3000 (KT-5660)

## Obsah

1. Určení .....	3
2. Úvod .....	3
3. Základ testu .....	3
4. Dodávané materiály (pro 25 testů) .....	4
5. Užitečné, ale nedodávané materiály .....	4
6. Podmínky skladování .....	4
7. Opatření .....	4
8. Varování a omezení .....	4
9. Testování potravin .....	5
9.1. Příprava a analýza vzorků .....	5
9.2. Interpretace výsledků .....	8
10. Testování povrchů .....	8
10.1. Příprava a analýza vzorků .....	8
10.2. Interpretace výsledků .....	9
11. Kontrola kvality .....	9
12. Analytické vlastnosti .....	9
12.1. Citlivost .....	9
12.2. Specificita .....	10
12.3. Interní validace .....	10
13. Duševní vlastnictví .....	10
14. Reference .....	10
Dodatek 1. Matrice validované podle protokolů AOAC Performance Tested Method (PTM) .....	11
Dodatek 2. Vzorky testované firmou Hygiena pro interní validaci GlutenTox® Pro .....	11

## 1. Určení

GlutenTox® Pro je rychlý a uživatelsky přívětivý test na detekci lepku\* v potravinách\*\* a na površích\*\*. Lepek je škodlivý pro osoby trpící celiakií. Tato souprava je určena pro potravinářský průmysl, komerční kuchyně a spotřebitele. Souprava umožňuje výběr různých detekčních limitních hladin lepku podle požadavků uživatele. Matrice potravin a povrchů ověřené AOAC jsou uvedené v Dodatku 1.

\* Není určeno na hydrolyzované zdroje lepku

\*\* Matrice validované podle protokolů AOAC Performance Tested Methods (PTM):

- Potravinové matrice: Rýžová mouka, chléb, ovesné vločky, paštika a jogurt
- Environmentální povrchy: nerezová ocel, guma, plast, potravinářské lakované dřevo a keramika.

## 2. Úvod

Celiakie je porucha, která poškozuje tenké střevo a způsobuje atrofii střevních klků, která narušuje vstřebávání živin, jako jsou proteiny, lipidy, cukry, minerální soli a vitamíny. Toto onemocnění je způsobeno nepřiměřenou odpovědí imunitního systému na lepek (směs bílkovin nacházejících se v obilovinách) z pšenice, ječmene, žita a v menší míře z ovsa [ref. 1 a 2], což vede k průjmům, nedostatku vitamínů a minerálů, anémii a tenkým kostem (osteoporóza). Celiakie postihuje lidi všech věkových skupin.

V současné době je jedinou léčbou pacientů s celiakií přísná celoživotní bezlepková strava, která představuje velké potíže, protože lepek se kromě toho, že je přítomen v mnoha potravinách, nachází také v potravinářských přídatných látkách a konzervantech.

Podle Komise Codex Alimentarius (CAC) a nařízení ES 41/2009 o složení a označování potravin vhodných pro osoby trpící nesnášenlivostí lepku, lze potravinu považovat za „bezlepkovou“, pokud obsah lepku nepřesahuje 20 ppm (dílů na milion)\*.

\* Miligramy lepku na kilogram potravin.

## 3. Základ testu

GlutenTox® Pro je imunochromatografický test (laterální průtokový test) pro detekci lepku v potravinách s různým složením a úrovní zpracování, od surovin po zpracované potraviny. Kromě toho lze GlutenTox® Pro použít ke kontrole čistoty kritických zón v potravinářské výrobě pomocí analýzy povrchů, což je předpokladem pro zabránění riziku křížové kontaminace v konečném produktu.

Test se skládá z fáze extrakce pomocí jednoduchého postupu, který je společný pro všechny typy potravin. Krok detekce je pak založen na reakci 33mer imunotoxických peptidů glutenu ve vzorku s barevnými konjugáty (monoklonální protilátka anti-gliadin 33mer / červeně zbarvené mikrosféry) předem fixovanými na proužku [ref. 3 a 4]. Tento komplex postupuje kapilární silou proužkem vzhůru. Pokud je výsledek kladný, objeví se ve výsledkové oblasti proužku ČERVENÁ čára. Absence ČERVENÉ čáry znamená negativní výsledek. Bez ohledu na to, zda je přítomen lepek, pohybuje se směs konjugátu proužkem nahoru do kontrolní oblasti, kde, pokud byl test řádně proveden, se objeví MODRÁ čára (kontrolní čára) v důsledku nahromadění obsažených modrých mikrosfér.

Tyto rychlé testy jsou zvláště užitečné při rutinním monitorování lepku, aby se zajistilo, že výrobky vyhovují nastavenému systému HACCP, a aby se zajistilo jejich správné označování. Testy umožňují také rychlá rozhodnutí a nápravná opatření v případě, že ve výrobním řetězci existuje riziko kontaminace.

## 4. Dodávané materiály (pro 25 testů)

- GlutenTox® Pro stick (25x) v ochranné tubě
- Plastová pipeta (50x)
- Jednorázové plastové lžičky (25x)
- Lahvička s extrakčním roztokem se **žlutým uzávěrem** (25x)
- Lahvička s ředícím roztokem s **modrým uzávěrem** (25x)
- Návod k použití

## 5. Užitečné, ale nedodávané materiály

- Třecí miska nebo jiné nástroje na rozmělnění vzorku
- Jednorázové rukavice bez prášku (non-powdered)
- Váhy (přesnost 0,1 g)
- Alkohol (ethanol)
- Hodiny (nejlépe stopky)

## 6. Podmínky skladování

Výrobek musí být skladován při teplotě v rozmezí 15 - 25 ° C (59 - 77 ° F) během doby použitelnosti sady. Pro dosažení optimálního výkonu testu musí být produkt skladován v původním obalu a musí být použit před datem expirace, které je vytištěno na tubě s detekčními proužky.

**VAROVÁNÍ:** Tuba s detekčními proužky by se neměla otevírat dříve, než začne být používána. Všechny součásti soupravy je možné likvidovat do běžného, resp. recyklovatelného, odpadu.

## 7. Opatření

- Aby se zabránilo kontaminaci, která ruší analýzu, doporučuje se používat bezpráškové jednorázové rukavice. Pokud nemáte rukavice na jedno použití, před použitím testu si důkladně umyjte ruce.
- Po vyjmutí proužku GlutenTox® Pro z tuby je třeba jej použít co nejdříve za přísného dodržování čistoty. Tubu ihned uzavřete.
- Po uplynutí doby expirace nepoužívejte žádný materiál ze soupravy.
- Žádný roztok ze soupravy nepijte (extrakční roztok obsahuje alkohol [ethanol]).
- Uchovávejte mimo dosah dětí.

## 8. Varování a omezení

- U některých typů vzorků může být lepek extrahován s nižší účinností, a proto se doporučuje pracovat za podmínek maximální citlivosti (10 kapek extraktu do zředovací lahvičky s modrým uzávěrem), aby se zajistil detekční limit alespoň 10 ppm. Jedná se o následující vzorky:
  - Potraviny s obsahem surovin (až do 70%), které mají vysoké koncentrace polyfenolů nebo tříslovin (např. čokoláda, černý čaj, káva, víno, bobule, luštěniny jako cizrna nebo čočka atd.)
  - Vzorky s antioxidanty, jako jsou vitaminy A, E a C.
  - Potraviny tepelně ošetřené při teplotách vyšších než 180 ° C.
- V extenzivně hydrolyzovaných maticích, jako je pivo, sirupy nebo kvásky, by mohl být obsah lepku ve vzorku podceňován.

## DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

V těchto případech bylo zjištěno, že je stále detekováno nejméně 50% celkového obsahu lepku přítomného ve vzorku. Proto, pokud je negativní výsledek dosažen zpracováním za podmínek maximální citlivosti (s 10 kapkami), lze zajistit, že materiál obsahuje méně než 10 ppm lepku, a proto jej lze považovat za „bezlepkový“ a vhodný pro celiaky v souladu s platnými předpisy.

- V některých vzorcích potravin s velmi vysokým obsahem polyfenolů a tříslovin, tj. potravin, ve kterých hlavní složkou (> 70%) je čokoláda, černý čaj, káva, víno, bobule, luštěniny jako cizrna nebo čočka atd., může být proces extrakce nedostatečný, a proto může dojít k podhodnocení množství lepku ve vzorku. V těchto případech se doporučuje použít testy GlutenTox® Sticks Plus\*.
- Vzorky typu želé může být obtížné analyzovat kvůli husté pastě vytvořené při smíchání s extrakčním roztokem dodávaným v testovací soupravě GlutenTox® Pro. Zeptejte se svého dodavatele na řešení.

\* Pro více informací kontaktujte svého dodavatele.

## 9. Testování potravin

### 9.1. Příprava a analýza vzorků

#### DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

**Před použitím soupravy očistěte použité nádoby a všechny povrchy, se kterými se vzorek dostane do kontaktu, mýdlem a vodou a dobře opláchněte. Po vyčištění se důrazně doporučuje otřít je čistým hadříkem navlhčeným v alkoholu.**

**Materiály obsažené v soupravě jsou připraveny k použití a mohou být po použití zlikvidovány.**

**9.1.1.** Je-li vzorek kapalný, před odběrem vzorku jej důkladně protřepejte, aby byl zcela homogenní.

Pokud je vzorek polotekutý nebo těstovitý, pomocí párátko nebo čisté lžice jej promíchejte, abyste dosáhli homogenní směsi.

Pokud je vzorek pevný, rozemelte jej co nejvíce pomocí třecí misky nebo kuchyňského mlýnku / mlýnku na maso (musí být dokonale čistý). Pokud je vzorek příliš tvrdý (bonbóny, nugát atd.), nakrájejte ho nejprve nožem nebo rozdrťte např. malým kladívkem, aby bylo dosaženo účinného rozemletí.





#### DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

**Pokud má potravinu několik částí, nezapomeňte odebrat reprezentativní vzorek každé z nich a poté připravit výsledný homogenní vzorek. Pokud to neuděláte a lepek byl v jídle distribuován nerovnoměrně, mohli byste dostat falešně negativní výsledek.**

**9.1.2.** Použijte dodanou lžici se zarovnaným množstvím vzorku podle tabulky 1 nebo pokud máte k dispozici vhodnou váhu, navažte 1 gram vzorku<sup>(1)</sup>. Je-li vzorek tekutý, použijte jednu zarovnanou lžičku nebo odeberte 1 mililitr kapaliny.

<sup>(1)</sup> Použití váhy zvyšuje přesnost analýzy.

**Tabulka 1. Množství vzorku v závislosti na druhu potraviny**

Typ matrice	Příklady	Zarovnané lžičky
Mouky, jemné prášky	Kukuřičná mouka, rýžová mouka*, sušené mléko, koření, ovesné vločky*	
Jemná drobtovitá struktura	Chléb*, sušenky, dorty, snacky atd.	
Tekutiny a omáčky	Voda, oplachová voda, mléko, džus, kondenzované mléko, jogurt*, polévka, šťáva, omáčka, krém atd.	
Maso, ryby a uzené maso	Maso, ryby, klobásy, jelita, paštika*, konzervované maso a ryby atd.	

\* Potravinové matrice validované AOAC.

- 9.1.3.** Otevřete jednu extrakční lahvičku se žlutým uzávěrem. Přidejte do ní obsah lžice, 1 gram nebo 1 mililitr vzorku.
- 9.1.4.** Lahvičku uzavřete, důkladně energicky třepejte alespoň 2 minuty a poté nechejte asi 5 minut usadit, aby veškerá pevná látka sedla na dno. Potřebná doba usazování bude záviset na typu vzorku.
- 9.1.5.** Otevřete jednu zředovací lahvičku s modrým uzávěrem. Z extrakční lahvičky se žlutým uzávěrem odeberte pomocí jednorázové plastové pipety přibližně 1 ml extrahovaného vzorku. Do zředovací lahvičky s modrým uzávěrem přidejte 10, 4, 2 nebo 1 kapky extrahovaného roztoku podle požadovaného limitu detekce (viz tabulka 2).

Jemně míchejte alespoň 15 vteřin.

Tabulka 2

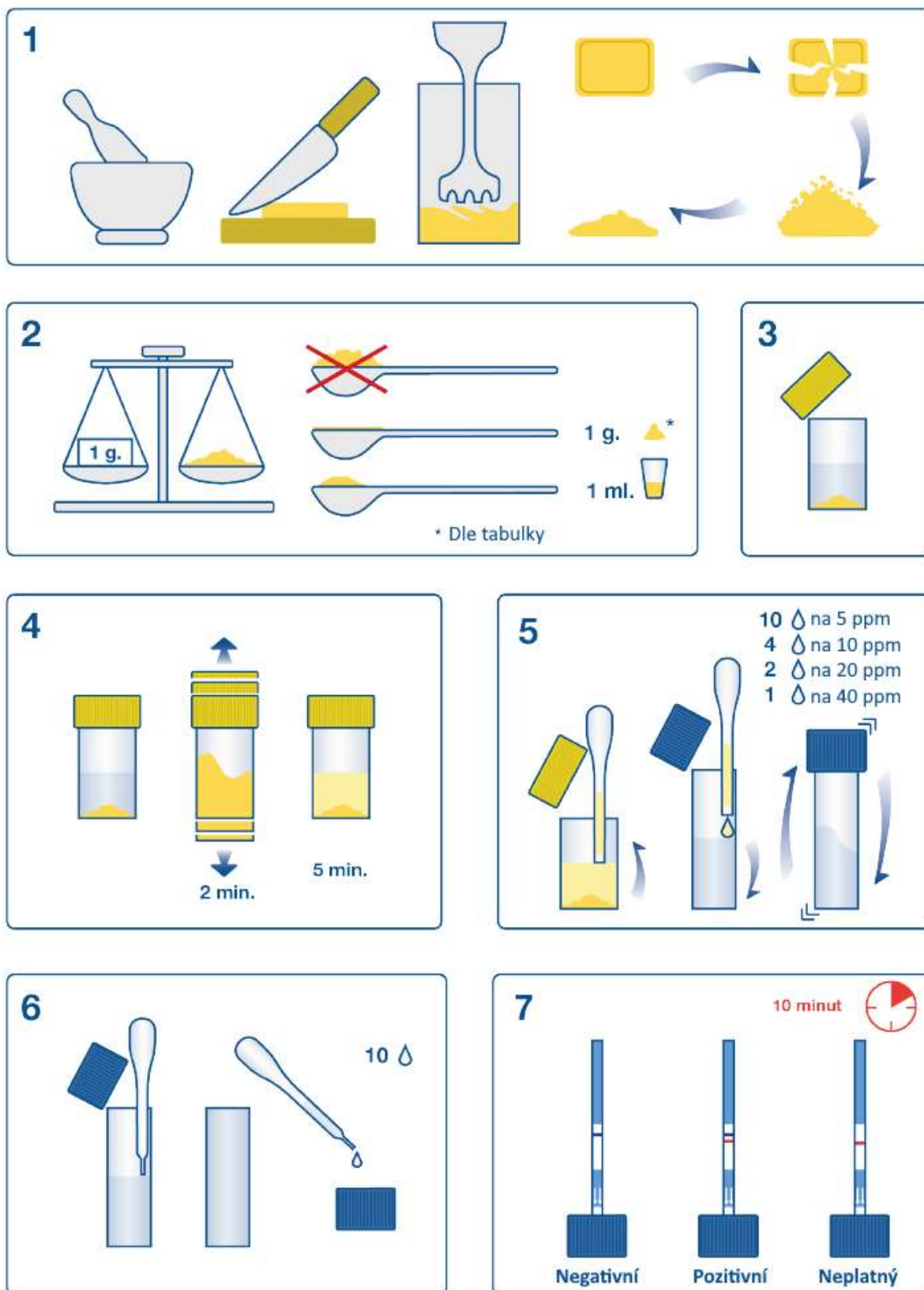
Počet kapek	Detekční limit
10	5 ppm
4	10 ppm
2	20 ppm
1	40 ppm

- 9.1.6.** Lahvičku s modrým víčkem opět otevřete a položte si převrácené víčko na čistý povrch. Pomocí nové jednorázové plastové pipety z ní nadávkujte 10 kapek do jejího modrého víčka. Detekční proužek ponořte vatovým koncem do kapaliny v modrém víčku, dokud se veškerá tekutina nevstřebá. Proužek nechejte stát v modrém víčku.
- 9.1.7. Počkejte 10 minut**, abyste viděli konečný výsledek (pokud je vysoká koncentrace lepku, může se výsledek objevit i za méně než 1–2 minuty).

#### **DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!**

**Počkejte 10 minut a odečtěte výsledek. Nenechávejte test déle, než je uvedeno, protože výsledky se pak mohou lišit.**

Obrázek 1. Příprava a analýza vzorků.



## 9.2. Interpretace výsledků

**Negativní:** Ve střední části proužku (výsledková zóna) se objeví jedna MODRÁ čára (kontrolní čára).

**Pozitivní:** Kromě kontrolní čáry (MODRÉ) se ve výsledkové zóně objeví ČERVENÁ čára (výsledková čára). Intenzita červené čáry ve výsledkové zóně se bude lišit v závislosti na koncentraci lepku přítomného ve vzorku.

Prahová hodnota detekce závisí na počtu kapek (10, 4, 2 nebo 1 kapka) přidávaných do zředovací lahvičky s modrým uzávěrem v kroku 9.1.5. (viz tabulka 3).

Tabulka 3. Interpretace výsledků<sup>(2)</sup>

		Detekční limit			
		10 kapek	4 kapky	2 kapky	1 kapka
Výsledek testu	Pozitivní	> 5 ppm	> 10 ppm	> 20 ppm	> 40 ppm
	Negativní	< 5 ppm	< 10 ppm	< 20 ppm	< 40 ppm

<sup>(2)</sup> Výsledky jsou kvalitativní pro limit detekce.

**Neplatný:** Kontrolní čára (MODRÁ) se neobjeví. V tomto případě není důležité, zda se objeví výsledková čára (ČERVENÁ). Nejběžnější příčiny vzniku neplatného výsledku jsou: nedostatečné množství vzorku následkem nesprávného postupu nebo poškození reagensů. V případě neplatných výsledků je nutné experiment zopakovat s novým testem vždy podle správného postupu. Pokud problém přetrvává, musíte kontaktovat dodavatele a test přestat používat.

Test je pro účely screeningu. Pozitivní výsledek může vyžadovat potvrzení nebo další testování.

## 10. Testování povrchů

### 10.1. Příprava a analýza vzorků

**10.1.1.** Vatovým koncem detekčního proužku proveďte stěr povrchu o ploše nejméně 16 cm<sup>2</sup> nebo v linii dlouhé 40 cm. Oblast vybraná pro stěr musí být reprezentativní pro celý kontrolovaný povrch.

**10.1.2.** Otevřete zředovací lahvičku s modrým uzávěrem a položte si převrácené víčko na čistý povrch. Použijte novou jednorázovou plastovou pipetu a nadávkujte 10 kapek z ředící lahvičky do jejího modrého uzávěru. Detekční proužek ponořte vatovým koncem do kapaliny v modrém víčku, dokud se veškerá tekutina nevstřebá. Proužek nechte stát v modrém víčku.

**10.1.3. Počkejte 10 minut,** abyste viděli konečný výsledek (pokud je vysoká koncentrace lepku, může se výsledek objevit i za méně než 1–2 minuty).

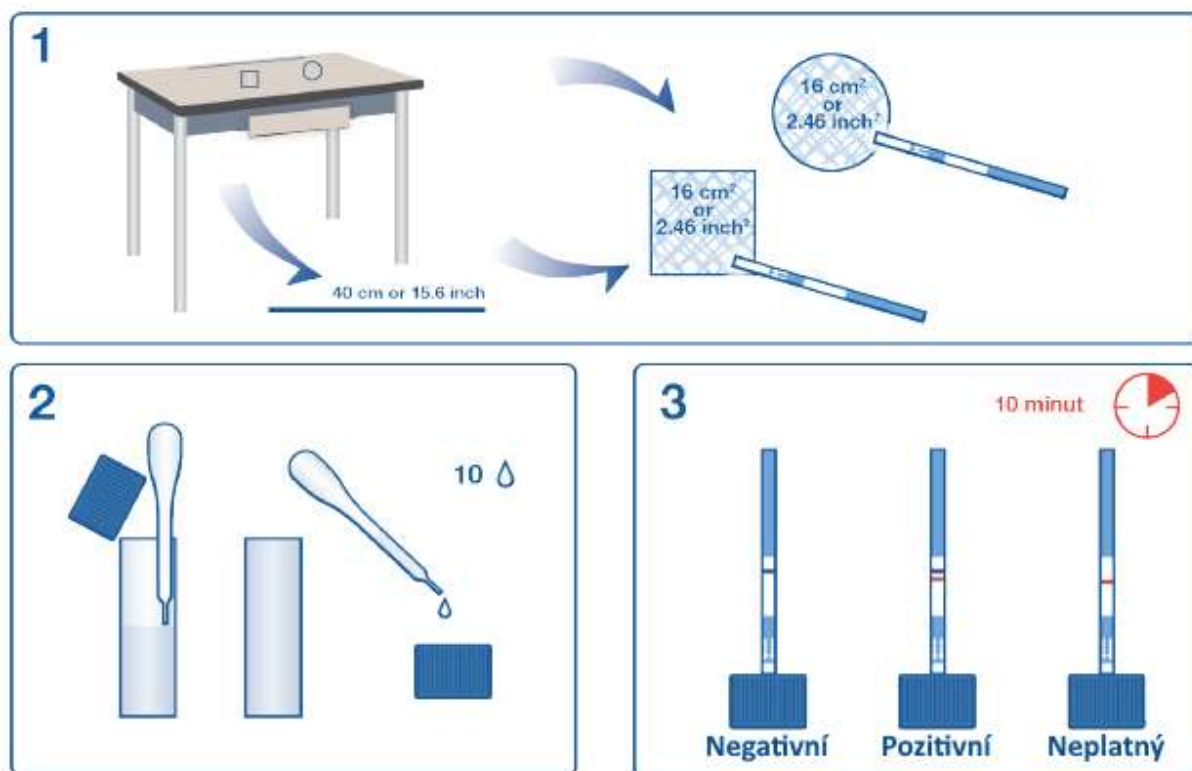
**POZNÁMKA! Environmentální povrchy schválené AOAC jsou uvedeny v Dodatku 1.**

#### **DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!**

**Počkejte 10 minut a odečtěte výsledek. Nenechávejte test déle, než je uvedeno, protože výsledky se pak mohou lišit.**



Obrázek 2. Postup analýzy povrchů



## 10.2. Interpretace výsledků

**Negativní:** Ve střední části proužku (výsledková zóna) se objeví jedna MODRÁ čára (kontrolní čára).

**Pozitivní:** Kromě kontrolní čárky (MODRÉ) se ve výsledkové zóně objeví ČERVENÁ čára (výsledková čára). Intenzita červené čáry ve výsledkové zóně se bude lišit v závislosti na koncentraci lepku přítomného ve vzorku.

**Neplatný:** Kontrolní čára (MODRÁ) se neobjeví. V tomto případě není důležité, zda se objeví výsledková čára (ČERVENÁ). Platí stejné úvahy jako pro neplatný výsledek zkoušky v odstavci 9.2.

## 11. Kontrola kvality

Interní kontrola je součástí testu. Modrá čára, která se objeví na detekčním proužku, je vnitřní kontrolou testu, který zajišťuje, že je použit dostatečný objem vzorku a že je dodržen správný postup.

## 12. Analytické vlastnosti

### 12.1. Citlivost

#### Potraviny

Limit detekce testu je 5 ppm, při maximální citlivosti (10 kapek). Tento detekční limit je vždy dosažen v jednoduchých vzorcích, jako jsou suroviny, potraviny s malým stupněm zpracování a tepelně nezpracované potraviny. Vysoká citlivost testu je plně v souladu s pokyny Codex Alimentarius a nařízením (ES) 41/2009, které stanoví limit 20 ppm, aby bylo možné považovat potravinu za „bezlepkovou“ (gluten-free).

## Povrchy

Výsledek získaný testem ukazuje přítomnost nebo nepřítomnost lepku na analyzovaném povrchu; z principu jej nelze extrapolovat na žádnou hodnotu v ppm.

Pozitivní výsledky z povrchu o velikosti 16 cm<sup>2</sup> nebo čáry o délce 40 cm indikují detekci minimálně 10 ng/cm<sup>2</sup> lepku z povrchu [ref.5].

### 12.2. Specificita

Tento test může specificky detekovat přítomnost toxické frakce (33mer) prolaminů pšenice (gliadin), žita (secalin), ječmene (hordein) a také odrůd ovsa [ref.2] (avenin), které mohou být toxické, a proto škodlivé pro celiaky. Test navíc nebude křížově reagovat se vzorky obsahujícími rýži, kukuřici, sóju, pohanku, sezam, proso, teff, quinou a amaranth.

Poznámka: Pro odhad lepku ve vzorku tímto testem byl obsah prolaminu upraven vynásobením faktorem = 2.

### 12.3. Interní validace

Kromě potravinových matric a povrchů ověřených podle protokolů AOAC Performance Tested Method (PTM), uvedených v Dodatku 1, k zajištění schopnosti testu analyzovat širokou škálu vzorků různých typů (potraviny, nápoje, výrobky ústní hygieny), byly testovány různé komerční vzorky. Po analýze vzorků pomocí GlutenTox<sup>®</sup> Pro ve všech typech matric (viz Dodatek 2) byly výsledky uspokojivé a konzistentní s validovanou metodou pro Codex Alimentarius, což ukazuje, že test lze použít na široké škále vzorků.

## 13. Duševní vlastnictví

Imunoreagenty použité v této soupravě jsou komerčně využívány na základě výhradní licence pro biologický materiál od Španělské národní rady pro výzkum (CSIC).

## 14. Reference

1. SHAN L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-9.
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", Am. J. Clin. Nutr, 2008; 87:405-414.
4. MORÓN B., et al.; "Toward the Assessment of Food Toxicity for Celiac Patients: Characterization of Monoclonal Antibodies to a Main Immunogenic Gluten Peptide" PLoS ONE 2008; 3(5): e2294.
5. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

## Dodatek 1. Matrice validované podle protokolů AOAC Performance Tested Method (PTM)

Skupina	Testované vzorky
Potraviny	Rýžová mouka, chléb, ovesné vločky, paštika a jogurt
Environmentální povrchy	Nerezová ocel, pryž, plast, lakované dřevo pro potravinářské účely a uzavřená keramika

## Dodatek 2. Vzorky testované firmou Hygiene pro interní validaci GlutenTox® Pro

Skupina	Testované vzorky
Mouka a krupice	Kukuřičná mouka, předvařená kukuřičná mouka, kukuřičná krupice, rýžová mouka*, pohanková mouka, oves*
Mléčné produkty	Kravné mléko, mléko s rozpustnou vlákninou, mléko s obilovinami, přírodní nebo ochucený jogurt*, sýrová pomazánka, drcená sýrová směs
Pečené a obilné výrobky	Toast, chlebová tyčinka*, sušenky, čokoládové sušenky, Madeleine, dort, kukuřičné lupínky, těstoviny, kukuřičné lívance, rýžové koláče, špaldový dort, snacky
Masné výrobky	Mleté krůtí maso, mleté kuřecí maso, krůtí klobásy, paštika*, kuřecí nugety, vepřové klobásy, chorizo
Ryby	Treska a štikozubec
Zelenina	Směs salátu, smažená zelenina
Vývar, polévky, krémy a suché směsi	Zeleninový vývar, kuřecí rýžová polévka, dehydrovaná zeleninová polévka, polévkové kostky, zeleninová polévka, arašídové máslo
Omáčky, dresinky, koření a ochucovadla	Jogurtový salátový dresing, kečup, sójová omáčka, salátový dresink, česnekový prášek, paprikový prášek, smetana na vaření
Cukry	Práškový cukr
Hotová jídla	Masové kuličky v omáčce s hráškem, masové ravioli ve vaječném těstě, dušené fazole
Tuky	Olivový olej, slunečnicový olej, máslo, margarín, smetana
Kyselé potraviny	Rajčatová omáčka, vinný ocet, jablečný ocet, citronová šťáva
Nápoje a kapaliny	Voda, oplachová voda, mléko, ovocné džusy, sójové nápoje, rýžové nápoje, ovesné nápoje, nealkoholické nápoje
Výrobky pro ústní hygienu	Zubní pasta, ústní voda

\* Potravinové matrice validované AOAC.