

GlutenTox® SticksPlus for Reader

Sada na kvantifikaci lepku v potravinách a nápojích pomocí Hygiena Cube nebo
GlutenTox Reader

REF KIT3007 (KT-6476)

Obsah

1.	Určení	3
2.	Úvod	3
3.	Základ testu	3
4.	Dodávané materiály (pro 12 testů)	5
5.	Potřebné, ale nedodávané materiály	5
6.	Podmínky skladování	5
7.	Opatření.....	5
8.	Příprava vzorků (potravin, nápoje a jiné spotřební produkty)	6
8.1.	Pevné vzorky.....	6
8.2.	Kapalné vzorky.....	7
9.	Provedení testu s extrahovanými vzorky	7
10.	Použití Hygiena Cube.....	8
10.1.	Použití Hygiena Cube v režimu Stand-alone.....	8
10.2.	Použití Hygiena Cube v režimu vzdáleného měření	9
11.	Vizuální interpretace výsledků	9
12.	Kontrola kvality.....	10
13.	Analytické vlastnosti.....	10
14.	Duševní vlastnictví.....	12
15.	Reference	12
16.	Výrobce a dodavatel.....	12

1. Určení

GlutenTox Sticks Plus for Reader je rychlý imunochromatografický test pro kvantifikaci lepku, který je škodlivý pro pacienty s celiakií, a to v potravinách, nápojích a dalších výrobcích.

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 potraviny.

3. Základ testu

GlutenTox Sticks Plus for Reader je imunochromatografický test (laterální průtokový test) pro detekci lepku v potravinách s různým složením a úrovní zpracování, od surovin až po tepelně zpracované potraviny, nápoje a další výrobky.

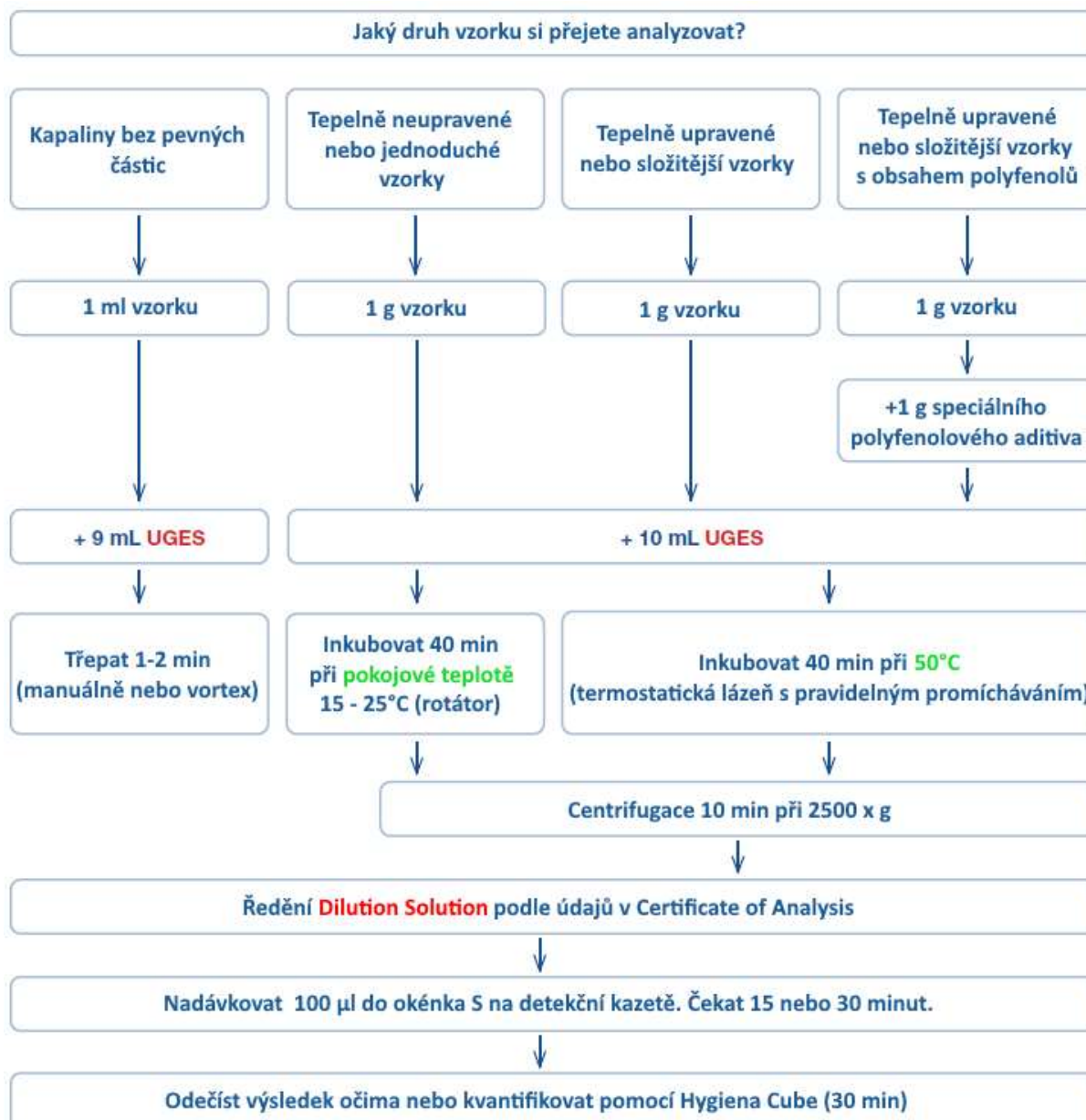
Test je založen na protilátce anti-gliadin G12, která specificky rozpoznává 33mer peptid, nejvíce imunogenní frakci lepku [ref. 3]. Tento rychlý test je užitečný při rutinním monitorování přítomnosti lepku, aby bylo zaručeno, že produkty splňují program analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP), a aby bylo zajištěno správné označení. Umožňuje také rychlá rozhodnutí a nápravná opatření v případě, že existuje riziko kontaminace ve výrobním řetězci.

Ve všech metodách používaných pro analýzu lepku v daném vzorku musí být lepek nejprve extrahován z matrice vzorku. Extrakce je jedním z nejkritičtějších bodů testovacího procesu. Extrakční roztok obsažený v této sadě, Universal Gluten Extraction Solution (UGES), je vhodný pro všechny typy potravin díky kombinaci denaturačních činidel, redukčních činidel a solubilizátorů.

Pro analýzu potravin obsahujících polyfenoly včetně tříslovin, jako je čokoláda, čaj, káva, víno, kukuřice nachová a kukuřičná vláknina, sója, lesní plody, luštěniny jako cizrna a čočka atd., je nutné použít speciální přísadu (**není součástí této sady, viz část 5**), která zabraňuje interferenci výše uvedených sloučenin v procesu extrakce (viz obrázek 1). Totéž platí v případě kosmetických přípravků s antioxidantními sloučeninami, jako jsou vitamíny A, C a E, karoteny, karotenoidy atd.

Po extrakci, během detekčního kroku, gluten přítomný ve vzorku nejprve reaguje s protilátkou anti-gliadin G12 [ref. 3] konjugované s červeně zbarvenými částicemi, které byly předtím umístěny na detekční proužek. Výsledné komplexy se kapilárním pohybem šíří detekčním proužkem a reagují s druhou anti-gliadinovou protilátkou, rovněž dříve imobilizovanou na proužku. Pokud je výsledek pozitivní, v testovací zóně (T) proužku se objeví ČERVENÁ čára. Absence ČERVENÉ čáry znamená

negativní výsledek. Bez ohledu na to, zda je nebo není přítomen lepek, se vzorek pohybuje tyčinkou až do kontrolní zóny (C), kde se, pokud byl test správně proveden, objeví ZELENÁ čára z důvodu akumulace zeleně zbarvených částic, které jsou také součástí proužku. Přítomnost této ZELENÉ čáry ukazuje, že: 1) objem vzorku byl dostatečný, 2) průtok vzorku byl přiměřený a 3) částice konjugátu zahrnuté v testu byly správně uvolněny. Pokud se ZELENÁ čára neobjeví, test by měl být považován za neplatný.



Tento test umožňuje dvě možnosti odečítání výsledků: vizuální nebo kvantitativní vyhodnocení pomocí Hygiene Cube nebo GlutenTox Reader. Hygiene Cube a GlutenTox Reader mají označení CE a jsou vyrobeny podle ISO 9001 a ISO 13485.

4. Dodávané materiály (pro 12 testů)

- GlutenTox kazety (12x)
- Extrakční roztok Universal Gluten Extraction Solution (UGES) (125 ml)
- Ředící roztok Dilution Solution (15 ml)
- Pozitivní kontrola (celozrnná ovesná mouka kontaminovaná lepkem, 10 g)
- Negativní kontrola (kukuřičná mouka, 10 g)
- RFID karta pro nastavení přístroje Hygiene Cube
- Návod k použití

5. Potřebné, ale nedodávané materiály

- Váhy (přesnost 0,1 g)
- Termostatická lázeň (není potřeba na tepelně neupravené vzorky s jednoduchou matricí)
- Centrifugační zkumavky s víčkem (>10 ml)
- Testovací zkumavky (1,5-2 ml)
- Centrifuga (volitelně)
- Pipety a jednorázové špičky
- Jednorázové rukavice
- Vortex míchadlo (volitelně)
- Hodiny/stopky
- Rotační míchadlo na zkumavky (rotátor)

Pro testování potravin obsahujících polyfenoly (včetně taninů) a kosmetických přípravků obsahujících antioxidanty si prosím pořídte Polyfenol pack (KIT3008). Tento balíček obsahuje:

- Speciální polyfenolové aditivum
- Pozitivní kontrola obsahující polyfenoly (kakaový prášek s lepkem, 10 g)
- Negativní kontrola obsahující polyfenoly (bezlepkový kakaový prášek, 10 g)

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- **Potraviny bohaté na polyfenoly nebo třísloviny jsou: čokoláda, čaj, káva, víno, fialová kukuřice a kukuřičná vláknina, sója, bobulovité ovoce, luštěniny jako cizrna a čočka atd.**

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- **Nejčastějšími antioxidanty v kosmetických přípravcích jsou vitamíny A, C a E, karoteny, karotenoidy atd.**

6. Podmínky skladování

Výrobek musí být skladován v původním obalu při teplotě v rozmezí 15 - 25 ° C (59 - 77 ° F) a spotřebován do vyznačeného data expirace.

VAROVÁNÍ: Obaly s detekčními proužky by se neměly otevírat dříve, než mají být použity. Nemrazit.

7. Opatření

- Pouze pro testování potravin, nápojů a dalších výrobků.
- Roztoky (kapaliny) ze soupravy nepolykejte.
- Nepoužívejte po uplynutí doby expirace.

- Doporučuje se používat nepudrované jednorázové rukavice.
- S kazetami pracujte v rukavicích nebo si pečlivě umyjte ruce. Nedotýkejte se zóny vzorku (S), aby nedošlo k náhodné kontaminaci stopami lepku.
- Je-li vzorek heterogenní (např. salát), odeberte reprezentativní část každé ingredience a smíchejte je dohromady, aby se vytvořil homogenní vzorek. Pokud to neuděláte a lepek ve vzorku bude nerovnoměrně rozložený, může to vést k falešně negativním výsledkům.

8. Příprava vzorků (potravin, nápoje a jiné spotřební produkty)

8.1. Pevné vzorky

1. Vzorek homogenizujte, umelte nebo nadrtíte
2. Navažte 1 g vzorku do testovací zkumavky

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- Pokud vzorek, pevný nebo kapalný, obsahuje polyfenoly, třísloviny (např. čokoládu) nebo antioxidanty, odvažte a přidejte do zkumavky 1 g speciální polyfenolové přísady (KIT3008) a důkladně promíchejte, aby se dosáhlo úplné homogenizace směsi.

3. Přidejte 10 ml Universal Gluten Extraction Solution (UGES). Zkumavku uzavřete a zhomogenizujte promícháním (například pomocí vortexového mixéru).
4. V závislosti na složitosti matrice vzorku a na tom, zda byl vzorek potravin zpracován teplem či nikoli, postupujte podle jedné ze 2 možností níže (viz obrázek 2):
 - a. Tepelně nezpracované vzorky s jednoduchým složením matrice:
Inkubujte vzorek při pokojové teplotě (15 - 25 °C) po dobu 40 minut v rotátoru
 - b. Tepelně zpracované vzorky a/nebo se složitým složením matrice:
Vzorek inkubujte při teplotě 50 °C ve vodní lázni po dobu 40 minut, zkumavku pravidelně protřepávejte překlápěním nebo pomocí vortexového mixéru.

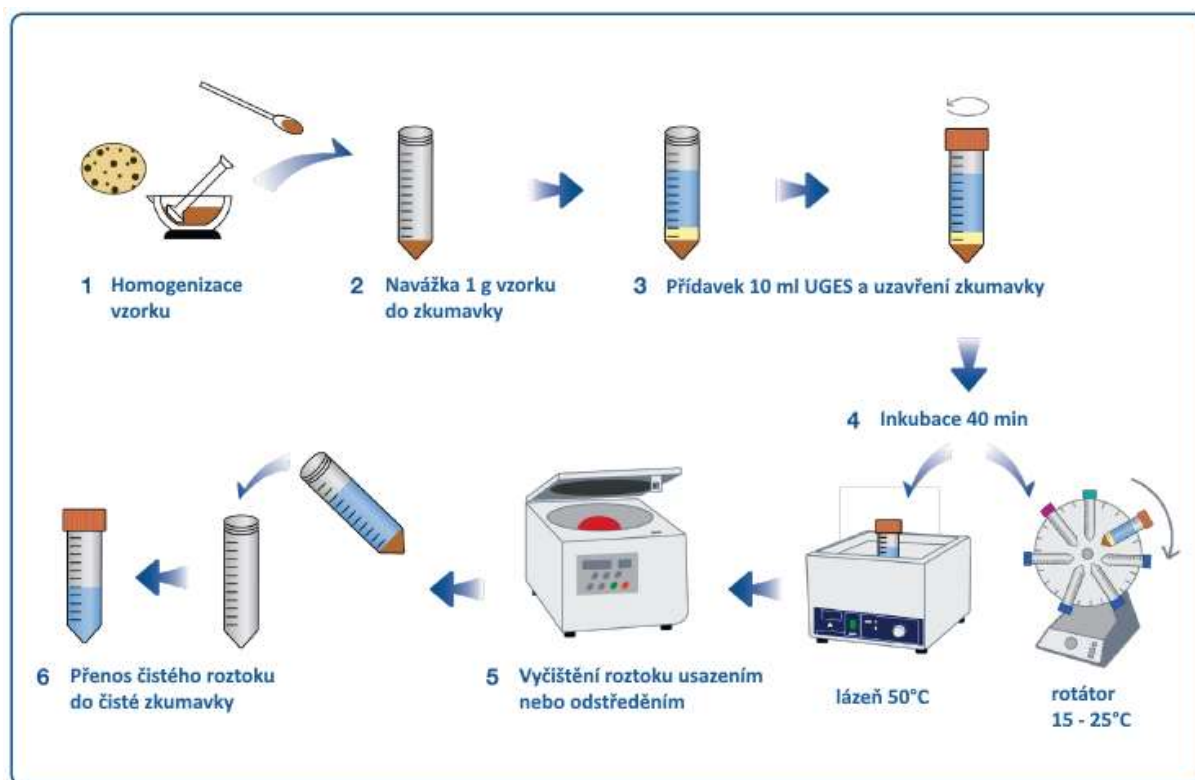
DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- Pokud je obtížné určit typ vzorku, doporučujeme zahřát na 50 °C (možnost b), aby se usnadnila extrakce.

5. Umožněte separaci pevných látek usazením nebo centrifugací (10 min při 2500 x g). Pevné částice vzorku mohou ovlivnit výsledky.
6. Čistý supernatant přeneste do čisté zkumavky.

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- Po extrakci musí být vzorky co nejrychleji analyzovány.



8.2. Kapalné vzorky

Tekuté vzorky jako mléko, džusy, nealko nápoje, organické nápoje (sójové, rýžové, ovesné, špaldové nápoje), piva a bujóny nevyžadují intenzivní extrakci. Z tohoto důvodu je dostatečné ruční protřepávání po dobu 1 nebo 2 minut a extrakty nevyžadují odstředění nebo usazení.

1. Nadávkuje 1 ml vzorku do zkumavky
2. Přidejte 9 ml Universal Gluten Extraction Solution (UGES) a pevně uzavřete víčko zkumavky

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- **Kapalné vzorky s polyfenoly, taniny nebo antioxidanty je nutné extrahovat podle bodu 8.1 Pevné vzorky.**

3. Vzorek protřepávejte 1-2 minuty ručně nebo pomocí vortexového mixéru

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- **Po extrakci musí být vzorky co nejrychleji analyzovány.**

9. Provedení testu s extrahovanými vzorky

1. Nechejte extrahované vzorky, kontroly, ředící roztok a kazety ohřát na pokojovou teplotu (15 - 25 °C).
2. Nařeďte extrahované vzorky Dilution Solution ve zkumavkách nebo lahvičkách. Vhodné ředění odpovídající šarži kazet GlutenTox lze nalézt v Certifikátu analýzy, který je součástí každé sady. K provedení testu stačí konečný objem 900-1000 µl.

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- **U vzorků s vysokým obsahem tuku se vyhněte odběru horní vrstvy, která obsahuje tuk.**

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

- Zředěné vzorky musí být analyzovány co nejrychleji a zbývající materiál by měl být zlikvidován.

3. Otevřete obal testovací kazety. Pokud chcete provést pozitivní a negativní kontroly, budete potřebovat jednu kazetu pro každou kontrolu.
4. Přidejte 100 µl naředěného vzorku nebo kontroly do vzorkové zóny (S) kazety.
5. Počkejte 15 minut a odečtěte výsledek na kazetě (viz část 11).
6. Pro kvantifikaci lepku ve vzorku počkejte alespoň 30 minut (ale ne déle než 2 hodiny) před analýzou kazety pomocí Hygiena Cube nebo GlutenTox Reader.

10. Použití Hygiena Cube



Přístroj je určen pro kvantifikaci obsahu lepku pomocí kazet GlutenTox Sticks. Kvantifikační potenciál soupravy se pohybuje od 1 ppm do 40 ppm lepku. Chcete-li kvantifikovat svůj vzorek, postupujte takto:

10.1. Použití Hygiena Cube v režimu Stand-alone

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

Před použitím si prosím pečlivě přečtěte návod k použití Hygiena Cube.

1. Zapněte zařízení krátkým stisknutím tlačítka (< 1 s). Na displeji se zobrazí "ON"
2. Nejméně 30 minut po přidání vzorku do kazety vložte test do adaptéru. Ujistěte se, že adaptér a test jsou správně umístěny.
3. Umístěte Hygiena Cube na adaptér a proveďte test. Ujistěte se, že je Cube správně umístěn.
4. Krátce stiskněte tlačítko. Na displeji se zobrazí „RFID TEST“. Přiložte RFID kartu specifickou pro šarži na horní část přístroje.
5. Na displeji se zobrazí "TEST". Krátce stiskněte tlačítko. Na displeji se zobrazí „RUN“.
6. Na displeji se zobrazí výsledek.
7. Krátkým stisknutím tlačítka se vrátíte ke kroku 1.

V tomto režimu nelze použít měření podle časovače.

10.2. Použití Hygiena Cube v režimu vzdáleného měření

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA!

Před použitím režimu vzdáleného měření Hygiena Cube si prosím pečlivě přečtete manuály Hygiena Cube a Hygiena Cube DataReader Software.

1. Zapněte zařízení krátkým stisknutím tlačítka (< 1 s). Na displeji se zobrazí „ON“.
2. Připojte jej k počítači pomocí dodaného kabelu USB.
3. Otevřete software Hygiena Cube DataReader. Zkontrolujte, zda je Hygiena Cube úspěšně připojen.
4. Nejméně 30 minut po přidání vzorku do kazety vložte test do adaptéru. Ujistěte se, že adaptér a test jsou správně umístěny.
5. Umístěte Hygiena Cube na adaptér a provedte test. Ujistěte se, že je Cube správně umístěn.
6. V programu klikněte na tlačítko „Start measurement“.
7. Zobrazí se okna v závislosti na dříve zvoleném nastavení.
8. Přiložte RFID kartu specifickou pro šarži na horní část přístroje a stiskněte "OK".
9. Měření se automaticky spustí.
10. Výsledky budou přidány do seznamu a bude zobrazen 2D objemový diagram.

V tomto režimu nelze použít měření podle časovače.

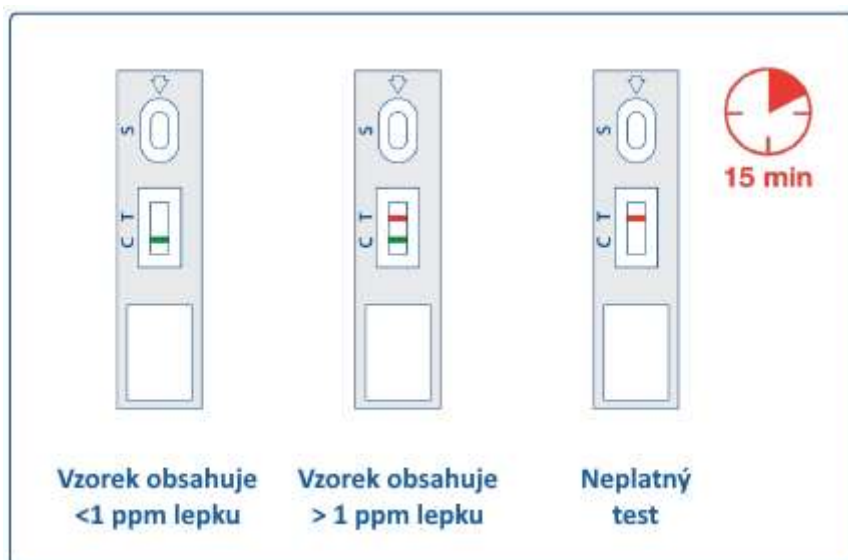
11. Vizuální interpretace výsledků

Pro kvantifikaci pomocí Hygiena Cube nebo GlutenTox Reader, viz část 10. Pro vizuální interpretaci výsledků stačí počkat 15 minut po přidání vzorku do kazety. Výsledkem může být:

NEGATIVNÍ: V kontrolní zóně (C) kazety se objeví jeden ZELENÁ čára (kontrolní čára). Vzorek obsahuje méně než 1 ppm lepku.

POZITIVNÍ: Kromě kontrolní čáry (ZELENÉ) se v testovací zóně (T) objeví ČERVENÁ čára. Vzorek obsahuje více než 1 ppm lepku a je kvantifikovatelný pomocí Hygiena Cube.

NEPLATNÉ: Kontrolní čára (ZELENÁ) se neukázala. Test je neplatný bez ohledu na to, zda se testovací čára (ČERVENÁ) zobrazuje či nikoli. Nejčastějšími příčinami výskytu neplatného výsledku je přidání nedostatečného objemu vzorku (<100 µl) do kazety, provedením nesprávného postupu nebo poškozením reagentů soupravy. V případě neplatného výsledku je nutné revidovat postup a opakovat experiment s novou kazetou. Pokud problém přetrvává, kontaktujte prosím svého dodavatele.



12. Kontrola kvality

Součástí testu je interní procesní kontrola kvality. Zelená čára v kontrolní zóně (C) je vestavěná funkce, která indikuje dostatečný objem a správný průtok vzorku se správným uvolňováním částic konjugátu. Kromě toho sada obsahuje pozitivní a negativní kontroly, které lze použít podle pokynů v bodě 8.1.2 a dále k potvrzení správného provedení testu; tyto kontrolní materiály musí poskytovat jasné pozitivní a negativní výsledky, pokud byl zkušební postup proveden správně.

13. Analytické vlastnosti

Pro charakterizaci hlavních analytických parametrů testu byly provedeny různé testy: citlivost a specifita.

Citlivost

Detekční limit GlutenTox Sticks Plus for Reader je 1 ppm lepku. Tato hodnota byla získána použitím různých roztoků o známých koncentracích gliadinu (jeden z proteinů lepku) v ředícím roztoku.

Specifita

Tento test může specificky detekovat přítomnost toxické frakce prolaminů pšenice (gliadin), žita (secalin), ječmene (hordein) a některých odrůd imunogenního ovsa (avenin), které proto mohou být škodlivé pro pacienty s celiakií [ref. 2]. Pokud však vzorky obsahují potraviny bezpečné pro celiakii, jako je rýže, kukuřice, sója, pohanka, sezam, proso, milička, quinoa a amarant, není pozorován žádný pozitivní signál.

Interní validace

Pro zajištění účinnosti testu se všemi druhy potravin a dalších materiálů, jako je kosmetika a produkty osobní péče, byla testována široká řada komerčních produktů. Po analýze vzorků pomocí GlutenTox Sticks ve všech typech testovaných matric (viz tabulka 1 a 2) byly výsledky uspokojivé a v souladu s obsahem lepku stanoveným schválenou metodou Codex Alimentarius.

Tabulka 1. Vzorky potravin validované na GlutenTox Sticks Plus

Skupina	Testované vzorky
Mouka a krupice	Kukuřičná mouka, předvařená kukuřičná mouka, kukuřičná krupice, rýžová mouka, pšeničná mouka, pohanková mouka
Mléčné produkty	Kravné mléko, mléko s rozpustnou vlákninou, mléko s cereáliemi, ochucený nebo přírodní jogurt, sýrová pomazánka, strouhaná sýrová směs
Pečené a cereální výrobky	Toasty, tyčinky, sušenky (Rich tea), čokoládové sušenky, Madeleine, dort, kukuřičné lupínky, těstoviny, kukuřičné palačinky, rýžové koláčky, špaldový koláč, svačiny
Masné výrobky	Mleté krůtí maso, mleté kuře, krůtí klobása, kuřecí nugety, vepřové klobásy, chorizo, paštika z vepřových jater
Produkty rybolovu	Treska a štikozubec
Zelenina	Směs hlávkového salátu, smažená zelenina
Vývar, polévky, krémy a suché směsi	Zeleninový vývar, kuřecí rýžová polévka, dehydratovaná zeleninová polévka, kostky na vývar, zeleninová polévka, arašídové máslo
Omáčky, dresinky, koření a dochucovadla	Jogurtový dresink, kečup, sojová omáčka, salátový dresink, česnekový prášek, paprikový prášek, smetana na vaření
Cukry	Glukózový sirup, moučkový cukr
Hotová jídla a pokrmy	Masové kuličky v omáčce s hráškem, masové ravioli ve vaječném těstě, fazolový guláš
Tučná jídla	Olivový olej, slunečnicový olej, máslo, margarín, smetana
Kyselé potraviny	Rajčatová omáčka, vinný ocet, jablečný ocet, citronová šťáva
Nápoje	Voda, mléko, ovocné šťávy, pivo, sójové nápoje, rýžové nápoje, ovesné nápoje, nealkoholické nápoje

Tabulka 2. Nepotravinové vzorky validované na GlutenTox Sticks Plus

Skupina	Testované vzorky
Produkty osobní péče	Koupelový gel, šampon, deodorant, zubní pasta, ústní voda
Kosmetika	Krémy (obličej, tělo a ruce), čisticí prostředek, balzám na rty
Jiné	Krmivo pro domácí mazlíčky (suché krmivo, mokré krmivo), čisticí prostředky, léky (tablety, kapsle a sirupy)

14. Duševní vlastnictví

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

15. 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.
5. SÍGLEZ M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

16. Výrobce a dodavatel



Hygiena International
8 Woodshots Meadow
Watford, Hertfordshire
WD18 8YU, UK
www.hygiena.com



SKA-TEC spol. s r.o.
Vánková 888/5
181 00 Praha 8 - Čimice
www.skatec.cz