

U.S. English

SKU #: 700002592

REF #: 8510

Veratox<sup>®</sup>

*for Gliadin R5*

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



# Veratox<sup>®</sup> for Gliadin R5

SKU #: 700002592 | REF #: 8510

## **Gliadin/Gluten**

Gliadins are a class of alcohol-soluble proteins 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 on the correct labeling of food to make appropriate, safe food choices. Testing for the presence of gluten components is a vital part of a food manufacturer's allergen control plan.

## **Intended Use**

Veratox<sup>®</sup> 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. The detection of wheat gluten in rice flour, cereal, bread, and cooked hamburger was validated by the AOAC Research Institute. Clean-in-place solutions and other foods were validated internally by Neogen<sup>®</sup>.

Veratox for Gliadin R5 has not been evaluated with all possible food products, food processes, or testing protocols, or with all possible sources of gliadin. Neogen has not documented this product for use in industries other than food and beverage. For example, Neogen has not documented Veratox for Gliadin R5 for testing in water, pharmaceuticals, or cosmetics. Do not use this product for the diagnosis of conditions in humans or animals.

## **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.

## **User Responsibility**

Users are responsible for familiarizing themselves with product instructions and information. Visit our website at [neogen.com](http://neogen.com) or contact your local Neogen representative or distributor for more information. As with all test methods used for food analysis, the test matrix can influence the results. When selecting a test method, it is important to recognize that external factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may influence results. The food sample itself may influence results. It is the user's responsibility in selecting any test method or product to evaluate a sufficient number of samples to satisfy the user that the chosen test method meets the user's criteria. It is also the user's responsibility to determine that any test methods and results meet its customers' and suppliers' requirements. As with any test method, results obtained from use of any Neogen product do not constitute a guarantee of the quality of the matrices or processes tested.

## 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. The detector antibody, which is a conjugated R5 antibody, is then added. The detector antibody binds to captured gliadin during another incubation period. Unbound enzyme-labeled antibody is washed away and a one-step substrate is added. The substrate is chemically altered by the enzyme and a blue color develops as a result. 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 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°C–8°C (35°F–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, 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 items 8515, 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 items 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 items 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 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°C–8°C (35°F–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°C–30°C, 64°F–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 6 or a combination of at least 5 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 improved detection of 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. Add 0.25 g sample into a 50 cc screw cap centrifuge tube.
  4. Add 2.5 mL of renaturing cocktail solution.
  5. If samples are of unknown composition or are known to contain buckwheat, chestnut flour, or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs, or fruits, add 1 level scoop of extraction additive. If sample being tested is known not to contain the above ingredients, it is not necessary to use 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  $\mu$ 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.

- D. Extraction of heat-processed or unknown origin commodities (AOAC RI PTM™ #061201 method)  
 This procedure requires the gliadin renaturing cocktail solution (Neogen item 8515) described in method C. 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. Add 1 g sample into a 50 cc screw cap centrifuge tube.
  4. Add 10 mL of renaturing cocktail solution.
  5. If samples are of unknown composition or are known to contain buckwheat, chestnut flour, or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs, or fruits, add 1 level scoop of extraction additive. If sample being tested is known not to contain the above ingredients, it is not necessary to use 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 30 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 µL 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°C–30°C, 64°F–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-marked 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°C–30°C, 64°F–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°C–30°C, 64°F–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°C–30°C, 64°F–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 (LOQ) in ppm gliadin: From AOAC validation: Rice flour, 1.04 ppm; soy flour, 0.95 ppm; cooked hamburger, 1.9 ppm; oat cereal, 0.2 ppm; cornbread (bread), 0.65 ppm. 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 (LOD) in ppm gliadin: From AOAC validation: Rice flour, 0.35 ppm; soy flour, 0.31 ppm; cooked hamburger, 0.63 ppm; oat cereal, 0.07 ppm; cornbread, 0.21 ppm. 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 gliadin. (For quantitating samples above 40 ppm, contact a Neogen representative for dilution instructions).

## Customer Service

Neogen Customer and Technical Services can be contacted through [neogen.com](http://neogen.com) and product training is available by request.

## Safety Data Sheets (SDS) Information Available

SDS are available for all test kits at [neogen.com](http://neogen.com) or by calling 800.234.5333 or 517.372.9200.

## Terms and Conditions

Neogen's full terms and conditions are available [online](#).

## Warranty

Neogen 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.

**neogen.com**

N.º de SKU: 700002592

N.º de REF.: 8510

 **Veratox**<sup>®</sup>

*para Gliadin R5*

Refrigerar a 2-8 °C (35-46 °F). No se debe congelar.





# Veratox<sup>®</sup> para Gliadin R5

N.º de SKU: 700002592 | N.º de REF.: 8510

## Gliadina/gluten

Las gliadinas son una clase de proteínas solubles en alcohol que se encuentran en el trigo y que pertenecen 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 importantes en una serie de trastornos, incluida la alergia al trigo y la intolerancia al gluten (enfermedad celíaca). La alergia al trigo es una respuesta inmunitaria específica a una serie de proteínas del trigo, como la gliadina, la albúmina, la globulina y la glutenina. La enfermedad celíaca es una reacción crónica a las proteínas del gluten que provoca una mala absorción de nutrientes en el intestino delgado.

Aquellos que deben evitar el gluten confían en el etiquetado correcto de los alimentos para tomar decisiones alimentarias adecuadas y seguras. Las pruebas para detectar la presencia de componentes de gluten son una parte vital del plan de control de alérgenos de un fabricante de alimentos.

## Uso previsto

Veratox<sup>®</sup> para Gliadina R5 está diseñado para el análisis cuantitativo de ingredientes, soluciones de limpieza in situ y productos alimenticios acabados destinados a no contener gluten para detectar la presencia de gliadina y prolaminas presentes en el trigo, la cebada y el centeno. La detección de gluten de trigo en harina de arroz, cereales, pan y hamburguesas cocidas fue validada por el Instituto de Investigación de la AOAC. Neogen<sup>®</sup> validó internamente las soluciones de limpieza in situ y otros alimentos.

Veratox para gliadina R5 no se ha evaluado con todos los posibles productos alimenticios, procesos alimentarios o protocolos de prueba, ni con todas las fuentes posibles de gliadina. Neogen no ha documentado este producto para usarse en otras industrias que no sean de alimentos y bebidas. Por ejemplo, Neogen no ha documentado Veratox para gliadina R5 para pruebas en agua, productos farmacéuticos o cosméticos. No utilice este producto para el diagnóstico de afecciones en humanos o animales.

## Usuario previsto

Este kit de prueba está diseñado para su uso por parte del personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con alimentos posiblemente contaminados con gliadina. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben realizar una capacitación dirigida por un representante de Neogen o alguien que haya completado con éxito dicha capacitación.

## Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones y la información del producto. Visite nuestro sitio web en [neogen.com](http://neogen.com) o póngase en contacto con su representante o distribuidor local de Neogen para obtener más información. Al igual que con todos los métodos de prueba utilizados para el análisis de alimentos, la matriz de prueba puede influir en los resultados. Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que hay factores externos como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de muestras, el manejo y la técnica de laboratorio que pueden influir en los resultados. La misma muestra de alimento puede influir en los resultados. Es responsabilidad del usuario, al seleccionar cualquier método de prueba o producto, evaluar un número suficiente de muestras para satisfacerlo de que el método de prueba elegido cumple con sus criterios. También es responsabilidad del usuario determinar que los métodos y resultados de las pruebas cumplen con los requisitos de sus clientes y proveedores. Al igual que con cualquier método de prueba, los resultados obtenidos del uso de cualquier producto de Neogen no constituyen una garantía de la calidad de las matrices o procesos probados.

## Principios del ensayo

La prueba gliadina R5 es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich. La gliadina se extrae de muestras con una solución de etanol al 60 % agitándola en un agitador o rotador. El extracto se diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las muestras diluidas se agregan a pocillos recubiertos de anticuerpos R5 (anticuerpos de captura), donde la gliadina se unirá al anticuerpo durante un período de incubación. A continuación, se añade el anticuerpo detector, que es un anticuerpo R5 conjugado. El anticuerpo detector se une a la gliadina capturada durante otro período de incubación. El anticuerpo marcado con enzimas no unido se elimina y se agrega un sustrato de un solo paso. El sustrato es alterado químicamente por la enzima y, como resultado, se desarrolla un color azul. Se agrega el reactivo de parada y se observa el color de la solución resultante. El azul indica que las muestras contienen altos niveles de gliadina, mientras que las muestras moradas o rojas 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 de gliadina en partes por millón (ppm).

## Requisitos de almacenamiento

El kit de prueba se puede usar hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C (35-46 °F).

## Materiales incluidos

1. 48 micropocillos recubiertos con anticuerpos
2. 48 pocillos de transferencia marcados con rojo
3. 6 frascos con etiqueta amarilla de controles de gliadina de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 ppm (5, 10, 20, 40 y 80 ng/ml de gliadina)
4. 2 frascos con etiquetas azules de conjugado de anticuerpo marcado con enzima
5. 1 frasco con etiqueta verde de sustrato K-Blue®
6. 1 frasco con etiqueta roja de solución Red Stop
7. 40 ml de reactivo de lavado PBS-Tween de 10 mm en un frasco de boca ancha; cada botella puede preparar 1 l en agua destilada o desionizada (pH 7,4)
8. 1 bolsa de aluminio, muestra de diluyente concentrado de 10 mm de polvo seco de PBS que contiene suficiente polvo para preparar 1 l de solución amortiguadora de dilución
9. 50 g de aditivo de extracción en dos recipientes para muestras
10. Cuchara de plástico para medir el aditivo de extracción

## Materiales recomendados, no suministrados

1. Rotador o agitador orbital para sostener tubos de centrifuga de 50 cc para una muestra de 1 g, o baño de agua agitador con abrazaderas ajustadas para contener botellas de extracción de 125 ml (4 oz) para una muestra de 2 g
2. Horno o baño de agua ajustable a 50 °C si se analizan muestras procesadas térmicamente
3. Báscula capaz de pesar  $0,25 \pm 0,01$  g si se utiliza una solución de cóctel de renaturalización de gliadina para analizar muestras procesadas térmicamente
4. Solución de cóctel de renaturalización de gliadina para muestras procesadas térmicamente (artículos Neogen 8515, 8515B)
5. Etanol de laboratorio (190 grados)
6. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (artículo 9303 de Neogen)
7. Pipeteador ajustable de 50 a 200  $\mu$ l (artículo 9276 de Neogen)
8. Pipeteador de 12 canales (artículo 9273 de Neogen)
9. Puntas de pipeta (artículos 9410, 9417 y 9407 de Neogen)
10. Dos botellas de 1 l para preparar la solución de lavado y la solución de dilución del extracto de la muestra (artículo Neogen 9472)
11. Tubos de ensayo para realizar la dilución del extracto de la muestra
12. Temporizador (artículos 8426 y 9452 de Neogen)
13. 3 reservorios de reactivos para pipeteador de 12 canales (artículo 9435 de Neogen)
14. Gradilla para micropocillos (artículo 9402 de Neogen)
15. Piseta de lavado (artículo 9400 de Neogen)

16. Toallas de papel desechables o de un material absorbente equivalente
17. Marcador impermeable
18. Agua destilada o desionizada
19. Centrifugador (opcional)
20. Vórtice (artículo Neogen 9494)

## Precauciones

1. La solución de etanol es altamente inflamable. Mantenga el envase herméticamente cerrado y alejado del calor, las chispas, las llamas expuestas y personas fumando. Es tóxico si se ingiere o si se inhalan los vapores. Evite el contacto con la piel.
2. Los componentes de gliadina R5, como los controles y aditivo de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alergénicos: Gluten, caseína 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 de los alimentos concentrados pueden causar interferencias con el método de prueba ELISA. Comuníquese con el servicio técnico de Neogen para obtener información actualizada de validación.
4. No se deben usar esponjas para la recolección de muestras ni para la detección de gliadina. Si usa hisopos que no sean de Neogen para recolectar las muestras, debe validarlos antes de usarlos. Las esponjas y los hisopos genéricos pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con los kits de prueba.
5. Almacene el kit a una temperatura de entre 2 y 8 °C (35-46 °F) cuando no lo utilice. No los congele y evite su almacenamiento prolongado a temperatura ambiente.
6. Permita que todos los componentes del kit alcancen una temperatura ambiente de entre 18 y 30 °C (64-86 °F) antes de usarlos.
7. No use los componentes del kit que hayan pasado de su fecha de vencimiento.
8. No mezcle los reactivos de un lote de kit con un número de serie con los reactivos de un lote diferente.
9. No use más de 24 pocillos por prueba.
10. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas (p. ej., cebar las puntas y usar puntas limpias).
11. Use solo tiempos de incubación especificados; otros puede generar resultados imprecisos.
12. Use puntas de pipeta y cristalería limpias para cada muestra a fin de evitar la contaminación cruzada. Lave completamente toda la cristalería entre una muestra y la siguiente.

## Notas de procedimiento

1. **Solución de dilución de extracto de muestra (PBS)**  
Prepare la solución de dilución del extracto agregando un sobre de papel aluminio de concentrado de dilución de muestra, PBS de 10 mm, a 1 l de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar bien.
2. **Controles**  
Con este kit se proporcionan seis controles. Neogen recomienda usar los 6 controles o una combinación de al menos 5 controles con cada ensayo. Esta combinación puede variar. Una combinación posible es eliminar el control de 2,5 ppm para obtener resultados en el rango de 5 a 40 ppm. Si es necesario, póngase en contacto con los Servicios Técnicos de Neogen para obtener más información sobre el uso de estos controles.
3. **Solución amortiguadora de lavado**  
Prepare la solución amortiguadora de lavado vertiendo el concentrado de la solución amortiguadora en un envase de 1 l. Añada 960 ml de agua destilada o desionizada. Revuelva para asegurar una mezcla completa.  
**Nota:** Cuando haya usado todo el kit de prueba, deseche las porciones sin usar de la solución de dilución del extracto y de la solución amortiguadora de lavado.
4. **Aditivo de extracción**  
Se debe utilizar con la cuchara suministrada con todas las muestras que utilicen el procedimiento de extracción A o B (muestras no procesadas térmicamente). Las muestras procesadas térmicamente (procedimiento C) solo deben utilizar el aditivo de extracción si las muestras contienen trigo sarraceno, harina de castaña o taninos/ compuestos fenólicos como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas.

5. **Sustrato**

El sustrato K-Blue está listo para usar. El sustrato debe ser color transparente o azul claro: deséchelo si se ha vuelto azul oscuro. Vierta solo el volumen necesario dentro del reservorio para reactivos. No vuelva a colocar en el frasco el sustrato que no haya utilizado. Cubra el reservorio para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.

6. **Pocillos de anticuerpo**

Mantenga los pocillos sellados en el sobre de papel aluminio hasta que los necesite. Retírelos del sobre solo después de extraer las muestras y cuando vaya a comenzar el procedimiento de 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 orbital o rotador

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 del extracto de la muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
2. Agregue 1 g de muestra molida, o 1 ml de muestra líquida, a un tubo limpio de 50 cc.
3. Agregue 1 cucharada rasa de aditivo de extracción al tubo.
4. Agregue 10 ml (9 ml para muestras líquidas) de etanol al 60 % al tubo, tape herméticamente, luego agite el tubo vigorosamente con la mano durante aproximadamente 1 minuto, o en vórtice durante 30 segundos, para asegurar una mezcla completa.
5. Extráigalo agitando (150 rpm) en un agitador orbital o rotador colocando el tubo de lado sobre la almohadilla plana del instrumento y sujetándolo firmemente con una banda elástica o cinta adhesiva. Gire o agite durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugue la muestra (si es necesario) durante 10 minutos a > 2500 g a temperatura ambiente.
7. Diluir cada muestra 1:50 extrayendo 100 µL de la capa superior del extracto y transfiriéndola a un pequeño tubo o vial que contenga 4,9 ml de solución de dilución del extracto de la muestra (PBS).
8. Para mezclar, agite el tubo durante 5 segundos.
9. Analice las muestras diluidas en las 2 a 3 horas siguientes a la extracción.

B. Extracción de muestras no procesadas térmicamente con agitador orbital o baño de agua 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 del extracto de la muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
2. Agregue 2 g de muestra molida, o 2 ml de muestra líquida, a un frasco de extracción limpio de 125 ml.
3. Agregue 1 cucharada rasa de aditivo de extracción al frasco.
4. Agregue 20 ml (18 ml para muestras líquidas) de etanol al 60 %, tape bien el frasco y luego agite vigorosamente con la mano durante unos 20 segundos para asegurar una mezcla completa.
5. Extraer agitando (150 rpm) en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente (un baño de agua con agitador puede funcionar, pero no encienda el fuego). Retire el frasco del agitador o del baño.
6. Centrifugue la muestra (si es necesario) durante 10 minutos a > 2500 g a temperatura ambiente.
7. Diluir cada muestra 1:50 extrayendo 100 µL de la capa superior del extracto y transfiriéndola a un pequeño tubo o vial que contenga 4,9 ml de solución de dilución del extracto de la muestra (PBS).
8. Para mezclar, agite el tubo durante 5 segundos.
9. Analice las muestras diluidas en las 2 a 3 horas siguientes a la extracción.

C. Extracción de materias primas tratadas térmicamente o de origen desconocido

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

1. Prepare una solución de extracción de etanol al 80 % combinando 8 partes de etanol con 2 partes de agua destilada.
2. Prepare la solución de dilución del extracto de la muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
3. Agregue 0.25 g de muestra en un tubo para centrifuga con tapón de rosca de 50 cc.
4. Añada 2.5 ml de solución cóctel renaturalizante.

5. Si las muestras son de composición desconocida o se sabe que contienen trigo sarraceno, harina de castaña o taninos/compuestos fenólicos como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas, añada 1 cucharada rasa de aditivo de extracción. Si se sabe que la muestra analizada no contiene los ingredientes mencionados, no es necesario utilizar aditivo.
  6. Tape y agite durante 30 segundos para homogeneizar el cóctel y la muestra.
  7. Incube 40 minutos a 50 °C (baño de agua u horno).
  8. Retire las muestras y deje enfriar durante 5 a 10 minutos.
  9. Añada 7.5 ml de etanol al 80 % y agite de nuevo durante 10 a 20 segundos.
  10. Agite (150 a 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 > 2500 g a temperatura ambiente.
  12. Diluya la muestra 1:12,5 en PBS (200 µL de muestra en 2,3 ml de PBS).
  13. Para mezclar, agite el tubo durante 5 segundos.
  14. Analice las muestras diluidas en las 2 a 3 horas siguientes a la extracción.
- D. Extracción de materias primas tratadas térmicamente o de origen desconocido (método AOAC RI PTM™ #061201)  
Este procedimiento requiere la solución de cóctel de renaturalización de gliadina (Neogen artículo 8515) descrita en el método C. Para extraer gliadina de muestras procesadas térmicamente:
1. Prepare una solución de extracción de etanol al 80 % combinando 8 partes de etanol con 2 partes de agua destilada.
  2. Prepare la solución de dilución del extracto de la muestra (PBS) como se detalla en la nota de procedimiento 1.
  3. Agregue 1 g de muestra en un tubo para centrifuga con tapón de rosca de 50 cc.
  4. Añada 10 ml de solución cóctel renaturalizante.
  5. Si las muestras son de composición desconocida o se sabe que contienen trigo sarraceno, harina de castaña o taninos/compuestos fenólicos como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas, añada 1 cucharada rasa de aditivo de extracción. Si se sabe que la muestra analizada no contiene los ingredientes mencionados, no es necesario utilizar aditivo.
  6. Tape y agite durante 30 segundos para homogeneizar el cóctel y la muestra.
  7. Incube 40 minutos a 50 °C (baño de agua u horno).
  8. Retire las muestras y deje enfriar durante 5 a 10 minutos.
  9. Añada 30 ml de etanol al 80 % y agite de nuevo durante 10 a 20 segundos.
  10. Agite (150 a 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 > 2500 g a temperatura ambiente.
  12. Diluya la muestra 1:12,5 en PBS (200 µL de muestra en 2,3 ml de PBS).
  13. Para mezclar, agite el tubo durante 5 segundos.
  14. Analice las muestras diluidas en las 2 a 3 horas siguientes a la extracción.

## Procedimiento de prueba

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

1. Retire 1 pocillo de mezcla marcado con rojo para cada muestra que se debe analizar y 1 pocillo marcado con rojo para cada control. Luego, colóquelos en la gradilla.
2. Retire la misma cantidad de pocillos recubiertos con anticuerpos. Vuelva a colocar los pocillos de anticuerpos que no se usarán en la bolsa de aluminio con desecante de inmediato. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio para proteger el anticuerpo. Marque un extremo de la tira con un "1" y colóquela en la gradilla para pocillos con el extremo marcado a la izquierda.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo el frasco antes de usarlo.
4. Los controles (véase la nota de procedimiento 2) se suministran listos para su uso, no diluir. Usando una punta de pipeta nueva cada vez, transfiera 150 µL de los controles y las muestras diluidas a los pocillos de mezcla marcados con rojo, como se muestra en una de las plantillas a continuación. Use solo hasta dos tiras de 12 pocillos a la vez. Si usa los 6 controles para un rango de 2.5 a 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 usa los 5 controles para un rango de 5 a 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 en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µl de los controles y de extractos de muestras a los pocillos recubiertos con anticuerpos. Mezcle durante 20 segundos deslizando la gradilla hacia atrás y hacia delante sobre una superficie plana.
- Incube los micropocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente, entre 18 y 30 °C (64-86 °F). Deseche los pocillos de transferencia marcados con rojo.
- Vacíe el contenido de los pocillos en un fregadero. Con una piseta de lavado, llene bien cada pocillo con la solución amortiguadora de lavado y luego vacíelos. Repita el lavado 5 veces, luego voltee los micropocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel hasta eliminar toda la solución de lavado.
- Vierta el volumen necesario del conjugado del frasco con etiqueta azul en un reservorio limpio para reactivo.
- Con un pipeteador de 12 canales y puntas nuevas, transfiera 100 µl del conjugado en todos los pocillos y mezcle durante 20 segundos deslizando la gradilla hacia atrás y hacia delante sobre una superficie plana.
- Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente, entre 18 y 30 °C (64-86 °F).
- Lave todos los pocillos con la solución amortiguadora de lavado como se describe en el paso 7.
- Vierta el volumen necesario de solución de sustrato del frasco con etiqueta verde en un reservorio limpio para reactivo.
- Coloque puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales, transfiera 100 µl de sustrato a cada pocillo y mezcle durante 20 segundos. No quite las puntas.
- Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente, entre 18 y 30 °C (64-86 °F).
- Vierta el volumen necesario de la solución Red Stop del frasco con etiqueta roja en un reservorio limpio para reactivo.
- Con las mismas puntas que usó para dispensar el sustrato, transfiera 100 µl de la solución Red Stop a todos los pocillos y mezcle durante 20 segundos.
- Limpie el fondo de los micropocillos y luego realice la lectura en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm.
- Interprete los resultados de la prueba con el lector de micropocillos de Neogen 4700 o en un lector de tiras equivalente. Si utiliza un lector de tiras, calcule los resultados con el software Veratox de Neogen para Windows.

## Interpretación de resultados

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

## Características de desempeño

Límite de cuantificación (LOQ) en ppm de gliadina: De la validación de la AOAC: Harina de arroz, 1,04 ppm; harina de soja, 0,95 ppm; hamburguesa cocida, 1,9 ppm; cereal de avena, 0,2 ppm; pan de maíz (pan), 0,65 ppm. Los LOQ de productos básicos validados internamente por Neogen estaban todos por debajo de 2,5 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo de la curva de calibración en el que esta prueba puede detectar gliadina de forma fiable).

Límite de detección (LOD) en ppm de gliadina: De la validación de la AOAC: Harina de arroz, 0,35 ppm; harina de soja, 0,31 ppm; hamburguesa cocida, 0,63 ppm; cereal de avena, 0,07 ppm; pan de maíz, 0,21 ppm. Los LOD de materias primas validados internamente por Neogen fueron todos inferiores a 2,5 ppm (definidos como el valor medio de 10 muestras negativas + 3,3 desviaciones estándar).

Margen de cuantificación: 2,5-40 ppm de gliadina. (Para cuantificar muestras por encima de 40 ppb, comuníquese con un representante de Neogen para obtener instrucciones de dilución).

## Servicio al cliente

Puede comunicarse con el servicio técnico y el servicio al cliente de Neogen en [neogen.com](http://neogen.com) También ofrecemos capacitación a pedido para nuestros productos.

## Información sobre fichas de datos de seguridad disponible

Las fichas de datos de seguridad están disponibles para todos los kits de prueba en [neogen.com](http://neogen.com) o por teléfono al 800.234.5333 o 517.372.9200.

## **Términos y condiciones**

Los términos y condiciones completos de Neogen están disponibles [en línea](#).

### **Garantía**

Neogen no otorga garantías de ningún tipo, ya sean expresas o implícitas, excepto el hecho de que los materiales de sus productos están fabricados con calidad estándar. Si hay materiales defectuosos, Neogen reemplazará el producto. El comprador asume todos los riesgos y responsabilidades que surjan del uso de este producto. No existe garantía de comercialización de este producto o de la aptitud de este producto para cualquier objetivo. Neogen no será responsable por los daños de ningún tipo, incluidos daños especiales o mediatos, o gastos que surjan directa o indirectamente del uso de este producto.