

**INDICE**

1 - Objetivo	2
2 - Alcance	2
3 - Referencias	2
4 - Responsabilidades	2
5 - Desarrollo	2
6 - Registros y Anexos	6

**REVISION Y APROBACIÓN**

Versión Nro:

5

Modificación:

Sí

No

## 1.0. Objetivo

Determinación de gliadinas en alimentos libres de gluten.

## 2.0. Alcance

Este método analítico permite la determinación de fracciones de gliadina provenientes de trigo y de las correspondientes prolaminas de cebada y centeno por enzimo-inmunoensayo (ELISA) y su expresión como gluten en muestras de alimentos de los Servicios de Analítica de Alimentos y Metodología y Desarrollo del Departamento Control y Desarrollo y de los Departamentos de Vigilancia Alimentaria y de Evaluación Técnica del Instituto Nacional de Alimentos y análisis para empresas, prototipos, componentes.

El ensayo se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. La gliadina se une a los anticuerpos específicos que recubren las celdas de la microplaca dando lugar a la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Los componentes de la muestra no fijados por los anticuerpos son removidos de las celdas por lavado. La gliadina fijada es detectada por un anticuerpo conjugado a peroxidasa (conjugado de la enzima). Luego se agrega el sustrato de la enzima (urea peroxidasa) y el cromógeno (tetrametilbencidina) que desarrolla un color azul. La adición del reactivo stop cambia este último a color amarillo que se mide espectrofotométricamente a 450 nm.

## 3.0. Referencias

- 3.1. Documento Orientaciones para la Gestión (OyPG01)
- 3.2. Procedimiento Control de Documentación (INAL-DCD-PG-4.3)
- 3.3. Manual de Identidad Institucional
- 3.4. ISO/IEC 17025:2005 – “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”
- 3.5. RIDASCREEN GLIADIN R7001 R-BIOPHARM: *Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of gliadins and corresponding prolamines*
- 3.6. Certificado N° 120601 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

## 4.0. Responsabilidades

- 4.1. Jefe Dpto. Control y Desarrollo: Aprueba, aplica y verifica el cumplimiento del documento.
- 4.2. Responsable de Calidad: Aplica y verifica el cumplimiento del documento.
- 4.3. Equipo de calidad: Elabora, aplica y verifica el cumplimiento del documento.
- 4.4. Agentes del Dpto. Control y Desarrollo: Elaboran y aplican el documento.

## 5.0. Desarrollo

### 5.1. Aparatos y Materiales:

- 5.1.1. Frascos de vidrio con tapa a rosca
- 5.1.2. Espátulas
- 5.1.3. Probetas de 25 y 100 ml
- 5.1.4. Pipetas graduadas de 5 y 10 ml

- 5.1.5. Pipetas automáticas de 2-20 µl, 20-200 µl y 100-1000 µl.
- 5.1.6. Pipetas automáticas repetitivas.
- 5.1.7. Film autoadherente.
- 5.1.8. Vasos de precipitados de 100 y 250 ml.
- 5.1.9. Erlenmeyers de 500 ml.
- 5.1.10. Gradillas, para tubos *Eppendorf*.
- 5.1.11. Tubos tipo safe lock de 1,5 ml, *Eppendorf* o similar.
- 5.1.12. Lector de Elisa tipo *Packard SpectraCount Microplate Photometer* o similar.
- 5.1.13. Agitador tipo *vortex*
- 5.1.14. Balanza analítica
- 5.1.15. Heladera (4 - 8°C)
- 5.1.16. Freezer (-15 a -20°C).
- 5.1.17. Centrífuga con rotor para tubos de *ependorf* de 1,5 ml
- 5.1.18. Agitador con movimiento horizontal tipo *shaker*
- 5.1.19. Baño de agua termostático (50°C) con agitador mecánico de movimiento horizontal
- 5.1.20. Procesadora
- 5.1.21. Morteros

## 5.2. Reactivos:

- 5.2.1. Kit de inmunoensayo para el análisis cuantitativo de gliadinas y prolaminas correspondientes, *R-Biopharm AG Ridascreen* (Art. No.: R7001).
- 5.2.2. *Cocktail solution*, Art. No R7006, (105 ml).
- 5.2.3. Agua bidestilada.
- 5.2.4. Etanol absoluto p.a.
- 5.2.5. Leche en polvo descremada.
- 5.2.6. *Fish* gelatina marca *Sigma*, Order No G-7765.
- 5.2.7. *Polyvinylpyrrolidone* marca *Sigma*, Order No PVP 10.
- 5.2.8. Solución de etanol 60%: Agregar 150ml de etanol a 100 ml de agua bidestilada.
- 5.2.9. Solución de etanol 80%: Agregar 120ml de etanol a 30 ml de agua bidestilada.
- 5.2.10. Solución *fish* gelatina: Disolver cuidadosamente 11,1 ml de *fish* gelatina y 2 g de polivinilpirrolidona en 20ml de agua bidestilada llevar a 40 ml, luego agregar 60 ml de etanol. Conservar a temperatura ambiente (20 - 25°C), la solución es estable por 3 ó 4 semanas. Mezclar muy bien antes de usar.

## 5.3. Patrones y Material de Referencia.

- 5.3.1. El material de los *standards* del kit *RIDASCREEN* fue calibrado por el *Prolamin Working Group* con sede en Bélgica.
- 5.3.2. Tanto los patrones como los materiales de referencia deben indicar en su certificado la pureza o concentración, así como fecha de preparación y de vencimiento.

## 5.4. Preparación y Conservación de la Muestra Preanálisis

- 5.4.1. Las muestras recibidas deben conservarse en freezer, heladera o a temperatura ambiente según corresponda.
- 5.4.2. Trazas de cereales en el aire y equipos sucios pueden provocar que el ensayo se contamine, por lo tanto se requiere:
  - ✓ El uso de guantes

- ✓ Limpiar las superficies, los viales de vidrio, mezcladores y otros equipos con etanol 60%.
- ✓ Preparar las muestras en un laboratorio separado de donde vaya a efectuarse el procedimiento de Elisa.

## 5.5. Procedimiento de extracción

- 5.5.1. Alimentos no calentados a más de 90°C: Con etanol 60%
- 5.5.2. Alimentos fluidos (por ej. crema, salsas): Mezclar 1 ml de la muestra con 9 ml de etanol 60%.
- 5.5.3. Alimentos en polvo (por ej. harinas): Pesar 0,3g de muestra representativa y agregar 3 ml de etanol 60%.
- 5.5.4. Alimentos sólidos (por ej. alfajor): Pesar 5 g ó una unidad y moler, tomar 0,3 g de muestra representativa y agregar 3 ml de etanol 60%
- 5.5.5. Alimentos no homogéneos (por ej. hamburguesas, embutidos): Moler una unidad, tomar 2 g y agregar 20 ml de etanol 60%, homogeneizar
- 5.5.6. Agitar por 30 minutos.
- 5.5.7. Centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a temperatura ambiente.
- 5.5.8. Diluir el sobrenadante 1:50 (1+49) con diluyente de muestra, por ej. 20 µl sobrenadante + 980 µl de diluyente de muestra.
- 5.5.9. Usar 100 µl por celda durante el ensayo.
- 5.5.10. **Muestras positivas: repetir con solución Cocktail y seguir el procedimiento como en 5.7.4.**

## 5.6. Alimentos que contienen taninos como chocolate, café o cocoa: Con solución Fish

- 5.6.1. Preparar la solución *fish* - gelatina
- 5.6.2. Pesar 1 g de muestra bien molida y homogeneizada
- 5.6.3. Agregar 10 ml de solución *fish* gelatina
- 5.6.4. Homogeneizar en *Vortex* por 30 seg
- 5.6.5. Colocar en el *shaker* por 1 hora
- 5.6.6. Centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a temperatura ambiente.
- 5.6.7. Diluir el sobrenadante 1:50 (1+49) con diluyente de muestra, por ej. 20 µl sobrenadante + 980 µl de diluyente de muestra.
- 5.6.8. **Muestras positivas: repetir con solución Cocktail y seguir el procedimiento como en 5.7.4 con el agregado de 0.25g de leche en polvo descremada.**

## 5.7. Alimentos calentados a más de 90°C o que contengan soja: Con solución Cocktail

- 5.7.1. Muestras líquidas: Pipetear 0.25 ml de la muestra y agregar 2.5 ml de la solución *cocktail*, cerrar el vial y mezclar bien.
- 5.7.2. Muestras sólidas: Pesar 0.25 g de una muestra representativa y agregar 2.5 ml de la solución *Cocktail*, cerrar el vial y mezclar bien.
- 5.7.3. Muestras no homogéneas: En este tipo de matrices la gliadina podría no estar distribuida uniformemente, por lo tanto: Pesar 50 g y homogeneizar
- 5.7.4. Pesar 0.25 g de la muestra homogeneizada y agregar 2.5 ml de la solución cocktail, cerrar el vial y mezclar bien.

- Incubar 40 min a 50°C. con agitación
- 5.7.5. Dejar enfriar y luego mezclar con 7,5 ml de etanol 80%.
  - 5.7.6. Tapar el vial y agitar por 1 h a temperatura ambiente.
  - 5.7.7. Centrifugar 10 min a por lo menos 8000 rpm.
  - 5.7.8. Diluir el sobrenadante 1:12,5 (1 + 11,5 // **40 µl+ 460 µl**) con diluyente de muestra.
  - 5.7.9. Usar 100 µl por celda durante el ensayo.

NOTA 1: La solución *Cocktail* contiene mercapto-etanol, por lo tanto se recomienda trabajar bajo campana

Nota 2: Cada muestra homogeneizada se procesará por duplicado, al final del tratamiento de extracción se sembrarán dos celdas por cada uno.

### 5.8. Implementación del Test:

- 5.8.1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente.
- 5.8.2. Acondicionar y diluir los reactivos concentrados, sólo en las proporciones que van a ser utilizadas
- 5.8.3. No dejar que las celdas se sequen durante el tiempo de trabajo.
- 5.8.4. La reproducibilidad dependerá fundamentalmente de la manera en la que se realiza el lavado de las celdas. Se deberán seguir cuidadosamente las recomendaciones referentes al lavado.
- 5.8.5. La temperatura de incubación es un punto crítico. Mantener entre 20 y 25°C.
- 5.8.6. Evitar la luz directa durante las incubaciones. Se recomienda cubrir la placa.
- 5.8.7. Conjugado: El conjugado se provee en forma concentrada. Como tiene una estabilidad limitada, solo se debe reconstituir la cantidad a ser usada. Antes de pipetear, el conjugado deber ser agitado cuidadosamente. Para reconstituirlo, el concentrado debe ser diluido 1:11 (1+10) con agua bidestilada (ejemplo: para dos tiras, 200 µl de conjugado concentrado + 2 ml de agua bidestilada).
- 5.8.8. Buffer de lavado: El buffer se provee en forma concentrada, por lo tanto deber ser diluido 1:10 (1+9) con agua bidestilada (ejemplo: 100 ml de buffer concentrado + 900 ml de agua bidestilada). El buffer diluido es estable entre los 2 y los 8°C por cuatro semanas. Antes de la dilución disolver los cristales que pudieran haberse formado, en un baño de agua a 37°C.
- 5.8.9. Buffer para diluir las muestras: El buffer se provee en forma concentrada, por lo tanto solo debe ser diluida 1:5 (1+4) con agua bidestilada (ejemplo: 7 ml de buffer concentrado + 28 ml de agua bidestilada), son suficientes para diluir diez muestras.

### 5.9. Procedimiento:

- 5.9.1. Insertar la cantidad necesaria de celdas en el soporte tanto para las muestras, los *standards* y sus duplicados. Registrar la posición de las muestras y los *standards*.
- 5.9.2. Colocar 100 µl de cada standard o muestra preparada en las celdas, por duplicado
- 5.9.3. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.

- 5.9.4. Eliminar el líquido de las celdas, dando vuelta la placa rápidamente con golpes sobre un papel absorbente para eliminar completamente el líquido de las celdas.
- 5.9.5. Realizar tres lavados sucesivos con el *buffer* de lavado diluido, eliminando el líquido con golpes sobre papel absorbente entre cada lavado.
- 5.9.6. Eliminar las burbujas que queden en las celdas. Agregar 100 µl del conjugado diluido a cada celda e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- 5.9.7. Remover el líquido de la placa y realizar los tres lavados como se indicó anteriormente.
- 5.9.8. Agregar 50 µl de sustrato y 50 µl de cromógeno a cada celda.
- 5.9.9. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- 5.9.10. Agregar 100 µl de la Solución *Stop*.
- 5.9.11. Leer la absorbancia a 450 nm dentro de la media hora de agregada la Solución *Stop*.

#### 5.10. Resultados:

- 5.10.1. Los valores de absorbancia obtenidos de los *standards* y muestras son ingresados en un sistema de coordenadas sobre un gráfico semi-logarítmico vs la concentración de gliadina en µg/kg (ppb).
- 5.10.2. El valor de la absorbancia del *standard* 1 (0 ppb) debería ser menor a 0,15 a 450 nm (valores superiores muestran un lavado insuficiente ó contaminación).
- 5.10.3. Para obtener la concentración de gluten en µg/kg de una muestra, la concentración, leída en la curva debe ser multiplicada por su factor de dilución correspondiente. Cuando se trabaja de acuerdo a lo establecido, el factor de dilución será 500.
- 5.10.4. Se estima que solo un 50% del gluten está como gliadina. Por lo tanto, la concentración calculada debe ser nuevamente multiplicada por 2.
- 5.10.5. Por ejemplo: 10 µg/kg de gliadina corresponden a  $10 \mu\text{g/kg} \times 500 \times 2 = 10.000 \mu\text{g/kg} = 10 \text{ mg/kg} = 10 \text{ ppm}$  de gluten, 0.001% de gluten respectivamente.

#### 6.0. Registros y Anexos

- Anexo 1 – Hoja de Modificaciones
- Anexo 2 – Distribución de Documentos
- Anexo 3 – Esquema del Procedimiento

**ANEXO 1 - HOJA DE MODIFICACIONES**

<b>VERSIÓN N°:</b> 5	<b>HOJA N°:</b> 4, 5
<b>MODIFICACIONES:</b> punto 5.7.8; punto 5.7.4 ( con agitación)	
Punto 1.0 Objetivos	
<b>FECHA:</b> 28/04/2015	<b>FIRMA:</b> Susana E.G. de Balán

**ANEXO 2 - DISTRIBUCIÓN DE DOCUMENTOS**

<b>NUMERO DE COPIA</b>	<b>SECTOR/ AREA</b>	<b>FECHA</b>	<b>FIRMA</b>	<b>ACLARACION</b>

**ANEXO 3 – ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO**

