

# AlerTox<sup>®</sup> ELISA

## Allergen

Kit ELISA para la determinación de alérgenos en alimentos y bebidas.

# AlerTox<sup>®</sup> ELISA

## Allergen

## Contenidos

1. Introducción .....	2
2. Límites .....	3
3. Rangos de cuantificación .....	3
4. Tasas de recuperación .....	4
5. Reactividad cruzada.....	4
6. Caducidad .....	5
7. Referencia de todas las matrices probadas.....	5
8. Matrices sin reactividad cruzada comprobadas para cada kit .....	6
9. Consejos adicionales .....	7
10. Los resultados son medidos como .....	8
11. Factores de conversión importantes.....	8
12. Precauciones generales .....	9
13. Principio del test.....	10
14. Contenido del kit .....	10
15. Condiciones de almacenamiento.....	10
16. Material necesario no suministrado .....	10
17. Material/equipamiento opcional.....	11
18. Preparación de reactivos.....	11
19. Preparación de muestras .....	11
20. Protocolo de lavado .....	12
21. Esquema de ejecución del ensayo.....	12
22. Cálculo de los resultados .....	13
23. Responsabilidad.....	14

## 1. Introducción

Este manual de uso es válido para todos los kits de determinación de alérgenos de la serie AlerTox ELISA. Los 20 kits AlerTox ELISA listados a continuación poseen un protocolo de uso idéntico, que permite trabajar paralelamente con diferentes kits para la determinación de distintos alérgenos siguiendo el mismo esquema para la preparación de muestras y para la realización del ensayo ELISA.

Antes de comenzar por primera vez con un nuevo parámetro, lea detenidamente las instrucciones e indicaciones particulares según el kit que vaya a utilizar, tal y como se indica a continuación. **Por favor, no modifique el protocolo con respecto a los tiempos, los volúmenes de pipeteo, el tipo de buffers, el valor del pH de los búferes, ni la temperatura. Cualquier modificación del protocolo descrita anteriormente podría alterar la validación del ensayo.**

Un ajuste del pH no es necesario normalmente. No agite la placa durante el período de incubación. No use los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

Estas instrucciones de uso son válidas para los siguientes kits AlerTox ELISA:

Componente (96 pocillos)	Referencia	
	Código fabricante	Código Higiene
AlerTox ELISA Coconut	KT-6285	KIT3056
AlerTox ELISA Lupine	KT-5914	KIT3057
AlerTox ELISA Sesame	KT-5908	KIT3051
AlerTox ELISA Mustard (mostaza blanca, negra y marrón)	KT-5915	KIT3058
AlerTox ELISA Macadamia	KT-6287	KIT3055
AlerTox ELISA Cashew	KT-5916	KIT3053
AlerTox ELISA Soy (STI = Inhibidor de la tripsina de la soja)	KT-5906	KIT3047
AlerTox ELISA Walnut	KT-5909	KIT3052
AlerTox ELISA Peanut	KT-5905	KIT3048
AlerTox ELISA Hazelnut	KT-5907	KIT3050
AlerTox ELISA Almond	KT-5910	KIT3049
AlerTox ELISA Pistachio	KT-5917	KIT3054
AlerTox ELISA Egg (proteínas de clara de huevo)	KT-5904	KIT3046
AlerTox ELISA Lysozyme	KT-5757	KIT3044
AlerTox ELISA Ovalbumin	KT-5759	KIT3045
AlerTox ELISA Casein	KT-5761	KIT3043
AlerTox ELISA Milk (Caseína y BLG)	KT-5918	KIT3041
AlerTox ELISA BLG	KT-5919	KIT3042
AlerTox ELISA Crustacean	KT-5903	KIT3059
AlerTox ELISA Fish	KT-5920	KIT3060

Los extractos de las muestras, preparadas para alguno de los siguientes kits AlerTox ELISA, pueden también ser utilizados directamente en cada uno del resto de los kits a continuación: AlerTox ELISA Coconut, AlerTox ELISA Lupine, AlerTox ELISA Sesame, AlerTox ELISA Mustard, AlerTox ELISA Macadamia, AlerTox ELISA Cashew, AlerTox ELISA Soy (STI), AlerTox ELISA Walnut, AlerTox ELISA Peanut, AlerTox ELISA Hazelnut, AlerTox ELISA Almond, AlerTox ELISA Pistachio, AlerTox ELISA Egg, AlerTox ELISA Lysozyme (únicamente son compatibles los extractos de vino), AlerTox ELISA Ovalbumin y AlerTox ELISA BLG.

Esto significa que se pueden determinar 16 alérgenos distintos a partir de un único extracto de muestra.

Las muestras para ser utilizadas en los kits AlerTox ELISA Casein, AlerTox ELISA Milk, AlerTox ELISA Crustacean y AlerTox ELISA Fish deben ser extraídas de manera individual.

## 2. Límites

Kit	LOD	LOQ	Kit	LOD	LOQ
AlerTox ELISA Coconut	0.4 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA Almond	0.2 ppm	0.5 ppm
AlerTox ELISA Lupine	0.2 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA Pistachio	0.13 ppm	1 ppm
AlerTox ELISA Sesame	0.2 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA Egg	0.05 ppm	0.4 ppm
AlerTox ELISA Mustard	1.5 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA Lysozyme	2 ppb	25 ppb
AlerTox ELISA Macadamia	0.1 ppm	1 ppm	AlerTox ELISA Ovalbumin	5 ppb	25 ppb
AlerTox ELISA Cashew	0.2 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA Casein	0.05 ppm	0.20 ppm
AlerTox ELISA Soy (STI)	16 ppb	50 ppb	AlerTox ELISA Milk	0.05 ppm	0.5 ppm
AlerTox ELISA Walnut	0.6 ppm	2 ppm	AlerTox ELISA BLG	1.5 ppb	10 ppb
AlerTox ELISA Peanut	0.3 ppm	1 ppm	AlerTox ELISA Crustacean	1 ppb	20 ppb
AlerTox ELISA Hazelnut	0.3 ppm	1 ppm	AlerTox ELISA Fish	1.4 ppm	4 ppm

## 3. Rangos de cuantificación

Kit	Range	
AlerTox ELISA Coconut	(25-12.5-5-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Lupine	(30-15-5-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Sesame	(20-10-4-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Mustard	(50-25-10-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Macadamia	(25-12.5-5-1-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Cashew	(50-25-10-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Soy (STI)	(600-300-150-50-0 ppb)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Walnut	(50-15-5-2-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Peanut	(30-15-5-1-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Hazelnut	(40-15-5-1-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Almond	(10-5-2-0.5-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Pistachio	(25-12.5-5-1-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Egg	(8-4-2-0.4-0 ppm)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Lysozyme	(250-125-50-25-0 ppb)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Ovalbumin	(500-250-100-25-0 ppb)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Casein	(5-2.5-1-0.2-0 ppm) (tras la dilución de los estándares)	100x concentrado
AlerTox ELISA Milk	(10-5-2-0.5-0 ppm) (tras la dilución de los estándares)	100x concentrado
AlerTox ELISA BLG	(300-150-50-10-0 ppb)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Crustacean	(400-200-80-20-0 ppb)	Listo para usarse
AlerTox ELISA Fish	(100-50-20-4-0 ppm)	Listo para usarse

#### 4. Tasas de recuperación (probados en matrices típicas) Zumo Nar = Zumo de naranja; V. =vino

AlerTox ELISA Coconut	Galletas: 92%	Copos maíz: 102%	Helado: 74%	Chocolate: 87%	Salchicha: 80%
AlerTox ELISA Lupine	Salchicha: 99%	Bizcocho: 113%	Zumo Nar: 104%	Ketchup: 98%	Croqueta: 111%
AlerTox ELISA Sesame	Salchicha: 92%	Galletita: 109%	Sopa inst.: 110%	Aderezos: 93%	---
AlerTox ELISA Mustard	Salchicha: 98%	Sopa de lata: 96%	Sopa inst.: 80%	Aderezos: 76%	Mix Hierbas: 78%
AlerTox ELISA Macadamia	Galletas: 106%	Copos maíz: 104%	Helado: 92%	Chocolate: 83%	Salchicha: 101%
AlerTox ELISA Cashew	Galletas: 109%	Copos maíz: 98%	Helado: 93%	Chocolate: 102%	---
AlerTox ELISA Soy (STI)	Galletas: 106% Sopa inst.: 90%	Copos maíz: 100%	Helado: 77%	Chocolate: 77%	Salchicha: 96%
AlerTox ELISA Walnut	Galletas: 103%	Copos maíz: 106%	Helado: 87%	Chocolate: 60%	---
AlerTox ELISA Peanut	Galletas: 101%	Copos maíz: 100%	Helado: 89%	Chocolate: 110%	---
AlerTox ELISA Hazelnut	Galletas: 99%	Copos maíz: 101%	Helado: 90%	Chocolate: 83%	---
AlerTox ELISA Almond	Galletas: 90%	Cereales: 105%	Helado: 77%	Chocolate: 68%	---
AlerTox ELISA Pistachio	Galletas: 94%	Copos maíz: 96%	Helado: 89%	Chocolate: 81%	Salchicha: 90%
AlerTox ELISA Egg	Galletas: 85%	Pasta: 91%	Bizcocho: 83%	Chocolate: 82%	Salchicha: 98%
AlerTox ELISA Ovalbumin	V. tinto: 93%	V. rosado: 102%	V. blanco: 100%	---	---
AlerTox ELISA Lysozyme	V. tinto: 99%	V. rosado: 91%	V. blanco: 93%	---	---
AlerTox ELISA Casein	V. tinto: 89% Galletas: 100%	V. rosado: 80% Pan: 80%	V. blanco: 102%	Chocolate: 86%	Salchicha: 80%
AlerTox ELISA Milk	V. blanco: 122%	Pan: 110%	Salchicha: 88%	Chocolate*: 99%	*) en base de soja
AlerTox ELISA BLG	Galletas: 88%	Copos maíz: 94%	Salchicha: 107%	Chocolate: 86%	V. blanco: 82%
AlerTox ELISA Crustacean	Galletita: 90%	Salsa soja: 90%	Pescado: 93%	Carne: 97%	---
AlerTox ELISA Fish	V. tinto: 103% Rollo primavera: 93%	Sopa: 117% Surimi: 114%	Salsa: 103%	Galletita: 99%	Worcester S.: 112%

#### 5. Reactividad cruzada (s=semilla; l=hoja; r=raíz; n=nativo; h=calentado; sm=ahumado; m=carne; gr=granulado; k=hueso; p=polvo)

AlerTox ELISA Coconut	Coco: 100%	---	---	---
AlerTox ELISA Lupine	Altramuz: 100% Lenteja: 0.0004%	Harina de soja n*: 0.07% Garbanzo: 0.0003%	Lecitina soja: 0.002% Carne ternera: 0.0003%	Harina de soja: 0.0009% no usado en alimentación
AlerTox ELISA Sesame	Sésamo: 100%	Avena: 0.0003%	Haba/frijol: 0.0003%	---
AlerTox ELISA Mustard	Mostaza blanca: 100%	Mostaza negra: 50%	Mostaza marrón: 59%	Colza s.: 59%
AlerTox ELISA Macadamia	Macadamia: 100%	Nuez: 0.001%	Avellana: 0.0002%	---
AlerTox ELISA Cashew	Anacardo: 100%	Pistacho: 4%	---	---
AlerTox ELISA Soy (STI)	STI: 100%	---	---	---
AlerTox ELISA Walnut	Nuez: 100%	Nuez pacana: 0.0005%	Castaña: 0.0002%	Pollo: 0.0002%
AlerTox ELISA Peanut	Cacahuete: 100%	Goma arábica: 0.003%	---	---
AlerTox ELISA Hazelnut	Avellana: 100%	Nuez: 0.0022%	---	---
AlerTox ELISA Almond	Almendra: 100% Marel k.: 1.42%	Melocotón k.: 15.95% Albaricoque k: 100%	Ciruela k.: 1%	Cereza k.: 1.74%
AlerTox ELISA Pistachio	Pistachio: 100% Nuez pacana: 0.0005%	Anacardo: 12% Pipa (girasol) s: 0.0002%	Avellana: 0.17% ---	Nuez: 0.0008% ---
AlerTox ELISA Egg	Huevo: 100%	Carne de pollo: 0.001%	Ovomucoide: 614%	Conalbúmina: 2.60% Ovoalbúmina: 0.25%
AlerTox ELISA Ovalbumin	Ovoalbúmina: 100% Proteínas de clara de huevo (total): 75%	Conalbúmina: <0.2%	Lisozima: <0.02%	Ovomucoide: <0.02%
AlerTox ELISA Lysozyme	Lisozima: 100%	Ovoalbúmina: <0.0001%	Conalbúmina: <0.0001%	Proteínas de clara de huevo (total): 2.2%

AlerTox ELISA Casein	Caseína: 100%	Leche oveja: <1.2%	Leche cabra: <1.1%	---
AlerTox ELISA Milk	Caseinato: 100%	BLG: 89.9%	Leche oveja: 0.96%	Leche cabra: 0.014%
AlerTox ELISA BLG	BLG: 100%	Leche oveja: <0.2%	Caseína: <0.02%	Leche cabra: <0.002%
AlerTox ELISA Crustacean	Tropomiosina (de <i>Penaeus indicus</i> ): 100%		---	---
AlerTox ELISA Fish	Bacalao: 100% Carpa: 79.6% Carbonero: 31.0% Salmonete: 19.6% Locha mármol: 6.3% Salmón: 2.6% Atún: 0.8% Pollo m.: 0.00035% Trigo sarraceno: 0.00003%	Siluro: 168.0% Salmonete: 58.9% Lucioperca: 30.2% Trucha: 18.6% Anguila: 5.7% Rodaballo: 2.5% Verdel sm.: 0.4% Gamba: 0.00006% Avena: 0.0003%	Perca: 93.1% Eglefino: 53.4% Pangasio: 29.5% Platija: 13.5% Gallineta: 2.8% Arenque sm.: 1.5% Pez espada: 0.2% Ternera m.: 0.00005% Mostaza: 0.00001%	Lucio: 85.3% Róbalo: 46.9% Solla: 28.9% Sardina: 7.0% Lenguado: 2.8% Manta: 1.1% Oveja m.: 0.0003% Macadamia: 0.00004% Cebolla: 0.00001%

La información sobre las matrices que no producen reacciones cruzadas, que han sido comprobadas en cada kit, están disponibles en las siguientes páginas.

## 6. Caducidad (Desde la fecha de producción)

AlerTox ELISA Lupine	13 months	AlerTox ELISA Pistachio	13 months
AlerTox ELISA Sesame	18 months	AlerTox ELISA Egg	24 months
AlerTox ELISA Mustard	24 months	AlerTox ELISA Ovalbumin	24 months
AlerTox ELISA Cashew	13 months	AlerTox ELISA Lysozyme	24 months
AlerTox ELISA Soy (STI)	24 months	AlerTox ELISA Casein	13 months
AlerTox ELISA Walnut	13 months	AlerTox ELISA Milk	13 months
AlerTox ELISA Peanut	13 months	AlerTox ELISA BLG	13 months
AlerTox ELISA Hazelnut	18 months	AlerTox ELISA Crustacean	24 months
AlerTox ELISA Almond	24 months	AlerTox ELISA Fish	24 months
AlerTox ELISA Coconut	13 months	AlerTox ELISA Macadamia	13 months

## 7. Referencias de todas las matrices comprobadas

[01] Almendra	[13] Nuez de Brasil	[25] Siluro	[37] Conalbúmina
[02] Manzana	[14] BSA	[26] Pimentón	[38] Maíz
[03] Albaricoque	[15] Trigo Sarraceno	[27] Apio	[39] Leche (vaca)
[04] Cebada	[16] Col	[28] Cereza	[40] Comino (semilla)
[05] Róbalo	[17] Cacao	[29] Castaña	[41] Cúrcuma
[06] Haba / frijol	[18] Alcaravea (semilla)	[30] Pollo (carne)	[42] Manta (pescado)
[07] Haba verde	[19] Cardamomo (semilla)	[31] Garbanzo	[43] Eneldo
[08] Haba roja	[20] Goma de algarrobo	[32] Canela	[44] Anguila
[09] Haba blanca	[21] Carpa	[33] Clavo	[45] Huevo
[10] Gelatina de ternera	[22] Zanahoria	[34] Carbonero (pescado)	[46] Platija
[11] Carne de ternera	[23] Caseína	[35] Coco	[47] Mastuerzo (hoja)
[12] BLG	[24] Anacardo	[36] Bacalao	[48] Gliadina

[49] Leche (cabra)	[73] Ostra	[97] Centeno	[121] Nuez
[50] Goma de Guar	[74] Pangasio	[98] Salmón	[122] Trigo
[51] Eglefino	[75] Guisante	[99] Salmoncillo	[123] Leche entera polvo
[52] Avellana	[76] Melocotón	[100] Sardina	[124] Vino
[53] Arenque (ahumado)	[77] Cacahuete	[101] Sésamo	[125] Vino tinto
[54] Rábano picante (raíz)	[78] Nuez pacana	[102] Leche (oveja)	[126] Vino rosado
[55] Kiwi	[79] Pimienta	[103] Gamba (cocinada)	[127] Vino blanco
[56] Puerro	[80] Perca	[104] Gamba (cruda)	[128] Lucioperca
[57] Lenteja	[81] Lucio	[105] Leche desnatada polvo	[129] Cerecino
[58] Goma de algarrobo	[82] Piñón (semilla)	[106] Lenguado	[130] Cereza
[59] Altramuz	[83] Pistachio	[107] Harina de soja (tostada)	[131] Melocotón
[60] Lisozima	[84] Solla	[108] Harina de soja (no tostada)	[132] Ciruela
[61] Macadamia	[85] Ciruela	[109] Lecitina Soja	[133] Fenogreco
[62] Jurel (ahumado)	[86] Amapola (semilla)	[110] Loncha mármol	[134] Chili
[63] Mijo	[87] Gelatina de cerdo	[111] Fresa	[135] Paprika
[64] Mostaza negra	[88] Cerdo (carne)	[112] Sacarosa	[136] Tofu
[65] Mostaza marrón (semilla)	[89] Patata (cruda)	[113] Girasol (semilla)	[137] Perifollo
[66] Mostaza blanca (semilla)	[90] Patata (cocinada)	[114] Pez Espada	[138] Gelatina pescado
[67] Nuez moscada	[91] Calabaza (semilla)	[115] Tomillo	[139] Cola pescado
[68] Avena	[92] Rábano	[116] Tomate	[140] Clara huevo
[69] Cebolla	[93] Colza (semilla)	[117] Tropomiosina	[141] Berro
[70] Naranja	[94] Salmonete	[118] Trucha	
[71] Ovoalbúmina	[95] Gallineta	[119] Atún	
[72] Ovomucoide	[96] Arroz	[120] Rodaballo	

## 8. Matrices sin reactividad cruzada comprobada para cada kit

AlerTox ELISA Coconut	[01, 77, 52, 121, 78, 13, 61, 29, 82, 24, 83, 113, 91, 85, 28, 03, 76, 55, 122, 04, 68, 97, 38, 96, 107, 109, 136, 15, 22, 27, 137, 31, 57, 59, 09, 66, 75, 101, 86, 116, 89, 141, 50, 20, 139, 103, 104, 30, 88, 11, 17, 48, 112, 36, 39, 102, 49, 45, 140, 10]
AlerTox ELISA Lupine	[01, 04, 13, 121, 83, 29, 61, 24, 52, 35, 78, 77, 91, 113, 75, 06, 97, 38, 68, 96, 122, 56, 101, 15, 76, 28, 85, 70, 111, 116, 90, 17, 39, 45, 88, 30, 58, 50]
AlerTox ELISA Sesame	[122, 04, 97, 39, 45, 17, 96, 38, 15, 107, 113, 91, 82, 86, 52, 77, 24, 61, 83, 29, 01, 78, 13, 35, 121, 31, 109, 75, 59, 116, 55]
AlerTox ELISA Mustard	[16, 79, 41, 26, 33, 67, 32, 43, 115, 75, 06, 97, 38, 04, 68, 122, 96, 107, 101, 15, 22, 56, 27, 36, 39, 45, 11, 88, 30, 92]
AlerTox ELISA Macadamia	[01, 77, 78, 13, 61, 29, 82, 24, 83, 113, 91, 85, 28, 03, 76, 55, 122, 04, 68, 97, 38, 96, 107, 109, 136, 15, 22, 27, 137, 31, 57, 59, 09, 66, 75, 101, 86, 116, 89, 141, 50, 20, 139, 103, 104, 30, 88, 11, 17, 48, 112, 36, 39, 102, 49, 45, 140, 10]

AlerTox ELISA Cashew	[64, 65, 66, 03, 85, 01, 77, 52, 121, 78, 13, 61, 35, 29, 82, 113, 91, 57, 59, 75, 09, 97, 38, 04, 68, 122, 96, 107, 109, 101, 15, 22, 56, 27, 36, 39, 102, 49, 45, 11, 88, 10, 30, 90, 31, 50, 20, 86, 103, 104, 116, 55, 17, 48, 112]
AlerTox ELISA Soy (STI)	[122, 04, 97, 68, 38, 77, 52, 01, 45, 17, 112, 10, 88, 11, 30, 96, 75, 31, 06, 39]
AlerTox ELISA Walnut	[76, 85, 03, 28, 01, 31, 91, 24, 77, 35, 61, 113, 86, 39, 102, 97, 38, 04, 68, 122, 96, 109, 30, 11, 88, 10, 15, 17, 112, 45]
Alertox ELISA Peanut	[75, 31, 06, 91, 121, 83, 13, 35, 78, 48, 01, 113, 86, 97, 38, 04, 68, 96, 122, 107, 109, 101, 15, 17, 123, 02, 10, 40, 59, 135, 134, 129, 130, 131, 132, 133]
AlerTox ELISA Hazelnut	[75, 31, 06, 91, 121, 83, 13, 82, 29, 61, 24, 77, 35, 10, 48, 113, 86, 97, 38, 04, 68, 96, 122, 107, 109, 101, 15, 17, 123, 02, 01]
AlerTox Almond	[76, 85, 03, 28, 121, 83, 13, 82, 29, 62, 24, 77, 78, 35, 113, 86, 39, 45, 97, 38, 04, 68, 96, 122, 107, 109, 101, 15, 17, 40, 129, 133, 135]
AlerTox ELISA Pistachio	[01, 13, 82, 29, 77, 35, 28, 03, 85, 06, 75, 61, 86, 39, 45, 97, 38, 04, 68, 96, 122, 107, 109, 101, 91, 57, 59, 64, 65, 66, 50, 20, 31, 22, 27, 90, 116, 55, 30, 88, 11, 10, 36, 104, 112, 17]
AlerTox ELISA Egg	[68, 122, 04, 97, 39, 102, 17, 96, 38, 15, 107, 113, 101, 82, 86, 52, 77, 24, 61, 83, 29, 78, 13, 35, 121, 109, 76, 85, 03, 28, 88, 11, 112]
AlerTox ELISA Ovalbumin	[105, 36, 10]
AlerTox ELISA Lysozyme	[105, 36, 10]
AlerTox ELISA Casein	[12, 122, 97, 68, 04, 38, 96, 45, 101, 112, 30, 88, 11]
AlerTox ELISA Milk	[97, 68, 04, 38, 122, 96, 101, 64, 65, 66, 27, 59, 107, 77, 01, 52, 121, 83, 17, 30, 88, 11, 45, 36]
AlerTox ELISA BLG	[14, 11, 88, 30, 45, 122, 68, 97, 04, 96, 38, 15, 107, 86, 101, 113, 91, 82, 24, 77, 52, 121, 78, 13, 35, 01, 83, 61, 29, 31, 75, 06, 109, 112, 17, 70, 124, 76, 03, 28, 85]
AlerTox ELISA Crustacean	[36, 73, 39, 45, 11, 88, 30, 121, 83, 13, 82, 29, 52, 24, 77, 01, 78, 61, 35, 91, 113, 122, 97, 38, 04, 68, 96, 101, 15, 107, 109, 75, 06, 90, 22, 27, 56]
AlerTox ELISA Fish	[04, 97, 107, 63, 101, 52, 01, 78, 13, 121, 77, 06, 75, 90, 22, 45, 27, 39, 83, 24, 91, 113, 122, 96, 38]

## 9. Consejos adicionales

AlerTox ELISA Coconut	Ninguno
AlerTox ELISA Lupine	Ninguno
AlerTox ELISA Sesame	Ninguno
AlerTox ELISA Mustard	Si se desea evitar reactividad cruzada con <i>Brassicaceae</i> spec., se recomienda usar otro kit más sensible a la mostaza que detecte solo mostaza amarilla (contacte con su proveedor).
AlerTox ELISA Macadamia	Ninguno
AlerTox ELISA Cashew	Ninguno
AlerTox ELISA Soy (STI)	La soja cruda no se usa como alimento. Ver factores de conversión en la sección 11.
AlerTox ELISA Walnut	Ninguno
Alertox ELISA Peanut	Ninguno
AlerTox ELISA Hazelnut	Ninguno
AlerTox Almond	Ninguno
AlerTox ELISA Pistachio	Ninguno
AlerTox ELISA Egg	Ninguno
AlerTox ELISA Ovalbumin	Sólo validado para matrices de vino.

AlerTox ELISA Lysozyme	Sólo validado para matrices de vino y queso.
AlerTox ELISA Casein	Debido a los fuertes efectos debidos a la matriz, se recomienda diluir las muestras de carne y salchichas de manera adicional 1:5 con buffer de extracción 1x.
AlerTox ELISA Milk	Si la temperatura de procesado de la muestra es superior a 70 °C, la medida con este kit tan sólo hace referencia al contenido de caseínas. Debido a los fuertes efectos debidos a la matriz, se recomienda diluir las muestras de carne y salchichas de manera adicional 1:5 con buffer de extracción 1x.
AlerTox ELISA BLG	Si desea determinar beta-lactoglobulina hidrolizada, por ejemplo en comida de bebé, debe utilizar otro kit (consultar proveedor). Debido a que la beta-lactoglobulina es muy sensible al calor, el material de la muestra no debería procesarse por encima de 60 °C. Por encima de 70 °C la detección fallará debido al cambio progresivo en la estructura de las proteínas.
AlerTox ELISA Crustacean	La temperatura de extracción se reduce a 40 °C.
AlerTox ELISA Fish	Sólo para productos alimenticios frescos o ligeramente procesados.

## 10. Los resultados son medidos como

AlerTox ELISA Coconut	Nuez entero fresca	AlerTox ELISA Almond	Nuez entera
AlerTox ELISA Lupine	Semilla entera	AlerTox ELISA Pistachio	Nuez entera
AlerTox ELISA Sesame	Semilla entera	AlerTox ELISA Egg	Proteínas de clara de huevo
AlerTox ELISA Mustard	Semilla entera	AlerTox ELISA Lysozyme	Lisozima
AlerTox ELISA Macadamia	Nuez entera	AlerTox ELISA Ovalbumin	Ovoalbúmina
AlerTox ELISA Cashew	Nuez entera	AlerTox ELISA Casein	Caseínas totales
AlerTox ELISA Soy (STI)	Inhibidor de tripsina de soja	AlerTox ELISA Milk	Proteínas de leche entera
AlerTox ELISA Walnut	Nuez entera	AlerTox ELISA BLG	Beta-lactoglobulin
AlerTox ELISA Peanut	Whole seed	AlerTox ELISA Crustacean	Tropomiosina (de <i>Penaeus indicus</i> )
AlerTox ELISA Hazelnut	Nuez entera	AlerTox ELISA Fish	Carne fresca de pescado

## 11. Factores de conversión importantes

AlerTox ELISA Coconut	Coco entero fresco	→	Proteína; dividir entre 30; Copos coco → Proteína; dividir entre 16 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Lupine	Semilla entera	→	Proteína; dividir entre 2,4 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Sesame	Semilla entera	→	Proteína; dividir entre 5,2 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Mustard	Semilla entera	→	Proteína; dividir entre 3,3 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Macadamia	Nuez entera	→	Proteína; dividir entre 12,7 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Cashew	Nuez entera	→	Proteína; dividir entre 5,7 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Soy (STI)	Inhibidor	→	Proteína (calentada); multiplicar por 190; Proteína (calentada) → Soja (calentada); multiplicar por 2,5
	Inhibidor	→	Soja (calentada); multiplicar por 475
	Inhibidor	→	Proteína (no calentada); multiplicar por 17; Proteína → Soja (no calentada); multiplicar por 2,5
	Inhibidor	→	Soja (no calentada); multiplicar por 42,5 (todos los factores de soja son factores validados); Materia cruda → Materia calentada; multiplicar por 11,2

AlerTox ELISA Walnut	Nuez entera	—————>	Proteína; dividir entre 6,7 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Peanut	Semilla entera	—————>	Proteína; dividir entre 4,0 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Hazelnut	Nuez entera	—————>	Proteína; dividir entre 7,6 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Almond	Nuez entera	—————>	Proteína; dividir entre 4,8 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Pistachio	Nuez entera	—————>	Proteína; dividir entre 5,7 (dato de literatura)
AlerTox ELISA Egg	---		
AlerTox ELISA Ovalbumin	---		
AlerTox ELISA Lysozyme	---		
AlerTox ELISA Casein	Caseína	—————>	Leche desnatada en polvo; multiplicar por 3,6 (factor validado);
	Caseína	—————>	Leche entera; multiplicar por 42 (factor validado)
AlerTox ELISA Milk	Proteínas de la leche	—————>	Leche desnatada en polvo; multiplicar por 2,7 (factor validado)
AlerTox ELISA BLG	BLG	—————>	Leche desnatada en polvo; multiplicar por 60 (factor validado);
	BLG	—————>	Leche entera; multiplicar por 370 (factor validado)
AlerTox ELISA Crustacean	Tropomiosina	—————>	Gamba liofilizada; multiplicar por 70 (factor validado); otros ver reporte de validación
AlerTox ELISA Fish	---		

## 12. Precauciones generales

- Lea detenidamente este manual antes de iniciar el ensayo.
- Use solo el manual suministrado en el kit. No emplee versiones anteriores.
- Este kit se ha diseñado solo para uso profesional.
- Use el kit de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).
- No utilice ninguno de los componentes de este kit después de la fecha de caducidad.
- No mezcle los componentes de varios kits, ni utilice reactivos o soluciones diferentes a las suministradas.
- La alteración de uno de los reactivos puede causar errores en los resultados.
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo para trabajar con este kit. No toque las placas con las manos.
- No intercambie los tapones de los viales.
- No use las soluciones si observa turbidez o precipitados en ellas, con la excepción de la solución de lavado 10x, que puede precipitar en algunos casos. Si esto ocurre, caliente la solución de lavado a 37° C durante 15 minutos antes de su uso para disolver los precipitados.
- Use solo agua destilada para la dilución de las soluciones concentradas.
- No permita que los pocillos se sequen por completo.
- Durante la extracción de la muestra, evite la contaminación cruzada.
- Abra la bolsa protectora y saque solo las tiras multipocillo necesarias. Mantenga el resto de las tiras en la bolsa protectora, junto con el desecante, a 2 - 8° C.
- El sellado incompleto de la bolsa de aluminio puede provocar el acúmulo de humedad y la pérdida de precisión en los resultados.
- Existe una variedad de factores que influyen en la realización del ensayo (temperatura inicial de los reactivos, tiempos de incubación durante el ensayo, exactitud y reproducibilidad de la técnica de pipeteo y calidad de la técnica de lavado). Es necesario tener especial cuidado y trabajar de forma rigurosa para obtener resultados exactos y reproducibles.
- El material empleado para la preparación de la muestra, como un mortero o una batidora, deben limpiarse bien después de la preparación de cada muestra.
- Todos los reactivos deben acondicionarse a temperatura ambiente (15 - 25 °C) antes de usarlos.
- Evite incubar la placa sobre superficies de trabajo frías.
- La solución de stop se compone de una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Evite la ingestión, la inhalación y el contacto con la piel y los ojos. Evite la exposición a bases, metales y otros compuestos que puedan reaccionar con los ácidos. Consulte la Ficha de Seguridad..
- La solución sustrato es fotosensible, evite su exposición prolongada a la luz. Almacene la solución dentro de la caja del kit, para evitar la exposición a la luz durante su almacenamiento.
- La solución sustrato contiene TMB, que es altamente tóxico. Evite la ingestión, la inhalación y el contacto con la piel y los ojos. Consulte la Ficha de Seguridad.
- Si entra en contacto con alguna sustancia tóxica o irritante, enjuague la zona de la piel afectada con abundante agua. Consulte la Ficha de Seguridad.

## 13. Principio del test

Los kits AlerTox ELISA son ensayos inmunoabsorbentes de tipo sándwich cuantitativos diseñados para la determinación de alérgenos. Durante el ensayo, la muestra se añade a una placa tapizada con anticuerpo que reconoce específicamente el alérgeno. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente (15 - 25 °C) se lavan los pocillos con Solución de Lavado diluida para eliminar el material que no se ha unido. Se añade a los pocillos un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa dirigido contra el mismo antígeno y tras 20 minutos de incubación se lava de nuevo la placa. Después se añade la Solución Sustrato y se incuba durante 20 minutos. Se desarrolla un color azul en los pocillos de la placa. Este desarrollo se inhibe mediante la adición de la Solución Stop, cambiando el color a amarillo, esta señal amarilla se mide fotométricamente a 450 nm.

AlerTox ELISA es un método cuantitativo directo; así, a mayor concentración de alérgeno presente en la muestra, mayor será la señal que aparecerá en la placa.

## 14. Contenido de los kits

Componente	Descripción	96 pocillos
1	Tiras separables de 8 pocillos cada una recubierta de anticuerpos específicos de antígeno. Listas para su uso.	12 tiras
2	5 AlerTox Estándares. Listos para su uso.	5 x 3 mL
2a	5 AlerTox Estándares. 100x concentrado (sólo AlerTox ELISA Casein y AlerTox ELISA Milk).	5 x 1 mL
3	Solución de conjugado; Listo para usarse.	1 x 15 mL
4	Solución sustrato (TMB). Listo para usarse.	1 x 15 mL
5	Solución Stop, (contiene H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ). Listo para usarse.	1 x 15 mL
6	Buffer de Extracción y Dilución de muestra 10x.	4 x 30 mL
6a	Buffer de Extracción y Dilución de muestra 5x (sólo AlerTox ELISA Casein y AlerTox ELISA Milk).	4 x 60 mL
7	Solución de Lavado 10x.	2 x 60 mL

## 15. Condiciones de almacenamiento

- Todos los componentes del kit deben almacenarse entre 2 - 8 °C en oscuridad. NO CONGELAR.
- Volver a almacenar todos los componentes a 2 - 8 °C inmediatamente después de su uso.
- La solución de lavado diluida puede utilizarse durante 4 semanas, siempre que se almacene a 2 - 8 °C.
- El buffer de Extracción y de Dilución de la muestra puede utilizarse durante 1 semana, siempre que se almacene entre 2 y 8 °C. Si apareciesen precipitados cristalinos durante su almacenamiento, caliéntelo a 37 °C durante 15 minutos antes de usarlo.
- Las muestras extraídas son estables hasta al menos 24 horas después, si se almacenan entre 2 y 8 °C, o pueden congelarse para un almacenamiento más prolongado.

## 16. Material necesario no suministrado

- Tubos de ensayo con tapón (15-30 mL).
- Lector de microplacas con filtros de 450 nm.
- Agua destilada.
- Centrífuga.
- Baño termostático (con temperatura ajustable a 60 °C).
- Cronómetro.
- Agitador vórtex.
- Lavador automático de microplacas (opcional).
- Pipetas monocal, pipetas multicanal (recomendado) y puntas.

## 17. Material/equipamiento opcional

- Homogeneizador para la extracción de la muestra a utilizar en el ensayo.
- El uso de una pipeta de repetición reduce al mínimo la deriva del análisis.
- Un dispositivo lavador de placas ELISA reduce el tiempo de lavado y mejora la consistencia.
- Un analizador ELISA completamente automatizado (robots ELISA) ofrece mayor comodidad.

## 18. Preparación de reactivos

Es aconsejable preparar los reactivos inmediatamente antes de su uso y solo la cantidad necesaria para el número de muestras más los 5 estándares, cada uno por duplicado. Tenga en cuenta que todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (15 - 25 °C) en el momento de uso.

### Preparación de los estándares (solo AlerTox ELISA Casein y AlerTox ELISA Milk).

Diluir todos los estándares (incluido el Standard-Zero) 1:100 con el buffer de extracción diluido (20 µl de estándar + 1980 µl de buffer de extracción diluido).

Tenga en cuenta: La concentración mostrada en la curva estándar es la de los estándares diluidos 1:100.

### Preparación del buffer de lavado.

Diluir 1:10 con agua destilada. En caso de que haya precipitado, calentar durante 15 minutos a 37 °C.

### Preparación del buffer de extracción y dilución de la muestra.

Diluir 1:10 con agua destilada. (Solo AlerTox ELISA Casein y AlerTox ELISA Milk:

Diluir 1:5 con agua destilada).

PARA MUESTRAS SÓLIDAS: Debe usarse 0,5 g de muestra más 10 mL del Buffer de Extracción y Dilución de Muestras previamente preparado.

PARA MUESTRAS LÍQUIDAS: Debe usarse 0,5 mL de muestra más 9,5 mL del Buffer de Extracción y Dilución de Muestra previamente preparado.

### Placa ELISA

Cortar la bolsa de aluminio (más allá del cierre zip). Saque solo el número de tiras de pocillos necesarias para las pruebas que vaya a realizar (considere tanto para las muestras como para los 5 estándares, ambos por duplicado) y colóquelas en la carcasa. Los pocillos restantes que no se vayan a utilizar deben mantenerse junto al agente secante en la bolsa de aluminio, bien cerrada, y almacenados a 2 - 8 °C.

## 19. Preparación de muestras

### a) Muestras de vino:

1. Añada 0,5 mL de vino a 9,5 mL de buffer de extracción 1x y mézclelos.
2. Use directamente 100 µl en el ensayo ELISA. Si la muestra es clara, no es necesario centrifugarla. Si no es así, centrifugue tal y como se describe en el punto b) 4. Para otras muestras líquidas proceder con el punto b) 3.

### b) Otro tipo de muestras:

1. Para maximizar la homogeneidad y la representatividad de la toma de la muestra, un mínimo de 5 g de la muestra se deben pulverizar finamente en un mortero, un molino de impacto, etc.
2. Suspender 0,5 g de la mezcla homogeneizada en 10 ml de tampón de extracción 1x.
3. Después, incubar la suspensión durante 15 min en un baño de agua precalentado a 60 °C ( para el kit AlerTox ELISA Crustacean a 40 °C). Para asegurar una buena homogeneidad, las muestras deben agitarse cada dos minutos.
4. Centrifugar las muestras 10 minutos a 2000 x g. Si no es posible separar el sobrenadante del

precipitado completamente, filtrar a continuación el sobrenadante después de la centrifugación. Enfriar el sobrenadante filtrado a temperatura ambiente (15 - 25 °C). (Para los kits AlerTox ELISA Casein y AlerTox ELISA Milk véase también el punto 9. Consejos adicionales.)

- Colocar 100 µl de solución libre de partículas en cada pocillo. Si los resultados de una muestra están por encima del rango de cuantificación, es necesario realizar una dilución más con el buffer diluido de extracción y dilución de la muestra. La dilución adicional tiene que ser considerada cuando se proceda a calcular la concentración.

## 20. Protocolo de lavado (¡El lavado de las placas es un paso muy importante!)

### A) Lavado manual:

Vaciar los pocillos. Pipetear 300 µl de solución de lavado diluida en cada pocillo. Vaciar los pocillos y eliminar el líquido residual golpeando suavemente la placa contra una toalla de papel. A continuación, repita el lavado tantas veces como indique el protocolo. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados falsos.

### B) Lavado automático:

El mantenimiento de los lavadores automáticos es crítico. Programe su lavador para dispensar 300uL de solución de lavado. Tras el último lavado, elimine el líquido residual golpeando la placa contra una toalla de papel.

## 21. Esquema de ejecución del ensayo

↓ Pipetear	→	100 µL de muestra o de patrón, por duplicado, en los pocillos.
↓ Incubar	→	a temperatura ambiente (15 - 25 °C) 20 minutos.
↓ Lavar los pocillos	→	3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.
↓ Pipetear	→	100 µL de anticuerpo anti-alérgeno conjugado en los pocillos.
↓ Incubar	→	a temperatura ambiente (15 - 25 °C) 20 minutos.
↓ Lavar los pocillos	→	5 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.
↓ Pipetear	→	100 µL de solución sustrato en los pocillos.
↓ Incubar	→	a temperatura ambiente (15 - 25 °C) <b>en oscuridad</b> 20 minutos.
↓ Pipetear	→	100µL de solución de stop en los pocillos.
↓ Mezclar bien y esperar	→	1 minuto a temperatura ambiente (15 - 25 °C).
↓ Leer	→	la placa a una longitud de onda de 450 nm.

## 22. Cálculo de los resultados

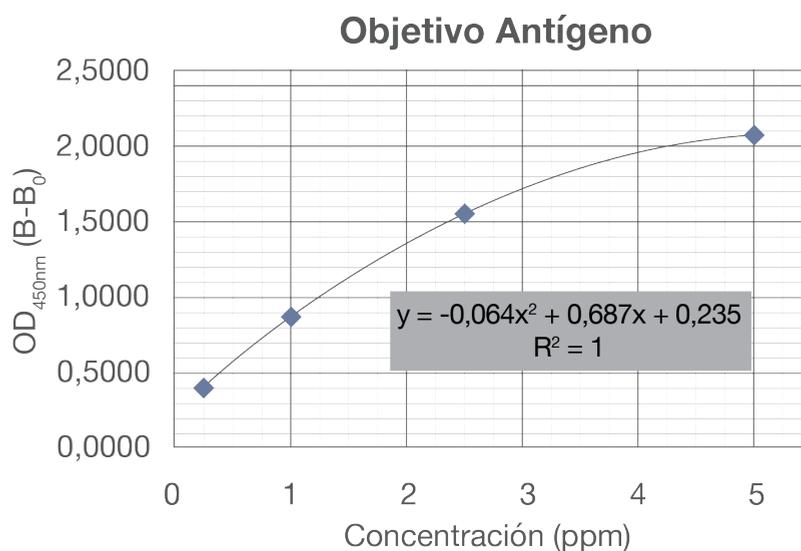
1. Calcule la media de absorbancia ( $OD_{450nm}$ ) de los duplicados de cada condición (estándares y muestras).
2. Reste a la absorbancia media de cada condición el valor de absorbancia medio obtenido con el patrón 0 ( $OD - OD_{Pat. "0"} = B-B_0$ ).
3. Construya una curva patrón representando los valores  $B-B_0$  calculados para los patrones 1-4 (eje y) frente a las respectivas concentraciones de alérgeno en ppm o ppb según el kit (eje x). Calcule la ecuación que define la curva patrón anterior.
4. Para cada muestra, calcule la absorbancia media y a continuación el valor  $B-B_0$  (restándole a la absorbancia media el valor del patrón 0). Introduzca este valor en la ecuación de la recta patrón y despeje la variable "x" para obtener el valor de concentración para dicha muestra. No es necesario multiplicar la concentración resultante de la muestra por el factor de dilución de 20.

**¡NOTA!: Para el cálculo de  $B-B_0$  definir el Stándar Zero en los lectores-software como Blanck. El resultado será el mismo.**

### Ejemplo de datos del ensayo

Estándar	Antígeno [ppm]	DOmedia $_{450nm}$	$B-B_0$
Zero	0.0	0.108	-
1	2.0	0.265	0.157
2	10.0	0.606	0.498
3	25.0	1.193	1.085
4	50.0	1.928	1.820

### Ejemplo de curva estándar



### Ejemplo de diseño de ensayo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0	S0	SP4	SP4	SP12	SP12						
B	S1	S1	SP5	SP5	Etc.	Etc.						
C	S2	S2	SP6	SP6	Etc.	Etc.						
D	S3	S3	SP7	SP7	Etc.	Etc.						
E	S4	S4	SP8	SP8	Etc.	Etc.						
F	SP1	SP1	SP9	SP9	Etc.	Etc.						
G	SP2	SP2	SP10	SP10	Etc.	Etc.						
H	SP3	SP3	SP11	SP11	Etc.	Etc.						

**S0:** Zero-Standard (sin antígeno); valor medio=  $B_0$ ; **S1-4:** Standards; valor medio = B;

**SP:** Samples; valor medio = B.

## 22. Responsabilidad

Los kits de la línea AlerTox ELISA están fabricados con materias primas de gran calidad. Higienda Diagnóstica España no se hace responsable de los resultados obtenidos del uso de los kits para medir otros alérgenos distintos de los indicados en cada producto o con un procedimiento distinto del explicado en este manual de instrucciones. El uso de los kits para otro propósito distinto está fuera de su uso previsto. La responsabilidad por parte de Higienda Diagnóstica España de cualquier daño producido, de forma directa o indirecta, por el uso de estos productos, se limita al reemplazo del producto.



**Americas:**

**Hygiena Headquarters**

941 Avenida Acaso  
Camarillo, CA 93012  
1.805.388.8007

**Hygiena Canada**

2650 Meadowvale Blvd Unit 14  
Mississauga, Ontario L5N 6M5  
1.833.494.4362 (Toll-free) or  
1.416.686.7962

**Hygiena Mexico, S.A. de C.V.**

Calle 3 Anegas 409 Bodega 5, Col. Nueva Industrial  
Vallejo, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07700,  
CDMX, México.  
+52 (55) 5281-4108 y 5281-4146

**International:**

**Hygiena International**

8, Woodshots Meadow  
Watford, Hertfordshire  
WD18 8YU, UK  
+44 (0)1923 818821

**Hygiena (Shanghai) Trading Co., Ltd.**

Rm.7K, No.518, Shangcheng Rd.  
Pudong New District  
Shanghai, China 200120  
+86 21 51321081, 51321077/8/9

**Hygiena Diagnóstica España S.L.**

P. I. Parque Plata, Calle Cañada Real 31-35,  
41900, Camas (Sevilla), Spain  
+34 954 08 12 76

[www.hygiena.com](http://www.hygiena.com)

[enquiries@hygiena.com](mailto:enquiries@hygiena.com)