



INgezim® GLUTEN HIDROLIZADO

Prod Ref: 30.GLH.K2

Ensayo inmunoenzimático directo para la detección y cuantificación de gluten hidrolizado en alimentos.
Direct immunoenzymatic assay for quantitative analysis of hydrolyzed gluten in food samples.

Version Doc:31.05.2024



**GOLD
STANDARD
DIAGNOSTICS**

COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	6 Placas	
	Uni.	Vol.
Tiras rompibles activadas para capturar Prolaminas	6	
Estándar europeo. Punto origen de la curva 400 ppm de Gluten concentrado 100x	1	200µL
AcM anti-Prolaminas conjugado con Peroxidasa, listo para usar	1	8mL
Tampón de Extracción, listo para usar	1	110mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	65mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE29)	1	65mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	15mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado (H2SO4 0,5M) (*)	1	15mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Etanol.

Agua Destilada.

FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

INgezim® GLUTEN HIDROLIZADO es un inmunoensayo enzimático directo. Permite identificar y cuantificar prolaminas (gliadinas, secalinas y hordeínas) hidrolizadas.

Las prolaminas extraídas de la muestra se fijan químicamente al pocillo de la placa de poliestireno donde se dispensa. Tras un paso de lavado se añade el anticuerpo monoclonal R5 conjugado con peroxidasa, el cual se unirá a las prolaminas fijadas. Después de la adición del sustrato, se producirá una reacción colorimétrica directamente proporcional a la cantidad de gluten presente en el pocillo.

Con INgezim® GLUTEN HIDROLIZADO es posible cuantificar la cantidad de gluten hidrolizado de una muestra con un límite de detección de **0,250 ppm de Gluten**.

NOTA: este ensayo NO es válido para analizar bebidas de soja o muestras que contengan soja.

PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente los puntos de la curva patrón siempre que se utilice el kit.
10. **Importante:** El sustrato es muy sensible a la luz y a las contaminaciones. Retirar del bote de sustrato únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver el sobrante al bote.
11. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes deben ser almacenados entre +2°C y +8°C. NO CONGELAR NINGUNO DE ELLOS.

Evitar la exposición del kit y los componentes a la luz del sol, ya que algunos reactivos son sensibles a ella.

INFORMACIÓN SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un frasco lavador, un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µL por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µL de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras hidrolizadas sólidas:

1. Pesar 0,25 g de muestra previamente homogeneizada y depositarlo en un tubo de propileno de 10 mL.
2. Añadir 2,5 mL de tampón de extracción y agitar en vortex (10-15 segundos).
3. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 7,5 mL de etanol al 80% e incubar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm.
6. Pasar el sobrenadante a tubos limpios de propileno y a continuación analizarlos por ELISA.

Muestras hidrolizadas líquidas:

1. Medir un volumen de 5 mL etanol al 60 % y depositarlo en un tubo de propileno de 10 mL.
2. Añadir 125 µL de la muestra y agitar en vortex (10-15 segundos).
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Ésta es la muestra lista para usar en el ELISA.

Muestras hidrolizadas que contengan taninos o polifenoles (chocolate, vino tinto, zumos de frutas coloreados...)

1. En un tubo de propileno de 10 mL, pesar 0.1 g de Polyvinyl-pyrrolidone (Sigma PVP-360).
2. Pesar 0.25 g de muestra del alimento molido y añadirlos al tubo.
3. Añadir 2.5 mL de Tampón de Extracción.
4. Cerrar los tubos y sellarlos con parafilm para evitar la evaporación debida al calor.
5. Mezclar con vortex hasta que la muestra esté completamente mezclada.
6. Incubar los tubos de 20 a 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
7. Añadir a la muestra 7.5 mL de Etanol al 80% e incubar de 20 a 60 min a temperatura ambiente con agitación, (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
8. Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 2000-2500 g a temperatura ambiente.
9. Recoger el sobrenadante en tubos de propileno de 10 mL limpios.
10. Estos extractos en Tampón de extracción-PVPP han de almacenarse a temperatura ambiente.

CONSIDERACIONES GENERALES

El extracto se puede conservar durante 7 días a temperatura ambiente, y hasta 1 mes a 4°C.

Durante el almacenamiento se recomienda sellar perfectamente los tubos con parafilm, para evitar la evaporación del etanol.

La muestra ya preparada se diluirá según los siguientes criterios:

Para determinar ausencia o presencia de gluten hidrolizado.

- Muestras con niveles de gluten inferior a 0,25 ppm: se dispensarán en el pocito 50 µL del diluyente y seguidamente 50 µL de la muestra.

Para cuantificar gluten hidrolizado.

- Para muestras con niveles de gluten hidrolizado esperables menores de 20 ppm se recomienda la dilución de 1/10.
- Para muestras con niveles de gluten hidrolizado esperables entre 20 y 50 ppm se recomienda la dilución de 1/20.
- Para muestras con niveles de gluten hidrolizado esperables entre 50 y 100 ppm se recomienda la dilución 1/40.
- Para muestras con contenidos de gluten hidrolizado superior a 100 ppm se recomiendan dilución de 1/100.

Se proponen las siguientes formas de realizar las diluciones recomendadas:

- **1/10** = 900 µL diluyente + 100 µL muestra
- **1/20** = 950 µL diluyente + 50 µL muestra
- **1/40** = 975 µL diluyente + 25 µL muestra
- **1/100** = 990 µL diluyente + 10 µL muestra

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Conjugado:

Se encuentra listo para usar. Dispensar 100 µL directamente al pocillo.

Estándar europeo (400 ppm de Gluten). Punto origen de la curva patrón (concentrado 100X):

Realizar la dilución 1/100 en el diluyente proporcionado (se recomienda añadir a 990 µL de diluyente 10 µL de punto origen). Este punto se corresponde con el valor de 4 ppm de gluten. Dispensar 100 µL de diluyente en los cinco pocillos que vayan a contener la curva. Después añadir al primero 100 µL de la dilución 1/100 del punto origen recién preparada. A partir de él se realizan diluciones de factor 2 transfiriendo 100 µL de este pocillo a los siguientes y retirando 100 µL del último punto. De este modo se construirá una curva patrón en el que el primer pocillo de 2 ppm corresponderá al control positivo y la curva se construirá con las 4 siguientes diluciones (de 1 ppm a 0,125 ppm). Añadir siempre 100 µL de diluyente a un pocillo como control negativo.

Se recomienda cambiar de punta (tip) en cada dilución y mezclar muy bien antes de transferir los 100 µL al siguiente pocillo (lo más recomendable es hacerlo con la propia pipeta y el tip nuevo cogiendo y soltando de 2 a 3 veces volúmenes de 100 µL).

Muy importante: La curva ha de estar recién preparada cada vez que se incluya en el ensayo.

Solución de lavado:

Diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada. Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.

Adición de muestras y controles. Muy importante, realizar las diluciones tanto de las muestras como del punto origen justo antes de la realización del ensayo.

Muy importante: Para que las muestras y la curva patrón estén en igualdad de condiciones hay que realizar las diluciones de las muestras y la dilución 1/100 del punto origen inmediatamente una tras otra (nunca diluir las muestras, ponerlas en el ensayo y luego hacer la dilución del punto origen para construir la curva).

Para detección de gluten hidrolizado (ausencia o presencia):

1. Dispensar 50 µL del diluyente en todos los pocillos donde se dispensarán las muestras.
2. Añadir 50 µL de las muestras ya extraídas sin diluir. Se recomienda incluir el control positivo e incluir un pocillo con 100 µL de diluyente que sirva de control negativo.
3. Continuar el ensayo a partir del punto 2 del siguiente apartado "Para cuantificación de gluten hidrolizado".

Para cuantificación de gluten hidrolizado:

1. En primer lugar, dispensar 100 µL de las muestras por duplicado (diluídas según instrucciones anteriores). En segundo lugar, construir la curva patrón según instrucciones del punto V.
2. Tapar la placa e incubar **30 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µL de conjugado en cada pocillo. Mantener **30 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)**.
5. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µL de sustrato por pocillo. Mantener la reacción **15 minutos a temperatura ambiente**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar en lo posible este proceso.
7. Añadir 100 µL de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo en el mismo orden en que se añadió el sustrato. En caso de reacción positiva la solución de frenado provocará el cambio de color de azul a amarillo.
8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realizará a 450 nm.

Para ausencia o presencia de gluten hidrolizado.

La aparición de color en el pocillo indica presencia de gluten en la muestra. Una alta intensidad de color no implica que la muestra tenga altas cantidades de gluten. Para cuantificación de gluten hidrolizado.

Para cuantificación de gluten hidrolizado.

VALIDACIÓN DEL TEST:

El test se considerará válido cuando la absorbancia del control positivo (2 ppm) sea superior al primer punto de la curva (1 ppm) y la absorbancia del control negativo inferior a la del punto de 0,125 ppm.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los valores de los puntos de la curva ya tienen en cuenta la dilución normal del proceso de extracción del método. Por tanto, no deben aplicarse factores de multiplicación adicionales. Las ppm finales de la muestra se obtendrán de la fórmula: **ppm = C x D**

Donde:

- **C:** es concentración en ppm determinada en la curva
- **D:** es la dilución aplicada para la realización del ensayo a la muestra extraída.

El contenido de gluten hidrolizado de la muestra se cuantifica de la siguiente manera:

- Construir la curva patrón (ver ejemplo) a partir de las absorbancias de la curva patrón construida.
- Añadir línea de tendencia del tipo lineal y agregar ecuación (ver ejemplo).
- Determinar la concentración de gluten hidrolizado de la muestra interpolando su valor de absorbancia en dicha curva (ver ejemplo) y multiplicarlo por la dilución.

Para ello se usa el software apropiado. Por ejemplo:

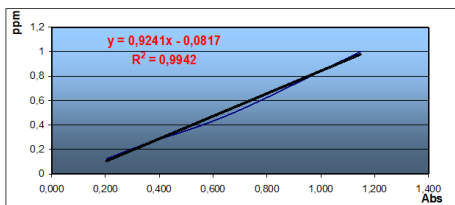
- Software: Excel (Microsoft).
- Seleccionar tanto las concentraciones como las DO obtenidas y pinchar en “asistente para gráficos”.

- Seleccione tipo de gráfico: “XY (dispersión)” y “terminar”.
- Pinchar en la ventana superior “Gráfico” y seleccionar “Agregar línea de tendencia”.
- En el nivel “Tipo”, seleccionar “Lineal”.
- En el nivel “Opciones”, seleccionar “Presentar ecuación en el gráfico”.
- En esta ecuación sustituir la X por la DO de la muestra para obtener las ppm de GLUTEN HIDROLIZADO.

La cantidad final de gluten de la muestra se realizará multiplicando la concentración obtenida en la curva por la dilución.

Ejemplo:

Abs 450	ppm
2,326	Control pos
1,148	1
0,676	0,5
0,354	0,25
0,205	0,125
0,058	Control neg



INFORMACIÓN ADICIONAL

- Para que los cálculos realizados sean correctos, los valores de absorbancia de las muestras deben estar incluidos dentro de la curva (0,125 - 1 ppm de gluten). En caso contrario se debe repetir el ensayo con otras diluciones de la muestra. Solo en el caso de que la absorbancia de la muestra sea hasta un 15% superior al punto de 1 ppm se podrá incluir el control positivo como punto de 2 ppm en la curva.
- Valores bajos en la curva patrón suelen deberse a la temperatura de incubación o a que ha pasado mucho tiempo entre la construcción de la curva y la realización del ensayo. Asegurarse de que la temperatura está entre los límites indicados (entre 22-25°C). Construir la curva por diluciones seriadas tal y como se indica en las instrucciones.

Anexo I

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

1. Los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 22-25°C) antes de comenzar.

2. Añadir 100 µL de muestra (preparada y diluida tal y como se describe en el punto VI), por duplicado. A continuación, construir los puntos de la curva patrón tal y como se indica en el punto V. Tapar la placa
3. Incubar a temperatura ambiente (entre 22-25°C) durante **30 minutos**.
4. Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado diluida (1x).
5. Añadir 100 µL de AcM Conjugado con Peroxidasa a cada pocillo. Cubrir la placa.
6. Incubar a temperatura ambiente (entre 22-25°C) durante **30 minutos**.
7. Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado.
8. Añadir 100 µL de sustrato (TMB) a cada pocillo.
9. Incubar **15 minutos** a temperatura ambiente.
10. Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo.
11. Leer a 450 nm.

KIT COMPOSITION

REAGENT	6 Plates	
	Uni.	Vol.
Breakable strips activated for capturing Prolamins	6	
European Standard. Original standard point 400 ppm of Gluten 100x concentrated	1	200µL
Anti-Prolamins Mab-Peroxidase conjugate, ready to use	1	8mL
Bottles with Extraction Buffer, ready to use	1	110mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	65mL
Bottles with Diluent (DE29)	1	65mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	15mL
Bottles with Stop Solution (H2SO4 0.5M) (*)	1	15mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Ethanol.
Distilled water.

TECHNICAL BASIS

INgezim® GLUTEN HIDROLIZADO is a direct enzyme immunoassay. It can identify and quantify hydrolyzed prolamins (gliadina, hordein and secalins).

Prolamins extracted from the sample are chemically fixed to the polystyrene plate wells. After a washing step, the peroxidase-conjugated R5 Mab is added, which will bind to the fixed prolamins. After the addition of the substrate, a colorimetric reaction occurs. This reaction is directly proportional to the amount of gluten in the well.

With INgezim® GLUTEN HIDROLIZADO is possible to quantify the amount of hydrolyzed gluten of a sample with a detection limit of **0,25 ppm**.

NOTE: this kit should not be used for testing soy drink samples, or samples containing soy.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the use instructions carefully
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handle.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for every new sample.
9. Include the controls and the standard curve every time the assay is run.
10. **Important:** TMB Substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination: pipette a sufficient amount for the assay from the substrate storage bottle into a separate container prior to colour development step. Do not return the non used reagent to the storage bottle.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care.

STORAGE OF COMPONENTS

All components must be stored between +2°C and +8°C. **DO NOT FREEZE ANY OF THE KIT COMPONENTS.**
Avoid exposure of the kit and the components to direct sunlight at any time, as some reagents are light sensitive.

INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps could be done using an automatic washing machine, a squeeze bottle or a multichannel pipetting device, suitable for dispensing 300 µL on each well. After the incubation periods, the washing steps must be done following these instructions:

- Throw out the content of the plate by a brusque turn over of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µL of washing solution on every well.
- Shake the plate gently, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicates the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to use. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After emptying the contents of the last washing step, tap the plate turned over on absorbent filter paper to remove the remaining washing solution.

PREPARATION OF SAMPLES

Solid hydrolysed samples:

1. Weigh 0.25 g of sample previously homogenized and put it in a polypropylene tube of 10 mL.
2. Add 2.5 mL of extraction buffer and Vortex (10-15 seconds).
3. Incubate for 30 minutes at room temperature.
4. Add 7.5 mL of 80% ethanol and incubate 10 minutes at room temperature with agitation.
5. Centrifuge 10 min at 10.000 rpm.
6. Transfer the supernatant to clean polypropylene tubes and then analyze by ELISA.

Liquid hydrolysed samples:

1. Measure a volume of 5 mL 60% ethanol and put it in a 10 mL polypropylene tube.
2. Add 125 µL of the sample and Vortex (10-15 seconds).
3. Incubate 5 minutes at room temperature.
4. This is the sample ready to be analyzed in the ELISA.

Extraction of hydrolysed samples containing tannins or polyphenols (chocolate, red wine, fruit juices...)

1. In a 10 mL propylene tube, weight 0.1 g of Polyvinyl-pyrrolidone (Sigma PVP-360).
2. Weight 0.25 g of the milled food sample and add it to the tube.
3. Add 2.5 mL of Extraction Buffer.
4. Close the tubes and seal them with parafilm in order to avoid evaporation due to heat.
5. Mix by vortex until the sample is completely mixed.
6. Incubate tubes between 20 and 60 minutes at room temperature.
7. Add 7.5 mL of 80% Ethanol to the sample and incubate between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation** (a rotatory shaker at 45 turns per minute is recommended).
8. Centrifuge the samples 10 minutes at 2000-2500 g at Room Temperature.
9. Collect the supernatant into clean 10 mL propylene tubes.
10. These extracts should be stored at Room Temperature.

GENERAL INDICATIONS

The extracted samples may be kept 7 days at room temperature (or 1 month at 4°C), before performing the ELISA test. While stored, close tightly the vials with parafilm in order to avoid evaporation.

Before adding to the ELISA plate wells, the samples should be diluted as follows:

To detect absence or presence of hydrolyzed gluten.

- For samples with estimated hydrolyzed gluten content lower than 0,25 ppm add 50 µL of the diluent in the well and then 50 µL of the sample.

To quantify hydrolyzed gluten.

- Samples with estimated hydrolyzed gluten content lower than 20 ppm: make dilution 1/10, using the supplied diluent.
- Samples with hydrolyzed gluten content between 20-50 ppm: make dilutions 1/20, using the supplied diluent.
- Samples with gluten content between 50-100 ppm: make dilutions 1/40, using the supplied diluent
- Samples with hydrolyzed gluten content higher than 100 ppm: make dilutions 1/100, using the supplied diluent.

Dilution procedure:

- **1/10** = 900 µL of diluent + 100 µL of sample.
- **1/20** = 950 µL of diluent + 50 µL of sample.
- **1/40** = 975 µL of diluent + 25 µL of simple.
- **1/100** = 990 µL of diluent + 10 µL of sample.

PREPARATION OF REAGENTS

Conjugate:

It is supplied ready to use. Do not dilute. Add 100 µL directly to the well.

European standard (400 ppm of Gluten). Original standard point (100X concentrated):

The original standard point must be diluted 1/100 in diluent (put 10 µL of the original point into 990 µL of diluent). This dilution corresponds to 4 ppm of gluten. Add 100 µL of diluent in five wells. Add 100 µL of the diluted original point in the first well. Then, transfer 100 µL of this first well to the second well. Repeat the operation until the last well and remove 100 µL of this last well. The first well (2 ppm) will be the positive control and the standard curve should be performed with the rest of the wells (from 1 ppm to 0.125 ppm). Always add 100 µL of diluent to a separate well as a Negative Control.

It is recommended changing the tip with every dilution and mix well before transferring the 100 µL to the following well (for mixing, take the 100 µL volume with the pipette and throw it into the well 2 or 3 times).

Very important: the curve must be prepared at the moment, every time the assay is going to be performed

Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water. When ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

TEST PROCEDURE

All reagents must be allowed to come to room temperature before use.

Addition of samples and controls. Both samples and standards dilution must be prepared just before performing the assay.

Very important: In order to keep the samples and the curve in the same conditions, make the dilutions of samples and the dilution of the original point immediately one after the other. Never dilute the samples, put them into the wells and then dilute the original point to perform the standard curve.

To determine absence or presence of hydrolyzed gluten:

1. Add 50 µL of diluent in the wells where samples will be dispensed.
2. Add 50 µL of the extracted samples (without dilution). It is recommended to include a positive control and 100 µL of diluent as negative control.
3. Continue with the assay from point 2 of the following paragraph "To quantify hydrolysed gluten"

To quantify hydrolyzed gluten:

1. Add 100 µL of the samples (diluted according to instructions above) by duplicate. Then perform the standard curve following the instructions of point V.
2. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at room temperature (22-25°C).**
3. Wash 3 times as described above.
4. Add 100 µL of specific conjugate to the wells Seal the plate and incubate **30 minutes at room temperature (22-25°C).**
5. Wash 3 times as described above.
6. Add 100 µL of TMB substrate to the wells. Keep the plate for **15 min at room temperature.** The use of a multichannel pipette is recommended.
7. Add 100 µL of stop solution to each well following the substrate's order of addition. A positive reaction will change the colour from blue to yellow.
8. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

Read the OD of each well at 450 nm.

To determine absence or presence of hydrolyzed gluten.

If colour appears, it indicates the presence of gluten in the sample. High colour intensity does not mean a high amount of gluten in the sample.

To quantify hydrolyzed gluten.

VALIDATION OF THE TEST:

The test should be considered as valid when the OD of 2 ppm point is higher than the OD of the 1ppm point; and the OD of the negative control is lower than the OD of 0.125 ppm point.

RESULTS INTERPRETATION:

The standards of the kits already take into consideration the dilution factor performed during the extraction step indicated in this package insert. So, additional multiplied factor should not be used.

The ppm of the sample are calculated from the following formula: **ppm = C x D**

Where:

- **C:** is the ppm concentration obtained from the curve.
- **D:** is the dilution applied to the extracted sample.

The hydrolyzed gluten content of the sample is quantified as follows:

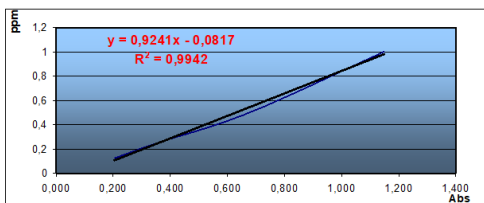
- Plot the calibration curve (see example) using the absorbances of the four points of standard curve.
- Add trend line and add a lineal equation (see example).
- Determine the concentration of hydrolyzed gluten sample by interpolating the absorbance value in the curve (see example).

To achieve this, use the appropriate software. For example:

- Software: Excel (Microsoft).
- Select the standards concentrations and their correspondent OD values. Then click on "Graphic assistant".
- Select type of graphic: "XY (dispersion)".
- Click on graphic windows and select "Add tendency line".
- In label "type", click on "LINEAL".
- In label "Options", click on "Present formula in the graphic".
- In this formula, replace the unknown factor "x" by the sample OD value to obtain the ppm of HYDROLYZED GLUTEN.
- The final content of gluten of the sample will be obtained by multiplying the concentration from the standard curve by the applied dilution.

Example:

Abs 450	ppm
2,326	Control pos
1,148	1
0,676	0,5
0,354	0,25
0,205	0,125
0,058	Control neg



ADDITIONAL INFORMATION

- To assure that the calculations are correct, the absorbance values of samples should be in the range of curve (0.125 - 1 ppm of gluten). It may be necessary to dilute the sample to achieve these results. If so, it is important to apply the dilution factor in the calculation of results.
- Just in case the OD value of the sample is slightly higher than the OD of the 1 ppm point (up to 15%), it can be interpolated into the curve, including the positive control (2ppm) into the curve.
- Low values of the calibration curve are often caused by incubation temperature or because too much time has passed between the construction of the curve and the performance of the assay. Make sure you are at these limits (22-25°C). Perform the standard curve making serial dilution as indicated in the instructions.

Annex I

OVERVIEW OF PROCEDURE

1. Reagents must be equilibrated at room temperature (22-25°C) before start.
2. Make the samples dilution and the original point dilution
3. Add 100 µL of **samples** (prepared and diluted as described in point VI) in duplicated wells.
4. Perform the curve in the wells and add 100 µL of diluent as **negative control**. Seal the plate.
5. Incubate at room temperature (22-25°C) for **30 minutes**.
6. Wash wells 3 times with diluted wash solution (1x) to remove not bound reagents.
7. Add 100 µL of **Conjugated**-Peroxidase to every well. Seal the plate.
8. Incubate at room temperature (22-25°C) for **30 minutes**.
9. Wash wells 3 times with diluted wash solution (1x).
10. Add 100 µL of substrate (TMB) to every well.
11. Incubate **15 minutes** at room temperature.
12. Add 100 µL of stop solution to every well.
13. Read at 450 nm.

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA

C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



Distribuido en
Distributed in

por
by