

SENSISpec INgezim GLUTEN R5

Prod Ref: 30.GLU.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección y cuantificación de gluten en alimentos

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for quantitative analysis of gluten in food samples

Última revisión / Last revision: 05-06-2020



COMPOSICION DEL KIT

Reactivo	1 placa (8x12 pocillos)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación (8x12 pocillos) recubierta con el AcM R5, específico de gliadinas, secalinas y hordeínas	1	
Control Positivo listo para su uso	1	1.5 mL
Control Negativo listo para su uso	1	1.5 mL
Punto control (20 X concentrado)	1	250 µL
Estandar europeo de gliadina a las concentraciones de 25 ng/ml, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.12 ng/mL y 1.56 ng/ml listos para su uso	5	1.5 mL
AcM R5 anti gliadina, secalina, hordeína, conjugado con peroxidasa (listo para su uso)	1	15 mL
Tampón de extracción, listo para su uso	1	110 mL
Solución de lavado (25x concentrado)	1	65 mL
Diluyente (DE12-05) (5x concentrado)	1	65 mL
Sustrato (TMB)	1	15 mL
Solución de frenado (H ₂ SO ₄ 0,5M)	1	15 mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Etanol
Agua Destilada

El kit **SENSISpec INgezim Gluten R5** ha sido aprobado como **AOAC Research Institute Performance Tested MethodsSM**, con el número de certificación **#052005**, para mezcla de pan sin gluten, harina de avena y muestras de superficies de acero inoxidable.

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Ingezim gluten es un inmunoensayo enzimático Sándwich de doble anticuerpo. Sobre un soporte de poliestireno recubierto con el **anticuerpo monoclonal R5 (AcM) que reconoce específicamente gliadinas, secalinas y hordeínas**, se añade la muestra. En el caso de que contenga gluten, estas proteínas serán capturadas y quedarán fijadas al pocillo. Tras un paso de lavado para eliminar el material no adherido se añade el mismo AcM (R5) esta vez conjugado con peroxidasa, que se unirá a las

gliadinas anteriormente fijadas. Tras otro paso de lavado la presencia de la AcM peroxidasa se detecta tras la adición de un sustrato adecuado a la peroxidasa (TMB) que producirá una reacción colorimétrica medible.

Con INgezim Gluten es posible cuantificar la cantidad de gluten de una muestra con un límite de cuantificación 3 ppm de Gluten.

II. 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 controles y 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.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION 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.

IV. INFORMACION 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.

V. PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

- **Conjugado, Controles y puntos de la curva patrón**

Se encuentran listos para usar y no precisan de ningún tratamiento. Añadir 100 µl de cada solución directamente al pocillo.

- **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, hasta la fecha de caducidad del kit.

- **Diluyente**

Diluir un volumen de solución concentrada en 4 volúmenes de agua destilada. Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C, hasta la fecha de caducidad del kit.

- **Punto control**

Realizar dilución 1:20 en diluyente (ej. 25 µL + 475 µL de diluyente). Agitar bien la solución antes de su utilización.

Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

VI. PREPARACION DE LA MUESTRA

Muestras procesadas por calor o que contengan soja:

1. Pesar 0.25 g de la muestra de alimento molido y depositarlo en un tubo de propileno de 10 ml.
2. Añadir al tubo 2.5 mL del tampón de extracción.
3. Cerrar los tubos con el tapón rosca/presión y sellarlos con papel parafilm para evitar evaporación.
4. Mezclar en el vortex (5-10 segundos)
5. Incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación). Se recomienda agitar la mezcla 2-3 veces durante la incubación.
6. Añadir 7.5 ml de etanol al 80%, agitar con vortex durante 10-60 segundos e incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación), **con agitación** (se recomienda un agitador rotatorio de 45 revoluciones por minuto).
7. Centrifugar a 2000-2500 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
8. Pasar el sobrenadante a tubos limpios de propileno y a continuación analizarlos por ELISA.

Muestras no procesadas por calor y que no contengan soja.

1. Pesar 0.25 g de la muestra de alimento molido y depositarlo en un tubo de propileno de 10 ml.
2. Añadir 10 mL de etanol al **60%** e incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación), **con agitación**
3. Centrifugar a 2000-2500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Pasar el sobrenadante a tubos limpios de propileno y a continuación analizarlos por ELISA.

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

1. En un tubo de propileno de 10 mL, pesar 0.25 g de gelatina y 0.1 g de Polyvinyl-pyrrolidone. (Polyvinylpyrrolidone Sigma PVP-360) (Gelatina de pescado Sigma No. G-7041).
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-gelatina han de almacenarse a temperatura ambiente.

Muestras de superficie (tomadas con torunda)

IMPORTANTE: *este procedimiento sólo sirve para tener una idea de la posible presencia/ausencia de gluten en una superficie.*

Con las muestras tomadas con torunda no es posible cuantificar, ya que no sabemos de qué cantidad de muestra partimos.

Teniendo en cuenta que con la torunda se coge poca cantidad de muestra, el procedimiento es igual que

el normal, pero usando menores volúmenes de solución de extracción y etanol (manteniendo siempre la misma proporción que el tratamiento original).

1. Una vez tomada la muestra, cortar la torunda e introducirla en un tubo de propileno de 10 mL.
2. Añadir al tubo 1mL de Solución de Extracción.
3. Cerrar el tubo con el tapón/rosca a presión y sellarlo con parafilm para evitar la evaporación.
4. Mezclar en el vortex (5-10 segundos).
5. Incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
6. **Sin sacar la torunda**, añadir 3mL de etanol al 80%, agitar con vortex durante 10-60 segundos e incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación), **con agitación**.
7. Sacar la torunda y analizar en el ELISA las diluciones 1:12.5 y 1:25 de la solución resultante.
8. Comparar los valores de Densidad Óptica de dichas diluciones con el estándar inferior proporcionado con el kit, para poder tener una idea de la posible presencia/ausencia de gluten en la muestra de superficie analizada (considerando siempre el Límite de Detección del Ensayo)

INDICACIONES 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 muestras con niveles de gluten esperables menores de 50 ppm de gluten se recomiendan las diluciones 1:25 y 1:50.*
- *Para muestras con niveles esperables entre 50 y 100 ppm se recomiendan las diluciones 1:50 y 1:100*
- *Para muestras con contenidos de gluten entre 100 y 200 ppm se recomiendan diluciones entre la 1:100 y 1:200.*
- *Para muestras con contenidos de gluten entre 200 y 300 ppm se recomiendan diluciones entre la 1:200 y 1:400.*
- *Para muestras con contenidos de gluten entre 300 y 600 ppm se recomiendan diluciones entre la 1:400 y 1:800.*

Se recomiendan las siguientes formas de realizar las diluciones propuestas:

1:25 = 960µL diluyente + 40µL muestra

1:50 = 980µL diluyente + 20µL muestra

1:100 = 990µL diluyente + 10µL muestra

1:200 = 1990µL diluyente + 10µL muestra

1:400 = 1995µL diluyente + 5µL muestra

1:800 = 3995µL diluyente + 5µL muestra

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit, al menos 30 min a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µL del control positivo y negativo así como de los 5 puntos de la curva patrón, **por duplicado**. Dispensar seguidamente 100 µL de las muestras (diluidas según instrucciones anteriores) también por duplicado.
Tapar la placa e incubar **1 hora a temperatura ambiente (22-25°C)**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100µL de conjugado en cada pocillo. Mantener **1 hora a temperatura ambiente (22-25°C)**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar en lo posible este proceso
5. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µL de sustrato por pocillo. Mantener la reacción **10 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.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realizará a 450nm

Validación del test:

El test se considerará válido cuando la absorbancia del control positivo sea superior al punto de 25 ng/mL y el control negativo inferior al punto de 1.56 ng/mL.

Interpretación de los resultados:

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

- Construir la curva patrón (ver ejemplo)
- Determinar la concentración de gliadina de la muestra extrapolando su valor de absorbancia en dicha curva (ver ejemplo).
- Con este dato aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de gluten en la muestra:

$$\text{ppm de gluten} = C \times D \times 2 \times 40 / 1000$$

C: es la concentración de gliadina de la muestra determinada en la curva

D: es el factor de dilución de la muestra (25, 50, 100, 200, 400, 800, etc.

2: factor que se aplica para convertir gliadina en gluten.

40: factor que se aplica porque 0.25g de alimento son extraídos con 10 ml de solución de extracción

1/1000: factor que procede de la conversión de ng/ml en ppm.

INFORMACION ADICIONAL

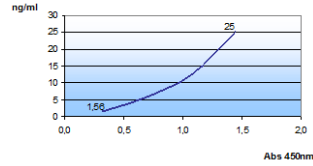
- Para que los cálculos realizados sean correctos, los valores de absorbancia de las muestras deben estar incluidos dentro de la curva. En caso contrario se debe repetir el ensayo con otras diluciones de la muestra.
- Sólo en el caso en el que el valor de absorbancia obtenido sea ligeramente superior al punto de 25 ng/mL (hasta un 15%) podrá darse por válido el ensayo pero habrá que incluir en la curva patrón el control positivo, ya que este se corresponde con el punto de 50 ng/mL.
- **Punto control:** Este es un punto de control interno del ensayo pensado para comprobar en cualquier momento el buen funcionamiento del kit. Por tanto, no es obligatorio su uso, aunque sí recomendable.

Modo de uso:

- Diluir 1:20 en el diluyente y añadir 100 µL al pocillo para realizar el ensayo.
- Su D.O debe de ser como el punto de 25 ng/mL permitiéndose una desviación de ± 0.2
- Si este valor de D.O se trata como si fuera una muestra y se incluye en la fórmula para determinar la cantidad de gluten, su valor será de 40 ± 8 ppm de gluten.

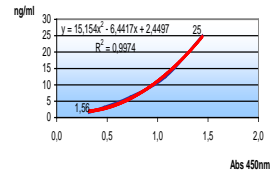
EJEMPLO:

	ng/ml de gliadina	Abs450
1)	25	1.44
2)	12,5	1.08
3)	6,25	0.73
	3,12	0.47
	1.56	0.32



4) La concentración de gliadina de la muestra (C) se puede extrapolar de la curva estando usando 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 "Polynomial"
- ✓ En el nivel "Opciones", seleccionar "Presentar ecuación en el gráfico".
- ✓ En esta ecuación sustituir la X por la DO de la muestra para obtener el valor "C"



Muestra	Dilución(D)	DO	ng/ml de gliadina (C)*	ppm de gluten	Media (ppm de gluten)
A	1:25	0.31	Fuera de limites	<3	<3
	1:50	0.26		<3	
B	1:50	1.17	15.66	62.63	63
	1:100	0.85	7.92	63.38	
C	1:200	1,31	20.02	320	299
	1:400	0.89	8.72	279	
Punto control (32-48)	1:20	1.49	26.49	42	

*Obtenido reemplazando DO de la muestra por el X en la línea de tendencia

IX. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO:

1. Los reactivos deben almacenarse a temperatura ambiente (**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.
3. Añadir 100 µL de los **estándares** y del **control positivo**. Tapar la placa.
4. Incubar a temperatura ambiente (**22-25°C**) durante 60 minutos.
5. Lavar los pocillos 3 veces con **solución de lavado diluida** para eliminar los reactivos no unidos.
6. Añadir 100 µL de Anticuerpo Monoclonal **Conjugado** con Peroxidasa a cada pocillo. Cubrir la placa.
7. Incubar a temperatura ambiente (22-25°C) durante 60 minutos.
8. Lavar los pocillos 3 veces con **solución de lavado diluida** para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
9. Añadir 100 µL de **substrato (TMB)** a cada pocillo.
10. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Añadir 100 µL de **solución de frenado** a cada pocillo.
12. Leer a 450 nm.

SENSISpec INgezim GLUTEN R5
30.GLU.K.2

KIT COMPOSITION

Reagent	1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
96 well microtitration plates (12x8 wells) coated with the R5 Mab, specific for gliadin, secalin, and hordein	1	
Positive control ready to use	1	1.5 mL
Negative control ready to use	1	1.5 mL
Control point (20 x concentrated)	1	250 µL
Vials with Gliadin European Standard containing solutions of 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.12 ng/mL and 1.56 ng/mL ready to use	5	1.5 mL
Vials with an anti-gliadin, secalin and hordein R5 Mab-peroxidase conjugate (ready to use)	1	15 mL
Bottle with extraction buffer (ready to use)	1	110 mL
Bottle with Washing solution 25x concentrated	1	65 mL
Bottle with Diluent (DE12-05) (5x concentrated)	1	65 mL
Bottle with Substrate (TMB)	1	15 mL
Bottle with Stop Solution (H ₂ SO ₄ 0,5M)	1	15 mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Ethanol
Distilled water

The **SENSISpec INgezim Gluten R5** kit has been granted **AOAC Research Institute Performance Tested MethodsSM** status, and assigned certification number **#052005**, for gluten-free bread mix, oat flour and stainless steel surfaces.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a double antibody sandwich enzyme immunoassay (DAS or capture Elisa). We make a brief description of the technique below:

The plate is coated with the **R5 monoclonal antibody (Mab)**, which recognises an epitope common to gliadins, secalins and hordeins. Therefore, when a sample is added into the wells, the capture R5 Mabs will bind the gliadins present in it. A second R5 Mab, conjugated with Peroxidase is added after a washing step.

This conjugated Mab will bind to the captured gliadins and after a washing step the peroxidase action will be detected by adding the TMB substrate. Change of the colourless substrate solution into a blue product and then, after addition of stop solution, into a yellow colour can be measured with an ELISA reader.

Gliadin content of the samples will be determined by extrapolation of their OD in the calibration curve done with the gliadin standard supplied with the kit. The sensitivity of the assay is 3 ppm of gluten.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (22° - 25°C) 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 handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each 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, it is very sensitive to light and contamination: pipette a sufficient amount for the assay from the substrate storage bottle into a separate dark container prior to colour develop step.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care

III. STORAGE OF THE KIT 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.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS:

The washing steps may be done using a squeeze bottle, an automatic washing machine or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µL on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the next instructions:

- Turn over the plate briskly to empty the wells.
- Repeat the process as many times as are indicated in the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate 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 bulk of the remaining washing solution.
- Throw out the content of the plate by a brisk 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 each well.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.

V. PREPARATION OF REAGENTS:

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 at +4°C, until the expiration date of the kit.

Dilution buffer:

Dilute one part of the concentrate dilution buffer provided in the kit with 4 parts of distilled or deionized water. When ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C, until the expiration date of the kit.

Conjugate, Controls and Standards:

They are supplied ready to use. Do not dilute. Add 100 µL of each solution directly to the well.

Control Point

Dilute 1/20 with the Dilution Buffer (i.e. 25µL + 475µL of Dilution Buffer). Shake well before use. Only prepare the necessary volume, as the remaining volume should be discarded.

VI. SAMPLES PREPARATION:

Extraction of Heat-processed products or products containing Soya.

1. Weigh 0.25 g of a milled food sample and place it in a 10 ml propylene tube.
2. Add 2.5 mL of the Extraction buffer to the tube containing the sample.
3. Close the tube tightly and cover the cap with parafilm to avoid evaporation.
4. Mix thoroughly by vortexing (5-10 seconds) and place the tubes in a rack.
5. Incubate the tubes between 20 and 60 minutes at room temperature. During this incubation period, vortex the sample 2-3 times.
6. Open the tubes, add 7.5 ml 80% ethanol, thoroughly disperse the samples by vortexing 10 to 60 seconds and incubate between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation** (a rotatory shaker at 45 turns per minute is recommended).
7. Centrifuge the tubes for 10 min at 2000-2500 g at room temperature
8. Take the supernatants with fresh Pasteur pipettes and transfer to clean 10 mL polypropylene tubes. The solution is now ready for ELISA.

Extraction of Non Heat-processed products and products non-containing Soya.

1. Weigh 0.25 g of a milled, food sample and place it in a 10 ml propylene tube.
2. Add 10 ml of **60%** ethanol and incubate between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation**.
3. Proceed to step 7 of the *heat processed products extraction*

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

1. In a 10 mL propylene tube, weight 0.25 g of Gelatin and 0.1 g of Polyvinyl-pyrrolidone. (Polyvinylpyrrolidone Sigma PVP-360) (Fish Gelatine Sigma No. G-7041).
2. Weigh 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 revolutions 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

EXTRACTION OF SWAB SAMPLES

IMPORTANT NOTE: *this procedure can only be used for a qualitative detection of gluten (absence/presence) in a surface sample.*

Swab samples should not be used for quantification, as the initial amount of sample in the swab is unknown.

Considering that using a swab, only a little amount of sample can be taken, the extraction procedure is similar to the "normal" one, but using less volume of Extraction Buffer and Ethanol (as long as the original proportion is maintained):

1. Once the sample has been taken, cut the tip of the swab and put it into a 10mL propylene tube.
2. Add 1mL of Extraction Buffer to the tube.
3. Close the tube tightly with the cap and seal it using Parafilm in order to avoid evaporation.
4. Vortex for 5-10 seconds.
5. Incubate between 20 and 60 minutes at room temperature.
6. Add 3mL of Ethanol (80%), vortex for 10-60 seconds and incubate between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation**. **IMPORTANT: do not remove the swab from the tube at this step.**
7. Remove the swab after the incubation and use the solution for the ELISA (dilutions 1:12.5 and 1:25).
8. Compare the OD values of both dilutions with the OD of the lower standard, in order to have an idea about the absence/presence of Gluten on the sample surface. The results should be

reported considering the Limit of Detection of the assay (3ppm of Gluten).

GENERAL INSTRUCTIONS

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.

The samples should be diluted as follows before adding to the ELISA plate wells:

- 1) Samples with estimated gluten contents lower than 50 ppm: make dilutions 1:25 and 1:50, using the supplied diluent.
- 2) Samples with gluten contents between 50-100 ppm: make dilutions 1:50 and 1:100
- 3) Samples with gluten contents between 100-200 ppm: make dilutions 1:100-1:200
- 4) Samples with gluten contents between 200-300 ppm make dilutions 1:200 and 1:400
- 5) Samples with gluten contents between 300-600 ppm make dilutions of 1:400 and 1:800.

Dilution procedure:

- 1:25 = 960µL of diluent+40µL of sample
- 1:50 = 980µL of diluent+20µL of sample
- 1:100 = 990µL of diluent+10µL of sample
- 1:200 = 1,990µL of diluent+10µL of sample
- 1:400 = 1,995µL of diluent+5µL of sample
- 1:800 = 3,995 µL of diluent+5µL of sample

VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use (about 30 min.).
2. Add 100 µL of controls and standard solutions to duplicate wells. Add 100 µL of samples (diluted as explained above), to the remaining wells. We recommend the use of two wells per diluted sample. Seal the plate **and incubate 1 h at room temperature (22-25°C)**.
3. Wash 3 times as specified in point IV (Washing steps).
4. Using a multi-channel pipette, add 100 µL of specific conjugate to each well seal the plate **and incubate 1 h at room temperature (22-25°C)**.
5. Wash 3 times as before.
6. Using a multi-channel pipette, add 100 µL of TMB substrate to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**
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.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Validation of the test

The test could be considered valid when:

- ⇒ The OD of the Positive control is higher than OD of the 25ng/mL point and the OD of the Negative Control is lower than the OD of the 1.56 ng/mL point.

Interpretation:

The OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of the duplicates OD values.

Enter on the x-axis the mean OD values obtained for the five standards and on the y-axis the corresponding ng/ml values to represent the curve.

Sample gliadin concentration (C) should be obtained by interpolation of the OD value in the curve standard.

Sample gluten content (ppm) will be calculated as follows:

$$\text{ppm of gluten} = C \times D \times 2 \times 40 / 1000$$

where:

C: Gliadin concentration of the sample calculated from the calibration curve in ng/mL.

D: Dilution factor of the sample (25,50,100,etc)

2: Factor applied to express the results in gluten concentration

40: Dilution factor applied in the sample preparation (0.25g in 10 ml of extraction solution).

1/1000: Conversion from ng/mL to ppm

ADDITIONAL INFORMATION

- In order to obtain correct values, the OD values of the samples should be included between the OD values of the standard curve. If not, the assay should be repeated using different dilutions of the samples.
- Just in case the OD value of the sample is slightly higher than the OD of the 25 ng/mL point (up to 15%), the assay is valid. In this case you have to include the positive control in the curve, as it corresponds to 50ng/ml of gliadin.
- **Control Point:** This is an internal Control Point included in the kit in order to assure

that the assay is properly working. It is not necessary to use it, but it is recommended.

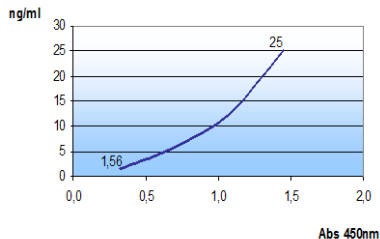
Procedure for analyse the Control Point:

- Dilute 1:20 with Dilution Buffer and add 100µL into the correspondent well.
- The OD of this point should be similar to the OD of the 25ng/mL point, with a deviation of ± 0.2
- Interpolating this OD value into the standard curve (for the determination of the content of gluten), the final value should be 40 ± 8 ppm of Gluten.

EXAMPLE:

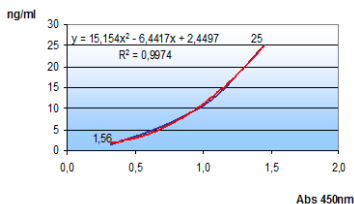
- 1) OD of Positive Control = 1.82
- 2) OD of Negative Control = 0.13
- 3) OD of the standards points (concentration is expressed in ng/mL of gliadin):

25 ng/mL = 1.44
12.5 ng/mL = 1.08
6.25 ng/mL = 0.73
3.12 ng/mL = 0.47
1.56 ng/mL = 0.32



4) Sample gliadin concentration (C) is obtained interpolating the sample OD value in the standard curve or using the appropriate software. For example:

- ✓ Software: Excel (Microsoft)
- ✓ Once obtained the gliadin standards OD values, click on "Graphic assistant"
- ✓ Select type of graphic: "XY (dispersion)
- ✓ Click on graphic windows and select " Add tendency line"
- ✓ In label "type", click on "polynomial"
- ✓ In label "Options", click on " Present formula in the graphic"
- ✓ In this formula, replace the unknown factor "x" by the sample OD value.



Sample	Dilution (D)	OD	ng/ml of gliadin (C) *	ppm of Gluten	Mean (ppm of Gluten)
A	1:25	0.31	Out of limits	<3	< 3
	1:50	0.26		<3	
B	1:50	1.17	15.66	62.63	63
	1:100	0.85	7.92	63.38	
C	1:200	1.31	20.02	320	299
	1:400	0.89	8.72	279	
Control Point (32-48)	1:20	1.49	26.49	42	

* Obtained by replacing "x" by the OD value in the tendency line.

OVERVIEW OF PROCEDURE

1. Reagents must be equilibrated at room temperature (**22-25°C**) before start.
2. Add 100µL of **sample** (prepared and diluted as described in point VI) in duplicated wells.
3. Add 100µL of **standards** and **positive control**. Cover with adhesive foil.
4. Incubate at room temperature (**22-25°C**) for 60 min.
5. Wash wells 3 times with *diluted wash solution* to remove not bound reagents.
6. Add 100µL of *Mab Peroxidase Conjugate* to each well. Cover with adhesive foil.
7. Incubate at room temperature (**22-25°C**) for 60 min.
8. Wash wells 3 times with *diluted wash solution* to remove un-reacted conjugate.
9. Add 100µL of **substrate (TMB)** to each well.
10. Incubate 10min at room temperature
11. Add 100µL of **stop solution** to each well.
12. Read at 450nm.



Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
Av. de la Institución Libre de Enseñanza, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tif: +34 91368.05.01
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com

Distributed in _____ by:

