



RIDASCREEN[®] FAST β -Lactoglobulin

Art. Nr. R4912

Test immunoenzimatico per la determinazione
della β -lattoglobulina

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Per informazioni:

Centralino:
Telefono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Ufficio ordini:

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Sales

Telefono: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA[®] e RIDASCREEN[®]
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin

Introduzione

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (Cod. R4912) è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa della β -lattoglobulina in crispies di riso, cioccolato e salumi.

Per l'individuazione della β -lattoglobulina nei prodotti lattiero-caseari idrolizzati, ivi compresi gli alimenti ipoallergenici per l'infanzia, si raccomanda l'impiego del kit immunoenzimatico competitivo RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (Cod. R4901).

Per l'individuazione delle caseine e dei caseinati negli alimenti si raccomanda l'impiego del kit RIDASCREEN[®]FAST Casein (Cod. R4612) oppure RIDASCREEN[®]FAST Milk.

Tutti i reagenti richiesti per il saggio immunoenzimatico – compresi gli standard – sono contenuti nel kit. Il kit è sufficiente per 48 determinazioni (inclusi gli standard). Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione campioni: omogeneizzazione ed estrazione

Tempo richiesto: preparazione del campione (10 campioni) ca. 45 min.
esecuzione del test (tempo d'incubazione) 30 min.

Limite di rilevazione: 0.04 mg/kg (ppm) di β -lattoglobulina (0.02-0.07) a seconda della matrice

Limite quantificazione: 0.167 mg/kg (ppm) di β -lattoglobulina

Specificità: gli anticorpi individuano specificamente la β -lattoglobulina del latte vaccino. E' stata osservata una cross-reattività per il latte di pecora, capra e bufala.

Le cross-reattività degli anticorpi utilizzati sono state determinate con alimenti puri (ad esempio, farina di mais). In alimenti composti/processati (ad esempio, pane di mais) le cross-reattività possono risultare differenti. Eventuali sostanze interferenti (ad esempio polifenoli) possono essere rilevate mediante prove di arricchimento (spike). Durante lo sviluppo del kit sono state analizzate più di 70 potenziali sostanze cross-reattive. Ulteriori dettagli sono riportati nel rapporto di validazione.

Al fine di aumentare la qualità delle prestazioni durante l'esecuzione di procedure ELISA, si prega di far riferimento al nostro Good ELISA Practice (GEP) – Manual, nella versione aggiornata. Qui si elencano gli standard minimi riguardanti le condizioni di lavoro quando si utilizzano i kit di R-Biopharm AG e si eseguono test ELISA. Il manuale può essere visionato, stampato e scaricato direttamente dal nostro sito www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis .

Prodotti correlati:

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652)

RI RIDASCREEN® FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN β-Lactoglobulin (Art. No. R4901)

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. No. BL613-10 / BL613-25)

Set of 4 MoniQA Milk Reference controls (Art. No. MQA 122016)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (Cod. R4902) è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa della β-lattoalbumina in crispies di riso, cioccolato e salumi.

2. Generale

Il latte vaccino contiene un 3.2 % di proteine, il 10 % delle quali è rappresentato dalla β-lattoglobulina (la principale proteina del siero) e l'80 % dalle caseine. L'allergene più importante, specie per i bambini, è la β-lattoglobulina. Per gli adulti sono principalmente le caseine ad avere un ruolo allergizzante.

Il latte può indurre reazioni allergiche in età infantile. Siero o caseinati vengono spesso aggiunti agli alimenti ed è per questo che è importante quantificare la β-lattoglobulina negli alimenti.

L'allergene può essere presente come ingrediente oppure come contaminante, in prodotti crudi e cotti. Secondo il **regolamento (EU) n. 1169/2011**, il latte deve essere dichiarato sull'etichetta dei prodotti alimentari perché può scatenare reazioni allergiche. Regolamenti simili sono in vigore ad esempio negli Stati Uniti, in Canada, Australia e Nuova Zelanda.

3. Principio del test

I pozzetti della micropiastra sono rivesti con anticorpi specifici contro la β -lattoglobulina. Quando nei pozzetti vengono aggiunti gli standard o la soluzione campione, la β -lattoglobulina in essi presente si lega agli anticorpi specifici. Il risultato è la formazione di un complesso antigene-anticorpo. I componenti non legati vengono eliminati con un lavaggio. Viene quindi aggiunto l'anticorpo coniugato a perossidasi (enzima coniugato), il quale si lega al complesso antigene-anticorpo dando luogo alla formazione di un complesso sandwich anticorpo-antigene-anticorpo. Dopo l'eliminazione di qualsiasi traccia di enzima coniugato residuo mediante lavaggio, viene aggiunta la soluzione substrato/cromogeno. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop determina il viraggio del colore da blu a giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di contenuta nel campione.

I risultati sono espressi in mg/kg di β -lattoglobulina.

4. Reagenti forniti

Ciascun kit contiene materiale sufficiente per 48 analisi (comprese le analisi degli standard). Ogni kit contiene:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
3 x Extractor 2	Blu	Concentrato	2x	30 ml
Allergen Extraction buffer	Verde	Concentrato	10x	100 ml
Additive 1	Blu			2 g
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	0.167 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	0.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	4.5 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Il fattore di diluizione 100 per il campione è già stato considerato in etichetta.

Pertanto, la concentrazione di β -lattoglobulina dei campioni può essere letta direttamente sulla curva standard.

5. Reagenti richiesti ma non forniti

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastra (450 nm)
- centrifuga + vial per centrifuga
- bagnetto termostato (60 °C / 140 °F e 100 °C / 212 °F)
- carta da filtro
- micropipette a volume variabile da 20 - 200 μ l e 200 - 1000 μ l

5.2. Reagenti:

- acqua distillata
- acido cloridrico (HCl) 1 M
- idrossido di sodio (NaOH) 1 M
- per l'estazioni di pinoli: albumina di siero bovino (BSA, Serva, frazione V, senza proteasi, Art.n. 11926.01)

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test deve essere eseguito solamente da tecnici di laboratorio esperti, seguendo rigorosamente le istruzioni fornite nel kit.

L' Extractor 2 è pericoloso per la salute poiché contiene mercaptoetanololo. Deve essere impiegato sotto cappa chimica, evitando qualsiasi contatto con la cute (indossare i guanti).

Il kit può contenere sostanze pericolose. Per ulteriori informazioni sulla sostanze contenute, far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) scaricabile direttamente online al sito www.r-biopharm.com

7. Conservazione

Conservare il kit a 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Non congelare alcun componente del kit.

Riporre i pozzetti non utilizzati nella loro busta originale insieme con l'essiccante fornito, chiudere bene e conservare a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La soluzione rossa Substrato/Cromogeno è fotosensibile, evitare pertanto di esporla alla luce diretta.

La garanzia di qualità decade alla data di scadenza del prodotto riportata in etichetta.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con diverso numero di lotto.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione Substrato/Cromogeno prima dell'esecuzione del test
- un valore inferiore a 1.2 unità di assorbanza ($A_{450\text{ nm}}$) per lo standard 5

9. Preparazione dei campioni

9.1. Preparazioni per l'estrazione del campione

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) prima dell'uso. Strumenti come il macinino da laboratorio, flaconi in vetro o spatole devono essere meticolosamente puliti prima e dopo l'uso, per rimuovere ogni traccia di residui ed evitare contaminazioni. Assicursi di riscaldare per tempo A-AEP in un bagnetto d'acqua a 60 °C (140 ° F) (il bagno d'acqua a 100 °C (212 ° F) viene utilizzato per l'estrazione dei campioni).

L' **Allergen Extraction buffer** è fornito **concentrato 10 volte**. Prima di diluirlo discioglierne gli eventuali cristalli riscaldandolo a bagnomaria a 37 °C (99°F), poi miscelare bene. Diluire il concentrato così riscaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata (es. 100 ml di concentrato + 900 ml di acqua distillata). Una volta diluito, l' Allergen Extraction buffer si conserva per ca. **4 settimane** se mantenuto a 20-25°C (68-77°F) °C.

Per la preparazione dell' **Allergen Extraction buffer contenente l'Additivo 1(A-AEP)** introdurre 1.35 g di Additivo 1 in un becher di vetro e aggiungere 15 ml di NaOH 1 M. Mescolare fino a disciogliere l'Additivo 1, quindi versare 700 ml dell' Allergen Extraction buffer diluito secondo la procedura precedente in un cilindro graduato. Aggiungere i 15 ml della soluzione contenente l'Additivo 1 mescolando continuamente, e trasferire gli eventuali residui della soluzione con l'Additivo 1 contenuta nel cilindro graduato risciacquandolo con l' Allergen Extraction buffer diluito. Portare a pH 9 l' Allergen Extraction buffer contenente l'Additivo 1 (A-AEP) con l'aggiunta di HCl 1 M HCl e portare il tutto a 750 ml aggiungendo l'Allergen Extraction buffer diluito.

750 ml di tampone A-AEP è sufficiente per 45 campioni. Il tampone è utilizzabile per ca. 3 settimane se conservato a temperatura ambiente 20 - 25 °C (68 - 77 °F)

(**non** congelare). Utilizzare provette pulite perché le particelle di polvere possono avviare la cristallizzazione. Eliminare il tampone se sono presenti cristalli.

L' **Extractor 2** è fornita concentrata 2x e deve essere diluita 1:2 (1+1) con acqua distillata (es. 30 ml di Soluzione di estrazione 2 + 30 ml di acqua distillata). L'intero volume di Extractor 2 diluito è sufficiente per 45 campioni ed utilizzabile per ca. 3 mesi se conservato a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.1. Estrazione del campione con l' Extractor 2

–omogeneizzare un quantitativo rappresentativo del campione (5 - 50 g)

Campioni solidi:

–pesare 1 g di campione (per i pinoli aggiungere anche 0.5 g di BSA) e aggiungervi 4 ml di Extractor 2 preparata secondo le istruzioni del par. 9, miscelare energicamente, chiudere il flacone e tenerlo per 10 minuti a 100 °C in un bagnetto termostato

–far raffreddare rapidamente il campione

–aggiungere 16 ml di miscela A-AEP (vedi 9) riscaldata a 60 °C al campione trattato termicamente

Campioni liquidi:

–prelevare 1 ml e aggiungervi 4 ml di soluzione di Extractor 2 (vedi par. 9), miscelare energicamente, chiudere il flacone e tenerlo per 10 minuti a 100 °C in un bagnetto termostato

–far raffreddare rapidamente il campione

–preriscaldare l'A-AEP a 60 ° C (140 ° F)

–aggiungere 15 ml di miscela A-AEP (60 °C) al campione trattato termicamente

procedere quindi con i campioni solidi e liquidi come segue:

–miscelare energicamente con un agitatore

–estrarre per 10 minuti a 60 °C in un bagnetto termostato

–far raffreddare (es. in acqua gelida), centrifugare per 10 minuti a 2500 g se possibile a 4°C (39°F) e/o filtrare (in alternativa: con una microcentrifuga centrifugare ad alta velocità per 10 minuti 2 ml di estratto in provette tipo eppendorf)

–diluire il surnatante privo di particelle o il filtrato 1:5 (1+4) con l' Allergen

Extraction buffer diluito preparato secondo par. 9, senza l'Additivo 1, ad esempio 100 µl + 400 µl (1:100 finale)

(**Nota:** nel saggio utilizzare immediatamente (entro 30 minuti) questo surnatante diluito. Un periodo di tempo più lungo può influenzare i valori di recupero.

–utilizzare 100 µl per ogni pozzetto

Il campione estratto prima dell'ultima fase di diluizione può essere conservato a temperatura ambiente per 4 ore.

I campioni estratti con l' Extractor 2 possono essere analizzati anche con i kit RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) e RIDASCREEN®FAST Milk (R4652)

10. Esecuzione del test

10.1. Predisposizione del test per il saggio ELISA

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) prima dell'uso.

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10 volte.). Prima della diluizione disciogliere i cristalli eventualmente formati immergendo il tampone a bagnomaria a 37 °C (99 °F) e mescolare bene. Prima di utilizzarlo deve essere diluito 1:10 (1+9) con acqua distillata (es. 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillate). Il tampone diluito è stabile a 20-25 °C (68-77 °F) per quattro settimane.

10.2. Procedura del test

Non utilizzare più di 3 strip (24 pozzetti) per volta. Nel caso sia necessario utilizzare più di 3 strip, si raccomanda di aggiungere una seconda piastra non rivestita (ad esempio a basso legame, Greiner bio-one Cat.-No. 655101) come pre-piastra per evitare uno slittamento nel tempo sulla micropiastra. Tutti gli standard ed i campioni devono essere pipettati nella piastra non rivestita (almeno 150 µl per pozzetto) e poi rapidamente trasferiti nella micropiastra rivestita utilizzando una pipetta a 8 canali.

Si consiglia di pipettare il coniugato, il substrato/cromogeno e la stop solution con una pipetta multicanale o stepper per evitare uno spostamento temporale sulla piastra. Inserire nel supporto della piastra un numero sufficiente di pozzetti per tutti gli standard ed i campioni da eseguire in doppio. Registrare le posizioni di standard e campioni.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni ad essi assegnate.

2. Aggiungere 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato ai pozzetti e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su carta assorbente per garantire l'eliminazione completa del liquido dai pozzetti. Ripetere per tre volte. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere per altre tre volte.
4. Aggiungere 100 µl del coniugato a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 -77 °F).
5. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su carta assorbente per garantire l'eliminazione completa del liquido dai pozzetti. Ripetere per tre volte. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere per altre tre volte.
6. Aggiungere 100 µl della soluzione rossastra Subtrato/Cromogeno a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 -77 °F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl della soluzione di stop a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e misurare le assorbanze a 450 nm. Leggere entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per la valutazione dei saggi immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win.net (Cod. N. Z9996). Eseguire i calcoli utilizzando la funzione spline cubica. Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione della Qualità incluso nel kit.

Rispetto a quanto indicato nel Certificato, valori superiori di assorbanza ($A_{450 \text{ nm}}$) sulla curva di calibrazione, specialmente per lo standard zero, possono risultare da un lavaggio insufficiente o da una contaminazione da β -lattoglobulina.

Si raccomanda di diluire ulteriormente i campioni e di procedere a nuove analisi nel caso di valori di assorbanza ($A_{450 \text{ nm}}$) superiori allo standard 5.

Nota:

Operando in base alla procedura consigliata, il fattore di diluizione è 100. La concentrazione dell'allergene può essere letta direttamente sulla curva standard –

il fattore di diluizione del campione pari a 100 è già stato considerato per le concentrazioni standard (vedi 4. *).

Per diluizioni del campione superiori a 1:100 è necessario considerare l'ulteriore fattore di diluizione per il calcolo della concentrazione di β -lattoglobulina.

Esempio di calcolo:

Al campione alimentare è stato aggiunto latte vaccino (vedi 2. Generale per il contenuto proteico del latte vaccino).

Sulla curva di calibrazione risultano 0.5 mg/kg di β -lattoglobulina: non è necessario moltiplicare il fattore di diluizione. Il valore corrisponde a ca. 5 mg/kg di proteine totali di latte ($0.5 \text{ mg/kg} \times 3.2 \% / 0.3 \% = 5.33 \text{ mg/kg}$) e a un contenuto totale di latte di ca. 156 mg/kg ($100 \% \times 5 \text{ mg/kg} / 3.2 \%$).

In generale:

I campioni che sono risultati negativi potrebbero contenere tracce di allergene sotto del limite di rilevazione del test, oppure potrebbero contenere altri componenti allergenici come, ad esempio, i lipidi.

Poiché la β -lattoglobulina rappresenta circa il 10% delle proteine di latte totali, un campione contenete 0,2 ppm di β -lattoglobulina corrisponde a ca. 2 ppm di proteine di latte.

A causa della grande varietà di alimenti, non è possibile escludere eventuali effetti matrice. Negli alimenti trasformati, le proteine possono essere modificate o frammentate ed interferire pertanto con i valori di recupero.

Per la valutazione della cross-reattività è stato analizzato un solo campione esemplificativo, altri campioni potrebbero mostrare un risultato diverso. Tutte le cross-reattività e le matrici esemplari analizzate sono descritte nel rapporto di validazione aggiornato.

Raccomandazioni:

Per garantire risultati ottimali delle analisi:

- In caso di campioni estremamente acidi o alcalini, regolare e neutralizzare il pH
- Come controllo dell'analisi eseguita dovrebbero essere testati campioni privi di allergene e campioni contenenti allergene (spike). A causa della grande varietà di alimenti, non è possibile escludere eventuali effetti matrice. Per garantire un risultato preciso si raccomanda di eseguire prove di arricchimento (spike)

- Analizzare ciascun campione in doppio
- I valori di recupero per i frammenti proteici si riducono in un test ELISA a sandwich, pertanto tali campioni devono essere analizzati con un test ELISA di tipo competitivo quale il kit RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (R4901).
- Per la valutazione delle cross-reattività è stato analizzato solo un campione rappresentativo. Altri campioni possono mostrare risultati differenti. Tutte le cross-reattività e le matrici rappresentative analizzate sono descritte nel rapporto di validazione.
- Per informazioni dettagliate sull'utilizzo in automazione del kit con gli strumenti ThunderBolt® / Bolt contattare info@r-biopharm.it.

Ulteriori informazioni sono disponibili tramite il proprio distributore locale.

Ulteriori applicazioni

- Procedura di estrazione per campioni ad alto valore assorbente di liquidi utilizzando la RIDA® Extractor 2 (Art. No.R4613)

R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.