



# **RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Hazelnut**

## **Art. Nr. R6802**

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di nocciola.

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](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Sales

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

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl  
Via Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Telefono 02 9823 3330  
[info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it) - [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

RIDA<sup>®</sup> e RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG  
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

# RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Hazelnut

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Hazelnut (Art. No.: R6802) è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di nocciola in campioni di alimenti quali cereali, prodotti da forno, gelati e cioccolato.

Il test ELISA è stato validato per il cioccolato fondente dall'ufficio federale tedesco BVL (cap. 64 metodo LFGB).

Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – 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, estrazione e centrifugazione

Tempo richiesto:            preparazione dei campioni (10 campioni) ..... c.a. 20 min  
   esecuzione del test (tempo d'incubazione) ..... 30 min

Limite di rilevabilità:    0.19 mg/kg (ppm) di nocciola; tra 0.17-0.22 mg/kg (ppm) a seconda della matrice

Limite di quantificazione: 2.5 mg/kg (ppm) di nocciola

Specificità:                l'anticorpo rileva in modo specifico le proteine di nocciola.

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).

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](http://www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis) .

### **Prodotti correlati:**

bioavid Lateral Flow Haselnuss / Hazelnut (Art. No. BL604-10/-25)  
SureFood® PCR ALLERGEN Hazelnut

## **1. Scopo**

RIDASCREEN®FAST Hazelnut è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di nocciola e di tracce di nocciola in campioni di alimenti quali cereali, prodotti da forno, gelati e cioccolato.

## **2. Generale**

La nocciola può essere presente come ingrediente o come contaminazione sia nei prodotti crudi che in quelli cotti. Secondo il **regolamento (EU) n. 1169/2011**, la nocciola deve essere dichiarata nelle etichette dei prodotti alimentari poiché può indurre 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 rivestiti con anticorpi specifici per la proteina della nocciola. Quando nei pozzetti si aggiungono rispettivamente gli standard e le soluzioni campione, la proteina di nocciola in essi presente si lega agli anticorpi specifici di cattura, dando luogo a un complesso anticorpo-antigene.

Le componenti non legate vengono eliminate con un lavaggio. Viene poi aggiunto l'anticorpo coniugato con perossidasi. Questo si lega al complesso Ab-Ag, dando luogo alla formazione del complesso anticorpo-antigene-anticorpo (sandwich). Il coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio.

La presenza di nocciola viene rilevata con l'aggiunta della soluzione substrato/cromogeno. L'enzima coniugato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca un viraggio del colore dal blu al giallo. La determinazione quantitativa viene eseguita fotometricamente a 450 nm. Il valore di assorbanza è proporzionale alla concentrazione di proteina di nocciola presente nel campione. I risultati sono espressi in mg/kg di nocciola.

## 4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 48 analisi (compresi gli standard). Ogni kit contiene:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
<b>Micropiastra</b>	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
<b>Allergen Extraction buffer</b>	Verde	<b>Concentrato</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Standard 1*</b>	Trasparente	Pronto all'uso	0 mg/kg	1.3 ml
<b>Standard 2*</b>	Trasparente	Pronto all'uso	2.5 mg/kg	1.3 ml
<b>Standard 3*</b>	Trasparente	Pronto all'uso	5.0 mg/kg	1.3 ml
<b>Standard 4*</b>	Trasparente	Pronto all'uso	10.0 mg/kg	1.3 ml
<b>Standard 5*</b>	Trasparente	Pronto all'uso	20.0 mg/kg	1.3 ml
<b>Wash buffer</b>	Marrone	<b>Concentrato</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Conjugate</b>	Rosso	<b>Concentrato</b>	<b>11x</b>	0.7 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
<b>Stop solution</b>	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

\*) Il **fattore di diluizione 20** per il campione è già stato considerato. Le concentrazioni di nocciola nel campione possono essere quindi lette direttamente sulla curva standard.

## 5. Materiale richiesto ma non fornito

### 5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga con relative vial in vetro
- agitatore
- bagno termostato
- macinino/ tritatore, mortaio o omogenizzatore per laboratorio
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20-200 µl e 200-1000 µl

### 5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata
- latte scremato in polvere (qualità alimentare)

## 6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test dovrebbe essere eseguito da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

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](http://www.r-biopharm.com)

## 7. Conservazione

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

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa, e conservati a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno di colore rosso è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

Non si applica alcuna garanzia di qualità dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

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

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Una colorazione blu della soluzione substrato/cromogeno (normalmente di colore rosso) prima dell'esecuzione del test
- Un valore di assorbanza inferiore a 1.2 ( $A_{450nm}$ ) per lo standard 5

## 9. Preparazione dei campioni

Eliminare completamente qualsiasi residuo di nocciola delle analisi precedenti. Utilizzare quindi per la preparazione dei campioni vial di vetro nuovi o puliti accuratamente.

Dopo l'utilizzo pulire meticolosamente strumenti di lavoro quali il macinino al fine di evitare eventuali contaminazioni.

Il **tampone di estrazione** è fornito **concentrato 10 volte**. Prima della diluizione, disciogliere completamente eventuali cristalli del tampone concentrato in un bagno termostato a 37°C (99°F). Miscelare accuratamente e diluire il concentrato riscaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata prima dell'uso (aggiungere

100 ml di concentrato a 900 ml di acqua distillata, Il tampone di estrazione diluito è stabile a 20-25°C (68-77°F) per circa 4 settimane.

Nel caso dell' estrazione bisogna aggiungere latte scremato in polvere (SMP), che può essere aggiunto al tampone di estrazione diluito **oppure** al campione pesato.

Ad esempio, 5 g di latte scremato in polvere (SMP) a 100 ml di Allergen Extraction buffer diluito. Preparare solo la quantità di SMP-tampone necessaria per l'analisi. La soluzione SMP-tampone deve essere riscaldata solo una volta a 60°C (140°F) e deve essere utilizzata entro 24 ore.

### 9.1 Preparazione del campione

- macinare finemente 5-50 g di campione e miscelare accuratamente (i campioni di cioccolato devono essere disciolti e mescolati)
- pesare 1 g di campione e aggiungervi 1 g di latte scremato in polvere (vedi par. 5.2.)
- aggiungere 20 ml di tampone di estrazione diluito (che dovrebbe essere già stato riscaldato a circa 60°C – 140°F) miscelare energicamente ed estrarre per 10 minuti a 60°C (140°F), agitando
- centrifugare il campione per un minimo di 10 minuti a 2500 g, se possibile a 4°C (39°F) e/o filtrare (in alternativa centrifugare ad alta velocità per 10 minuti 2 ml di estratto in provette tipo eppendorf utilizzando una microcentrifuga).
- utilizzare 100 µl del surnatante filtrato per ogni pozzetto

**I campioni estratti si possono conservare a 2-8°C (35-46°F) per 1 giorno, oppure a -20°C (-4°F) per alcuni mesi.**

## 10. Esecuzione del test

### 10.1. Indicazioni preliminari

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

Il **coniugato** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato 11 volte. Dal momento che il coniugato diluito ha una stabilità limitata, è bene ricostituire solo la quantità effettivamente richiesta per il test. Prima di procedere alla diluizione agitare accuratamente l'enzima coniugato concentrato. Per la ricostituzione diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) in acqua distillata (ad es. 200 µl di coniugato concentrato + 2 ml di acqua distillata, sufficienti per 2 strip della micropiastra).

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10 volte. Prima di procedere alla diluizione del concentrato, disciogliere completamente eventuali cristalli in un bagno termostato a 37°C (99°F) e mescolare accuratamente. Quindi diluire prima dell'uso il tampone concentrato così riscaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata (ad es. 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone di lavaggio diluito è stabile a 20-25°C (68-77°F) per circa quattro settimane.

## 10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire scrupolosamente la procedura di lavaggio raccomandata. Non lasciare asciugare i pozzetti tra un passaggio e l'altro 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.

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 assegnate agli standard e ai campioni.
2. Aggiungere 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato ai pozzetti corrispondenti e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).
3. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per 3 volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido. Riempire tutti i pozzetti con il tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.) nella quantità di 250 µl per ciascun pozzetto e svuotare nuovamente i pozzetti. Ripetere l'operazione altre 2 volte.
4. Aggiungere 100 µl del coniugato diluito in ogni pozzetto (vedi par. 10.1.), miscelare delicatamente agitando manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per 3 volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido.



Riempire tutti i pozzetti con il tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.), nella quantità di 250 µl per ciascun pozzetto e svuotare nuovamente i pozzetti. Ripetere l'operazione altre 2 volte.

6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno (di colore rosso) in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente agitando manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente agitando manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm, 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 (Art. Z9996). Eseguire i calcoli utilizzando la funzione spline cubica. L'andamento della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato. Il documento 'Compliance Criteria' fornisce i criteri per la valutazione delle curve standard. Per il controllo qualità devono essere utilizzati dei campioni di controllo.

Rispetto al certificato, valori di assorbanza ( $A_{450}$  nm) più elevati per la curva di calibrazione, in particolare per lo standard zero, possono essere dovuti ad un lavaggio insufficiente oppure a contaminazioni da allergene.

### Nota:

Operando secondo le procedure descritte il fattore di diluizione è 20. La concentrazione di nocciola può essere letta direttamente sulla curva standard (vedi cap. 4.) – il fattore di diluizione 20 per il campione è già stato considerato).

Nelle diluizioni del campione superiori a 1:20, tenere in considerazione l'ulteriore fattore di diluizione per il calcolo della concentrazione di mandorla.

### Raccomandazioni:

I campioni che sono risultati negativi potrebbero avere una contaminazione di nocciola al di sotto del limite di rilevazione del test oppure potrebbero contenere altre componenti della nocciola, ad esempio i lipidi.

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.

Campioni contenenti allergeni che sono stati trattati termicamente mostrano una riduzione dei valori di recupero perché le proteine denaturate non sono più riconosciute dall'anticorpo. La riduzione del recupero dipende fortemente dalla temperatura e dalla durata del trattamento termico. Campioni trattati ad alte temperatura possono mostrare un recupero significativamente ridotto.

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.

Il contenuto proteico e la composizione delle proteine possono variare considerevolmente tra le diverse specie di nocciolae. Pertanto, varietà diverse possono portare ad avere risultati diversi, dal momento che per la calibrazione sono state utilizzate delle varietà esemplari. Il contenuto proteico del materiale standard è descritto nel rapporto di validazione e può essere utilizzato per il calcolo della proteina.

### **Raccomandazioni:**

Per garantire risultati ottimali delle analisi:

- Per campioni estremamente acidi o alcalini, regolare il pH e neutralizzarlo
- Come controllo dell'analisi eseguita dovrebbero essere testati campioni privi di allergene e campioni contenenti allergene (spike)
- Per garantire un risultato preciso si raccomanda di eseguire prove di arricchimento (spike)
- Analizzare ogni campione in duplicato
- Per la conferma dei risultati eseguire un test SureFood® PCR
- Per informazioni dettagliate sull'utilizzo in automazione del kit con gli strumenti ThunderBolt® / Bolt contattare [info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it).

**Ulteriori note applicative sono disponibili a richiesta tramite il proprio distributore locale.**

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.