



RIDASCREEN[®]FAST Mandel / Almond

Art. Nr. R6901

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa di mandorla

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 Mandel / Almond

Introduzione

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond (Art. No.: R6901) è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di mandorla e di tracce di mandorla negli alimenti. Come campioni rappresentativi di dolci e prodotti da pasticceria, sono stati testati durante lo sviluppo del saggio, le seguenti matrici: cereali, biscotti, gelati e cioccolato. Il saggio può essere anche utilizzato per l'analisi di altri alimenti; ciò deve essere testato dall'utilizzatore.

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 campioni (per 10 campioni) ca. 20 min
 esecuzione del test (tempo di incubazione)30 min

Limite di rilevabilità: 0.1 mg/kg (0 – 0.23) mg/kg (ppm) di mandorla

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

Specificità: L'anticorpo rileva specificamente le proteine della mandorla.
 Cross-reattività al nocciolo di albicocca, gelsi, ciliegia mahaleb (possibile cross-reattività con altre piante del genere Prunus).

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). Ulteriori informazioni sono contenute 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

<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Prodotti correlati:

Bioavid Lateral Flow Mandel/Almond (BL601-10 und -25)

SureFood®ALLERGEN Almond (S3604)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Mandel / Almond è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di mandorla o tracce di mandorla. Come campioni rappresentativi di prodotti da pasticceria e dolci, sono state analizzate le seguenti matrici durante lo sviluppo del test: cereali, biscotti, gelati e cioccolato. Il saggio può essere usato anche per l'analisi di altri alimenti; ciò deve essere testato dall'utilizzatore. Il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione dipende dalla matrice testata, il livello di processamento dell'alimento, e il metodo di estrazione. Dettagli sui risultati e ulteriori informazioni sulla validazione di altre matrici possono essere trovate nella brochure Product Information. Inoltre, i risultati delle potenzialità del test e prove inter-laboratorio possono esistere per diverse matrici alimentari. Ulteriori applicazioni sono frequentemente validate nei nostri laboratori e fornite nelle Application Note.

2. Generale

L'allergene può essere presente come ingrediente oppure come contaminante, in prodotti crudi e cotti. Secondo il **regolamento (EU) n. 1169/2011**, la mandorla deve essere dichiarata 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 rivestiti con anticorpi specifici per le proteine della mandorla. Quando nei pozzetti si aggiungono rispettivamente gli standard e le soluzioni campione, le proteine della mandorla eventualmente presenti si legano agli anticorpi specifici di cattura, dando luogo alla formazione di un complesso antigene-anticorpo. Le componenti del campione non legate dagli anticorpi vengono eliminate con un lavaggio. Si aggiunge quindi l'anticorpo coniugato a perossidasi (enzima coniugato), che si lega al complesso antigene-anticorpo dando luogo alla formazione di un complesso a sandwich anticorpo-antigene-anticorpo. Il coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. La proteina di mandorla viene rilevata quando si aggiunge la 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. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di proteina di mandorla presente nel campione. Il risultato è espresso in mg/kg di mandorla.

4. Reagenti forniti

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

Ogni kit contiene:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
Allergen Extraction buffer	Verde	Concentrato	10x	100 ml
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0.0 mg/ kg	2.6 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	2.5 mg/ kg	2.6 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	5.0 mg/ kg	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	10.0 mg/ kg	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	20.0 mg/ kg	1.3 ml
Wash buffer	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Conjugate	Rosso	Concentrato	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

- *) Il fattore di diluizione **20** per il campione è già stato considerato in etichetta. Pertanto i livelli di concentrazione di mandorla nel campione possono essere letti direttamente sulla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + vial in vetro per centrifuga
- agitatore
- bagno termostato
- macinino/tritatore, pestello e mortaio, Ultra-Turrax o omogeneizzatore
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20-200 µl e 200-1000 µl

5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata

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

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 e conservati a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile, pertanto evitare di esporla alla luce diretta.

La garanzia di qualità decade alla data di scadenza indicata in etichetta.

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

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

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

9. Preparazione dei campioni

Strumenti come il macinino, provette di vetro o spatole devono essere meticolosamente puliti prima e dopo l'uso, per evitare la diffusione di tracce di mandorla ed evitare contaminazioni.

L' **Allergen Extraction buffer** è fornito concentrato 10 volte. Prima della diluizione, sciogliere eventuali cristalli mediante riscaldamento a 37°C (99°F) in un bagnetto termostatico. Successivamente diluire il tampone riscaldato concentrato 1:10 (1+9) con acqua distillata prima dell'uso (ad es. aggiungendo 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone diluito è stabile a 20-25°C (67-77°F) per circa quattro settimane.

9.1 Preparazione del campione (**senza** latte scremato in polvere)

- macinare finemente 5 g di campione e miscelare accuratamente
- pesare 1 g di campione e aggiungervi 20 ml di Allergen Extraction buffer diluito (il tampone di estrazione dovrebbe essere già stato riscaldato a circa 60°C (140°F))
- oppure aggiungere 19 ml di Allergen Extraction buffer diluito a 1 ml di campione liquido (il tampone di estrazione 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 per 10 minuti a 2500 g, se possibile a 4°C (39°F) e/o filtrare l'estratto. In alternativa, si può centrifugare 2 ml di estratto ad alta velocità per 10 minuti in provette tipo eppendorf utilizzando una microcentrifuga
- utilizzare 100 µl del surnatante o del filtrato per ogni pozzetto

9.2 Preparazione del campione (**con** latte scremato in polvere) per spezie, sorbetto e cacao

- macinare finemente 5 g di campione e miscelare accuratamente
- pesare 1 g di campione e aggiungervi 1 g di latte scremato in polvere
- aggiungere 20 ml di Allergen Extraction buffer diluito (il tampone di estrazione 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 per 10 minuti a 2500 g, se possibile a 4°C (39°F) e/o filtrare l'estratto (in alternativa, si può centrifugare 2 ml di estratto ad alta velocità per 10 minuti in provette tipo eppendorf utilizzando una microcentrifuga)
- utilizzare 100 µl del surnatante o del filtrato per ogni pozzetto

Nota:

I campioni estratti si conservano a 2-8°C (35-46°F) per 3 giorni.

Ulteriori diluizioni devono essere preparate con l'Allergen Extraction buffer diluito.

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 11X. Poiché il coniugato diluito ha una stabilità limitata, è bene ricostituire solo la quantità esatta necessaria per il test. Agitare bene la soluzione di enzima coniugato prima di diluirlo. Per la ricostituzione, diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) con acqua distillata, ad esempio aggiungendo a 200 µl di coniugato concentrato 2 ml di acqua distillata, sufficienti per 2 strip della micropiastra.

Il **tampone di lavaggio** viene fornito concentrato 10X. Prima della diluizione, sciogliere eventuali cristalli mediante riscaldamento a 37°C (99°F) in un bagnetto termostatico. Prima dell'uso diluire il tampone 1:10 (1+9) con acqua distillata (es. 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone diluito ha una stabilità di circa quattro settimane se conservato a 20-25°C (68-77°F).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare il prosciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi 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 due volte.
4. Aggiungere 100 µl di coniugato diluito (vedi par. 10.1.) in ogni pozzetto, 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 due volte.
6. Aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno (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®, R-Biopharm ha elaborato un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996). I calcoli utilizzando una funzione spline cubica. Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato.

In confronto al certificato, valori di assorbanza più elevati ($A_{450\text{ nm}}$) per la curva di calibrazione, soprattutto per lo standard zero, rivelano operazioni di lavaggio insufficienti o contaminazioni di mandorla.

Nota:

Operando in base alle istruzioni fornite, il fattore di diluizione è 20. I valori di concentrazione dell'allergene possono essere letti direttamente sulla curva standard (vedi cap. 4*) – il fattore di diluizione del campione pari a 20 è già stato considerato.

Per diluizioni del campione superiori a 1:20, l'ulteriore fattore di diluizione deve essere considerato nel calcolo della concentrazione della mandorla.

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.

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 mandorle. 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)
- a causa della moltitudine di tipi di alimenti, gli effetti della matrice non possono essere esclusi

- 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.

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.