

r-biopharm



RIDASCREEN[®] FAST Ei / Egg Protein

Art. No. R6402

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa dell' uovo intero
(polvere)

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:

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Ordini (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing (0 61 51) 81 02-40
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

Al fine di aumentare la qualità della valutazione durante l'esecuzione di metodi ELISA, è disponibile la nostra guida Good ELISA Practice (GEP) che elenca gli standard minimi e le procedure concernenti le condizioni generali di utilizzo dei kit per analisi di R-Biopharm AG e di esecuzione dei test ELISA. Il manuale può essere recuperato, stampato e scaricato dal sito web <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Prodotti correlati

Bioavid Lateral Flow Ei/Egg (BL608-10 & -25)

1.Scopo

RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa dell'uovo intero in polvere in alimenti quali condimenti per insalata, insaccati, vino, miscele per dolci da forno o per panificazione, gelati.

2. Generale

L'uovo può essere presente come ingrediente o come contaminazione in prodotti crudi o cotti. In base alla **Direttiva UE 1169/2011** l'uovo e prodotti derivati devono essere dichiarati sulle etichette degli alimenti. Regolamentazioni simili esistono ad esempio negli Stati Uniti, in Canada, Australia e Nuova Zelanda.

L'albumina contiene il 9-11% delle proteine totali dell'uovo. Quattro delle principali proteine allergeniche provengono all'80% dall'albumina. Esse sono l'ovomucoide (11%), l'ovoalbumina (54%), l'ovotransferrina (12%) e il lisozima (3,5%). Il potenziale allergenico delle proteine contenute nel tuorlo d'uovo è invece modesto.

3. Principio del test

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi specifici per le proteine d'albumina d'uovo. Aggiungendo la soluzione campione o la soluzione standard nei pozzetti, le proteine d'albumina d'uovo si legano agli specifici anticorpi. I componenti del campione non legati vengono eliminati con un lavaggio. Si aggiunge quindi l'anticorpo coniugato con perossidasi, il quale si lega al complesso antigene-anticorpo, dando luogo alla formazione di un complesso (sandwich) anticorpo-antigene-anticorpo. Il coniugato all'enzima non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. L'individuazione della proteina d'albumina d'uovo ha luogo con l'aggiunta della soluzione substrato/ cromogeno. L'enzima coniugato

converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è proporzionale alla concentrazione di proteine d'albume d'uovo nel campione.

Il risultato è espresso in mg/kg di uovo intero in polvere.

4. Reagenti forniti

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

Componente	Colore Tappo	Formato		Volume
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
Tampone estrazione	Verde	Concentrato	10x	100 ml
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	0.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	4.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	13.5 mg/kg	1.3 ml
Tampone di lavaggio	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Coniugato	Rosso	Concentrato	11x	0.7 ml
Substrato/Cromogeno Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Soluzione di stop	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Per il campione si considera **un fattore di diluizione pari a 20**. È quindi possibile ricavare i valori di concentrazione dell'uovo intero in polvere direttamente sulla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + provette in vetro per centrifuga
- agitatore
- bagno termostatico
- tritatore/ macinino da laboratorio, mortaio, Ultra-Turrax o omogeneizzatore
- pipette graduate

– micropipette variabili da 20-200 µl e da 200-1000 µl

5.2. Reagenti:

– acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

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

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per le informazioni sulla pericolosità delle sostanze contenute, consultare le schede di sicurezza (MSDS) appropriate per questo prodotto, disponibili online all'indirizzo <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 conservata a 2 – 8 °C (35 – 46 °F).

La soluzione substrato/cromogeno, di colore rossastro, 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 singoli reagenti appartenenti a kit con numero di lotto differente.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno rossastra, prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori a 0.8 unità di assorbanza ($A_{450\text{nm}} < 0.8$) per lo standard 5

9. Preparazione dei campioni

Strumenti come il tritatore/macchino, le provette in vetro o le spatole devono essere puliti prima e dopo l'operazione di preparazione di ciascun campione per eliminare qualsiasi residuo d'uovo ed evitare contaminazioni.

Il **tampone di estrazione** è fornito concentrato 10 volte. Prima della diluizione riscaldare nel bagno termostatico a 37 °C (99 °F) il tampone concentrato per sciogliere eventuali cristalli, poi miscelarlo con cura. Prima dell'uso diluire il tampone concentrato riscaldato 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 dodici settimane se conservato a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

9.1 Preparazione del campione

- tritare finemente 5 g di campione e miscelare con cura
- pesare 1 g del campione così preparato, aggiungere 20 ml di tampone di estrazione diluito (il tampone di estrazione deve essere preventivamente portato alla temperatura di 60°C (140°F))
- oppure aggiungere 19 ml del tampone di estrazione ad 1 ml di campione liquido (il tampone di estrazione deve essere preventivamente portato alla temperatura di 60°C (140°F))
- mescolare accuratamente ed incubare per 10 min a 60 °C (140 °F), poi raffreddare
- centrifugare il campione per almeno 10 minuti a 2500 g, possibilmente a 4°C (39°F) e/o filtrare l'estratto (in alternativa 2 ml di estratto possono essere centrifugati ad alta velocità per 10 minuti in provette di reazione utilizzando una microcentrifuga)
- nel test utilizzare 100 µl per ogni pozzetto

Nota:

Per i campioni contenenti fieno greco, chiodi di garofano, sedano o senape, aggiungere 1 g di caseina ad 1 g oppure ad 1 ml di campione al fine di evitare effetti di interferenza. Quando si analizzano campioni di composizione sconosciuta, la caseina può essere aggiunta come precauzione.

Gli estratti del campione si conservano a 2 - 8 °C (35 – 46 °F) per 1 giorno.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

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

L'**anticorpo coniugato con enzima** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato 11 volte. Dal momento che l'enzima coniugato diluito ha una stabilità limitata, è bene ricostituire solo la quantità necessaria per il test. Agitare bene la soluzione di enzima coniugato prima della diluizione. Per la ricostituzione, diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) con acqua distillata (es. 200 µl di coniugato concentrato + 2 ml di acqua sono sufficienti per 2 strip della micropiastra).

Il **tampone di lavaggio** viene fornito concentrato 10 volte. Prima della diluizione riscaldare nel bagno termostatico a 37 °C (99 °F) il tampone concentrato per sciogliere eventuali cristalli, poi miscelarlo con cura. Prima dell'uso diluire il tampone concentrato riscaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata (es. 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone di lavaggio diluito ha una stabilità di circa quattro settimane se conservato a 2 - 8°C (35 – 46 °F).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test. Non utilizzare più di 3 strip (24 pozzetti) per volta. Nel caso in cui servano più di tre strip, usare una seconda piastra non rivestita (es. a ridotto legame da Greiner bio-one Cat.-No. 655.101) come pre-piastra, per evitare un allungamento dei tempi di incubazione della piastra. Tutti gli standard e i campioni vengono pipettati nella piastra non rivestita (almeno 150 µl per pozzetto) e quindi velocemente trasferiti nella piastra rivestita con una pipetta a 8 canali.

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 in duplicato ai pozzetti corrispondenti, miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la micropiastra 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 i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.), quindi svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre due volte.
4. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di coniugato all'enzima diluito (vedi par. 10.1.), miscelare delicatamente facendo oscillare 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 i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.), quindi svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre due volte.
6. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl della soluzione substrato/cromogeno. 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 in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione stessa.

11. Risultati

Per la valutazione delle analisi eseguite con i kit per analisi immunoenzimatiche RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9996). Per il calcolo è consigliabile l'impiego della funzione cubic spline. L'andamento della curva standard è riportato nel Certificato di Qualità incluso nel kit.

Rispetto al certificato, valori di assorbanza (A_{450nm}) per la curva di calibrazione più elevati, soprattutto per lo standard zero, possono essere dovuti ad un lavaggio insufficiente o ad una contaminazione da uova. Per valori di assorbanza (A_{450nm}) > standard 5, si raccomanda una ulteriore diluizione ed una nuova analisi. I campioni devono essere diluiti in modo che i risultati possano essere letti sulla curva di taratura

Nota

Quando si lavora seguendo la preparazione del campione sopra indicata, il fattore di diluizione è 20. La concentrazione di uovo intero in polvere può essere letta direttamente sulla curva standard (il fattore di diluizione pari a 20 per le concentrazioni degli standard è già stato considerato, vedi paragrafo 4).

Diluizioni dei campioni superiori a 1:20 devono essere tenute in considerazione per il calcolo della concentrazione dell'uovo intero in polvere.

Il test è calibrato contro il materiale di riferimento NIST RM8445 (uovo intero in polvere). Il risultato viene espresso in mg/kg di uovo intero in polvere. Il materiale di riferimento RM8445 contiene il 49% +/- 1% delle proteine totali. Se si moltiplica il risultato per 0.49, si ottiene un valore in mg/kg (ppm) di proteine totali. Se il risultato viene invece moltiplicato per 0.263 allora si ottiene il valore in mg/kg (ppm) di proteine d'albume d'uovo.

Esempio di calcolo

Dalla curva standard si legge un valore pari a 10 mg/kg di uovo intero in polvere. Moltiplicando per 0.49 si ottiene un valore di 4.9 mg/kg (ppm) di proteine totali. Se il risultato viene invece moltiplicato per 0.263 allora si ottiene un valore di 2.63 mg/kg (ppm) di proteine di albume d'uovo.

In generale:

I campioni risultati negativi potrebbero ancora contenere una contaminazione di allergene al di sotto del limite di rilevazione del test, o potrebbero contenere altri componenti allergenici come ad esempio lipidi.

A causa del gran numero di tipi di alimenti, non si possono escludere effetti matrice. In alimenti processati (ad esempio il trattamento termico, disidratazione, ecc), le proteine possono essere modificate o frammentate, questo può avere un impatto sul recupero / reattività crociata.

Allergeni che contengono campioni trattati con il calore mostrano un recupero ridotto perché le proteine si denaturano e non vengono più riconosciute dagli anticorpi. La riduzione nel recupero dipende fortemente dalla temperatura e dalla durata del trattamento termico. Se i campioni vengono trattati termicamente ad alta temperatura il recupero può essere notevolmente ridotto.

Per la valutazione della reattività crociata è stato analizzato solo un campione di esempio, altri campioni possono fornire un risultato diverso. Tutte le reattività crociate e matrici di esempio analizzate sono descritte nel rapporto di validazione.

Raccomandazioni:

Al fine di ottenere un buon risultato con l'analisi:

- ogni campione dovrebbe essere analizzato in duplicato
- utilizzare campioni privi di uova e campioni contenenti uova (spiked) come controllo dell'analisi eseguita.
- a causa del gran numero di tipi di alimenti, non si possono escludere effetti matrice. Per garantire un risultato preciso si consigliano prove di recupero
- confermare i risultati con SureFood® PCR
- per ulteriori informazioni riguardo l'utilizzo dell'automazione ChemWell® o GEMINI contattare sales@rbiopharm.de.

Per maggiori informazioni sul prodotto e note applicative, contattare sales@rbiopharm.de.

Il rapporto di validazione contenete ulteriori informazioni è disponibile presso il rivenditore locale o presso R-Biopharm AG.

Altre note applicative

- Preparazione del campione per vino
- RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein (Art. No. R6402 utilizzato con gli strumenti automatici GEMINI e ChemWell® 2910
- RIDASCREEN®FAST – Swabbing Allergen Swabbing metodo per l'analisi qualitativa degli allergeni nella linea di produzione o apparecchiature di laboratorio

I dati corrispondono al nostro attuale stato della tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti ed il loro utilizzo. 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.