

RIDASCREEN[®] FAST Crustacean (2nd generation)

Art. No. R7312

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa delle proteine di crostaceo

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

RIDASCREEN[®]FAST Crustacean

Introduzione

RIDASCREEN[®]FAST Crustacean (Art. No. R7312) è un test immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle proteine di crostaceo negli alimenti.

Tutti i reagenti richiesti per il saggio immunoenzimatico – inclusi 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 dei

campioni: omogeneizzazione, estrazione e centrifugazione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (per 10 campioni) ca. 20 min
esecuzione del test (tempo di incubazione)30 min

Limite di rilevabilità: 2.0 mg/kg (ppm) crostaceo

Limite di
quantificazione: 20 mg/kg (ppm) crostaceo

Materiale standard: crostaceo

Specificità: Gli anticorpi individuano specificamente le proteine di crostaceo (principalmente tropomisina). Sono state rilevate minime cross-reattività con senape, curcuma, fagioli, cozze e artropodi.

La cross-reattività degli anticorpi utilizzati è stata determinata per le materie prime (ad esempio, farina di mais). In alimenti composti o trattati (ad esempio il pane di mais) le cross-reattività potrebbero essere diverse. Le sostanze interferenti (ad esempio polifenoli) possono essere rilevati con prove di contaminazione.

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 Crustaceen/Crustacean (Art. Nr. BL616-10 e 25)

SureFood® ALLERGEN ID Crustaceans (Art. Nr. S3112)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Crustacean (Art. Nr. R7312) è un test immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle proteine di crostaceo che possono essere utilizzate come ingrediente o che possono essere contenute come contaminante in alimenti crudi o cotti.

2. Generale

I crostacei possono essere presenti come ingrediente o come contaminazione in materie prime o alimenti lavorati. Secondo il **regolamento (UE) n. 1169/2011**, i crostacei devono essere dichiarati sulle etichette degli alimenti in quanto possono indurre reazioni allergiche. Regolamentazioni simili esistono ad esempio negli Stati Uniti, in Canada, Australia e Nuova Zelanda. Gamberetti, granchi, gamberoni, krill, astici, aragosta sono identificati come crostacei.

In particolare, la proteina muscolare tropomisina, può causare reazioni allergiche e non sono rare alcune gravi sensibilizzazioni. Le allergie ai crostacei si verificano più frequentemente nelle persone adulte e permangono per tutta la vita.

3. Principio del test

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi specifici diretti contro le proteine dei crostacei. Aggiungendo ai pozzetti gli standard e i campioni, le proteine di crostaceo in essi presenti si legano con gli anticorpi specifici. I componenti non legati sono rimossi con un lavaggio. Si aggiunge quindi l'anticorpo coniugato con perossidasi, che si lega al complesso antigene-anticorpo dando luogo ad un complesso anticorpo-antigene-anticorpo (sandwich). Dopo la rimozione mediante lavaggio del coniugato non legato, si aggiunge la soluzione di substrato/cromogeno. L'enzima coniugato legato 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. I valori di assorbimento sono proporzionali alla concentrazione delle proteine di crostaceo presenti nel campione. Il risultato è espresso in mg/kg di proteine di crostaceo.

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	-	Pronta all'uso		48 pozzetti
Tampone estrazione	Verde	Concentrato	10x	100 ml
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	20.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	40.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	80.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	160.0 mg/kg	1.3 ml
Tampone di lavaggio	Marrone	Concentrato	10x	100 ml
Coniugato	Rosso	Pronto all'uso		7.0 ml
Substrato/Cromogeno Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Soluzione di stop	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Il fattore di diluizione pari a 20 per il campione è già stato considerato. Pertanto la concentrazione delle proteine di crostaceo presenti nel campione può essere letta direttamente dalla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + provette in vetro per centrifuga
- bagno termostatico
- trituratore/ macinino da laboratorio, mortaio, Ultra-Turrax o omogeneizzatore
- pipette graduate
- cilindro graduato
- filtro in carta
- micropipette variabili da 20-200 µl e da 200-1000 µl
- se possibile pipetta multicanale e/o pipetta multistepper

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, 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 tritratore, provette in vetro o spatole devono essere puliti a fondo prima e dopo la preparazione di ogni campione, al fine di rimuovere qualsiasi residuo di allergene ed evitare la contaminazione.

Il **tampone di estrazione** è fornito **concentrato 10 volte**. Prima della diluizione riscaldare il tampone concentrato nel bagno termostatico a 37 °C (98.6 °F) 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 di campioni solidi

- omogeneizzare una quantità di campione rappresentativa (5 - 50 g)
- pesare 1 g del campione e aggiungere 20 ml di tampone di estrazione (Allergen Extraction Buffer) diluito e preriscaldato (60° C / 140 °F), chiudere la provetta, agitare con forza e incubare la soluzione per 10 minuti a 60 °C / 140 °F in un bagno termostato
- raffreddare il campione (ad esempio mettendolo in un bagno di ghiaccio) e centrifugare per 10 minuti / 2500 g / se possibile a 4 °C (39 °F) e/o filtrare l'estratto
(in alternativa centrifugare con una microcentrifuga 2 ml di estratto ad alta velocità per 10 minuti in provette di reazione)
- usare 100 µl di estratto per pozzetto

9.2 Preparazione di campioni liquidi

- prendere 1 ml di campione e aggiungere 19 ml di tampone di estrazione (Allergen Extraction Buffer) diluito e preriscaldato (60° C / 140 °F), agitare con forza e incubare la soluzione per 10 minuti a 60 °C / 140 °F in un bagno termostato
- raffreddare il campione (ad esempio mettendolo in un bagno di ghiaccio) e centrifugare per 10 minuti / 2500 g / se possibile a 4 °C (39 °F) e/o filtrare l'estratto
(in alternativa centrifugare con una microcentrifuga 2 ml di estratto ad alta velocità per 10 minuti in provette di reazione)
- usare 100 µl di estratto per pozzetto

Nota:

Gli estratti del campione si conservano a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) per 3 giorni e 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 **tampone di lavaggio** viene fornito concentrato 10 volte. 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). Prima della diluizione riscaldare

nel bagno termostatico a 37 °C (99 °F) il tampone concentrato per sciogliere eventuali cristalli. 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 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.

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 corrispondenti ed 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 tre volte.
4. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di coniugato all'enzima. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra ed 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 tre 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 spline cubica. L'andamento della curva standard è riportato nel Certificato di Qualità incluso nel kit.

Rispetto al certificato, valori di assorbanza ($A_{450\text{ nm}}$) per la curva di calibrazione più elevati, soprattutto per lo standard zero, possono essere dovuti ad un lavaggio insufficiente o ad una contaminazione da proteine di crostaceo.

Per valori di assorbanza ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5 si raccomanda una ulteriore diluizione ed una nuova analisi.

Nota:

Quando si lavora seguendo la preparazione del campione sopra indicata, il fattore di diluizione è 20. La concentrazione di proteine di crostaceo può essere letta direttamente sulla curva standard (vedi paragrafo 4.*) - il fattore di diluizione pari a 20 per il campione è già stato preso in considerazione.

Per campioni con fattore di diluizione superiore a 1:20, l'ulteriore fattore di diluizione deve essere considerato per il calcolo della concentrazione di allergene.

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.

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

Le proteine contenute e la composizione delle proteine possono variare notevolmente tra le diverse specie di crostacei. Inoltre, l'affinità dell'anticorpo

utilizzato varia da specie a specie. Pertanto, diverse specie possono produrre risultati diversi, dato che per la calibrazione sono state utilizzate specie a campione.

Il concetto VITAL è stato sviluppato dall' Australian Allergen Bureau come supporto per l'industria alimentare e la loro etichettatura degli allergeni basata su studi clinici.

L'etichettatura del cibo viene decisa sulla base di una dose di riferimento. Per i crostacei è stata determinata una dose di riferimento di 10 mg proteina-crostaceo. Supponendo un contenuto proteico medio per crostacei del 20%, la dose di riferimento correlata è di 50 mg di crostacei. Pertanto, il test disponibile è abbastanza sensibile per l'etichettatura dei prodotti alimentari secondo il concetto VITAL.

Raccomandazioni

Al fine di assicurare un elevato rendimento analitico:

- ogni campione deve essere analizzato in duplicato
- utilizzare anche campioni senza crostacei e con crostacei (addizionati) come controllo
- 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 PCR SureFood®
- Per ulteriori informazioni riguardo l'utilizzo dell'automazione ChemWell® o GEMINI contattare sales@rbiopharm.de.

Per maggiori note applicative contattare sales@r-biopharm.de.

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

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.