

RIDASCREEN[®] FAST Lupine

Art. No. R6102

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa
delle proteine di lupino

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 Lupine

Introduzione

RIDASCREEN[®]FAST Lupine (Cod. R6102) è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle proteine del lupino dolce negli alimenti (ad esempio succhi di frutta, vino, birra, insaccati, pasta, cioccolato, prodotti da forno o gelati).

Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – inclusi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 48 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è necessario un lettore per micropiastre.

Preparazione campione: omogeneizzazione, estrazione e centrifugazione

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

Limite di rilevabilità: 0.7 mg/kg (ppm) di proteine di lupino
(dipende dal tipo di matrice)

Limite di quantificazione: 1 mg/kg (ppm) di proteina di lupino

Specificità: L'anticorpo rileva specificamente le proteine del lupino dolce, tra cui la γ -conglutina e tutte le specie europee di lupino dolce (*Lupinus albus*, *luteus* e *angustifolius*) rilevanti per il settore agro-alimentare.

Si rileva una lieve cross-reattività con ceci, farina di soia, nocciole tostate, curcuma, curry e fieno greco. Ulteriori informazioni sulle cross-reattività sono contenute nel rapporto di validazione.

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 rilevate 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

SureFood® ALLERGEN ID Lupin (Art. Nr. S3111)

SureFood® ALLERGEN QUANT Lupin (Art. Nr. S3211)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Lupine è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle proteine del lupino dolce negli alimenti (ad esempio succhi, vino, birra, insaccati, pasta, cioccolato, prodotti da forno e gelati).

2. Generale

I semi di lupino dolce hanno un contenuto proteico pari al 35-42%. I lupini sono generalmente impiegati come fonti naturali di proteine in alternativa ai derivati della soia e ai prodotti della carne, sia nell'alimentazione umana che in quella animale. Per la loro capacità di trattenere l'acqua possono sostituire le uova nei prodotti per panificazione o pasticceria, incrementandone la freschezza e la stabilità. La farina di lupino è inoltre utilizzata al posto di quella di frumento, segale ed orzo negli alimenti dietetici. In Francia è consentito miscelare alle farine fino al 10% di farina di lupino senza obbligo di dichiarazione. Poiché il lupino può causare gravi reazioni allergiche, la sua presenza negli alimenti dovrebbe essere dichiarata. L'allergene si può trovare come ingrediente o come contaminazione di alimenti crudi o trasformati. Secondo la **direttiva (UE) No. 1169/2011** il lupino deve essere dichiarato in etichetta.

3. Principio del test

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi specifici diretti contro gli anticorpi anti-proteine del lupino. Vengono aggiunti gli standard o le soluzioni campione e le proteine di lupino presenti si legano agli specifici anticorpi di cattura dando luogo alla formazione di un complesso antigene-anticorpo.

Le componenti non legate vengono eliminate con un lavaggio. Viene poi aggiunto l'anticorpo coniugato con perossidasi (coniugato all'enzima), il quale si lega al complesso antigene-anticorpo, dando luogo a un complesso sandwich anticorpo-antigene-anticorpo. Il coniugato non legato viene eliminato con un lavaggio. La rilevazione delle proteine di lupino ha luogo quando si aggiunge la soluzione di substrato e cromogeno. L'enzima coniugato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca un viraggio del colore da blu a giallo. La determinazione quantitativa viene eseguita con un lettore di micropiastre a 450 nm. Il valore di assorbanza è proporzionale alla concentrazione delle proteine di lupino nel campione. Il risultato è espresso in mg/kg di lupino.

4. Reagenti forniti

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

Componente	Colore Tappo	Formato		Volume
Micropiastra	-	Pronta all'uso		48 pozzetti
Allergen Extraction buffer	Verde	Concentrato	10x	100 ml
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	1 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	3 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	9 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	27 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

- *) In etichetta è già stato considerato il **fattore di diluizione 20** per il campione. Pertanto, le concentrazioni delle proteine di lupino nel campione possono essere lette direttamente sulla curva standard.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + provette per centrifuga
- agitatore
- bagno termostatico
- macinino da laboratorio, pestello e mortaio, Ultra-Turrax o omogeneizzatore
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20 – 200 µl e da 200-1000 µl

5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il kit deve essere utilizzato 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 www.r-biopharm.com.

7. Istruzioni per la conservazione

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

Riporre i pozzetti inutilizzati nella loro busta originale, richiuderli insieme all'essiccante fornito e conservarli a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

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

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

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

8. Indicazione di instabilità e deterioramento dei reagenti

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

9. Preparazione dei campioni

Eliminare completamente eventuali residui di lupino delle precedenti analisi. A tal fine preparare i campioni in fiale di vetro nuove o ben pulite.

Pulire a fondo strumenti come il macinino per evitare la diffusione di tracce o contaminazioni di lupino.

L' **Allergen Extraction buffer** è fornito **concentrato 10X**. Prima di diluirlo discioglierne completamente gli eventuali cristalli in un bagno termostatico a 37 °C (99 °F), quindi miscelare accuratamente. Diluire quindi il concentrato così riscaldato **1:10 con acqua distillata (1+9)** prima dell'uso (ad es. diluire 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone diluito resta stabile a 20 – 25 °C (68 – 77 °F) per circa quattro settimane.

- pesare 5 g di campione macinato finemente e miscelarlo con cura
- aggiungere 1 g del campione a 20 ml del tampone di estrazione pronto all'uso (il quale deve essere già stato portato a 60 °C (140 °F))
- miscelare energicamente ed estrarre per 10 minuti a 60 °C (140 °F) agitando in maniera discontinua
- raffreddare (ad es. con acqua ghiacciata), centrifugare per 10 minuti a 2500 g (in alternativa centrifugare 2 ml dell'estratto per 10 minuti ad alta velocità in provette tipo eppendorf con una microcentrifuga) e/o filtrare
- lasciare decantare il surnatante (i campioni torbidi dovrebbero essere filtrati utilizzando carta da filtro scanalata)
- nel saggio utilizzare 100 µl del surnatante o del filtrato per ogni pozzetto

Nota:

Gli estratti del campione si conservano a 2 – 8 °C (35 – 46 °F) per 3 giorni.

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 all'enzima** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato 11 volte. Poiché la soluzione di enzima coniugato diluita ha una stabilità limitata, occorre ricostituire solo il quantitativo di concentrato effettivamente necessario per l'analisi. Agitare accuratamente il coniugato concentrato prima di ricostituirlo, poi diluirlo 1:11 (1+10) in acqua distillata (ad es. 200 µl di concentrato + 2 ml di acqua distillata sono sufficienti per 2 strip della micropiastra).

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10 volte. Prima di diluirlo, scioglierne completamente gli eventuali cristalli in un bagno termostatico a 37 °C (99 °F), poi miscelare. Prima dell'uso diluire il concentrato così scaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata (ad es. 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Il tampone diluito resta stabile a 20 – 25 °C (68 – 77 °F) per circa quattro settimane.

10.2. Procedura del test

Eeguire 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.

Si raccomanda di pipettare il coniugato, il substrato/cromogeno e la soluzione di stop con una pipetta multicanale o stepper per evitare uno slittamento di tempo sulla piastra.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per gli standard e i campioni da analizzare. Registrare le posizioni di standard e campioni.
2. Pipettare separatamente nei pozzetti 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato, e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68 – 77 °F).

3. Eliminare il liquido dai pozzetti. Capovolgere la piastra su carta assorbente e picchiettarla per eliminare ogni residuo di liquido. Ripetere l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente per eliminare il liquido rimasto. Ripetere la procedura di lavaggio altre quattro volte.
4. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl del coniugato all'enzima diluito. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C / 68 – 77 °F).
5. Eliminare il liquido dai pozzetti. Capovolgere la piastra su carta assorbente e picchiettarla per eliminare ogni residuo di liquido. Ripetere l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente per eliminare il liquido rimasto. Ripetere la procedura di lavaggio altre quattro volte.
6. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl della soluzione rossastra substrato/cromogeno. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente 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 facendo oscillare la piastra manualmente e misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere i risultati entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per la valutazione delle analisi eseguite con i kit per analisi immunoenzimatiche RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win/ RIDA®SOFT Win.net (cod. Z9996). Il calcolo deve essere fatto usando una funzione spline cubica. Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato al kit.

In confronto al certificato, valori di assorbanza più elevati ($A_{450\text{ nm}}$) per la curva di calibrazione, soprattutto per lo standard zero, sono indice di lavaggio insufficiente o di contaminazione.

Si raccomanda una ulteriore diluizione ed una nuova lettura dei campioni per valori di assorbanza ($A_{450\text{ nm}}$) > dello standard 5.

Nota:

Operando in accordo alle procedure descritte, il fattore di diluizione è 20. La concentrazione di proteine di lupino può essere letta direttamente sulla curva standard (vedi 4. *) – il fattore di diluizione 20 è già stato considerato. Diluizioni del campione superiori a 1:20 devono essere tenute in considerazione nel calcolo della concentrazione dell'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.

I campioni contenenti allergeni che sono stati trattati termicamente mostrano valori di recupero ridotti perché le proteine denaturate non sono più riconosciute dall'anticorpo. La riduzione dei valori di recupero dipende fortemente dalla temperatura e dalla durata del trattamento termico. Se i campioni sono trattati termicamente i valori di recupero possono essere significativamente ridotti.

Raccomandazioni:

Per poter garantire elevate prestazioni analitiche:

- ogni campioni deve essere analizzato in doppio
- utilizzare campioni privi di allergene e campioni contaminati (spiked) come test di controllo
- nel caso di campioni estremamente acidi o alcalini, è necessario regolare il pH ad un valore neutro
- 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 i kit PCR della linea SureFood®
- Per ulteriori informazioni riguardo l'utilizzo dell'automazione ChemWell® o GEMINI contattare sales@rbiopharm.de.

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

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.