



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

**Art. Nr. R4652**

Test immunoenzimatico per la determinazione di  
proteine di latte

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 Milk

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Milk (R4652) è un saggio immunoenzimatico per l'analisi quantitativa della proteina del latte 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 un lettore per micropiastre.

## Preparazione

dei campioni: omogeneizzazione, estrazione e centrifugazione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni) .....ca. 45 min.  
esecuzione del test (tempo d'incubazione) ..... 30 min.

Limite di rilevabilità: 0.7 mg/kg (ppm) di proteina del latte

## Limite

di quantificazione: 2.5 mg/kg (ppm) di proteina del latte

Materiale standard: Il materiale standard RIDASCREEN<sup>®</sup> è calibrato col materiale di riferimento NIST RM 1549a (latte intero in polvere).

Specificità: Gli anticorpi individuano specificamente le e la  $\beta$ -lattoglobulina del latte vaccino e del latte di pecora, di capra e di bufala.

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:**

RIDASCREEN®FAST Casein (R4612)

RIDASCREEN®FAST  $\beta$ -Lactoglobulin (R4902)

RIDASCREEN® $\beta$ -Lactoglobulin (R4901)

bioavid Lateral Flow Milch / Milk (BL613-10 / BL613-25)

RIDA® Extractor 2 (R4613)

## **1. Scopo**

RIDASCREEN®FAST Milk è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa delle proteine del latte in alimenti che possono contenere siero, latte o latte in polvere quali gli insaccati, il gelato, il cioccolato, i prodotti da forno, le miscele per dolci e per panificazione, le minestre, i sughi, le salse da condimento e le bevande (succhi, vino e birra). I risultati del test sono di tipo quantitativo se il campione contiene latte o latte in polvere. Se la composizione delle proteine di latte nel campione è sconosciuta e se il rapporto delle proteine di latte è differente rispetto al contenuto naturale nel latte (ad esempio in un campione composto prevalentemente da siero di latte), i risultati possono essere sottostimati.

Per avere risultati quantitativi per caseina e/o  $\beta$ -lattoglobulina, è necessario analizzare il campione con il kit RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) e/o RIDASCREEN®FAST  $\beta$ -lactoglobulin (R4902).

## 2. Generale

Il latte vaccino contiene un 3,2% di proteine suddivise in un 10% di  $\beta$ -lattoglobulina (la principale proteina del siero) e un 80% di caseine. L'allergene più rilevante per i bambini è la  $\beta$ -lattoglobulina, mentre le caseine hanno un ruolo allergizzante principalmente in età adulta.

L'allergene può essere presente come ingrediente oppure come contaminante, in prodotti crudi e cotti. Secondo il **regolamento (EU) n. 1169/2011**, il latte deve essere dichiarato 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

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi specifici diretti contro le proteine del latte caseina e  $\beta$ -lattoglobulina. Aggiungendo ai pozzetti gli standard o la soluzione col campione, la proteina del latte in essi presente si lega agli anticorpi specifici. Il risultato è la formazione di un complesso antigene-anticorpo.

I componenti non legati sono rimossi con un lavaggio. Si aggiunge quindi l'anticorpo coniugato con perossidasi (enzima coniugato), che si lega al complesso antigene-anticorpo dando luogo a un complesso anticorpo-antigene-anticorpo (sandwich). Dopo la rimozione mediante lavaggio del coniugato all'enzima 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 di proteina del latte del campione. I risultati sono espressi in mg/kg di proteine di latte.

## 4. Materiale fornito

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

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
3 x Extractor 2	Blu	<b>Concentrato</b>	<b>2x</b>	30 ml
Allergen Extraction buffer	Verde	<b>Concentrato</b>	<b>10x</b>	100 ml
Additive 1	Blu			2 g
Standard 1*	Trasparente	Pronto all'uso	0 mg/kg*	1.3 ml
Standard 2*	Trasparente	Pronto all'uso	2.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 3*	Trasparente	Pronto all'uso	7.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 4*	Trasparente	Pronto all'uso	22.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 5*	Trasparente	Pronto all'uso	67.5 mg/kg*	1.3 ml
Wash buffer	Marrone	<b>Concentrato</b>	<b>10x</b>	100 ml
Conjugate	Rosso	<b>Concentrato</b>	<b>11x</b>	0.7 ml
Conjugate buffer	Nero	Pronto all'uso		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 100** risultante dalla preparazione del campione è già stato considerato per le concentrazioni standard. Pertanto le concentrazioni di proteine del latte possono essere lette direttamente sulla curva standard.

## 5. Materiale richiesto ma non fornito:

### 5.1. Attrezzatura:

- lettore per micropiastre (450 nm)
- centrifuga e relative provette
- bagnetto termostato (60 °C / 140 °F e 100 °C / 212 °F)
- filtro di carta a pieghe
- micropipette a volume variabile da 20 - 200 µl e 200 - 1000 µl

### 5.2. Reagenti:

- acqua distillata
- acido cloridrico (HCl) 1 M
- idrossido di sodio (NaOH) 1 M

## 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.**

Riporre i pozzetti inutilizzati nella busta originaria, richiuderli nella confezione 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 scade alla data di scadenza riportata sulla confezione del kit.

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

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

–qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno normalmente rossa, 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

Strumenti come il macinino da laboratorio, flaconi in vetro o spatole devono essere meticolosamente puliti prima e dopo l'uso, per rimuovere ogni traccia di residui ed evitare contaminazioni.

### 9.1. Preparazioni

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

L' **Allergen Extraction buffer** è fornito **concentrato 10 volte**. Prima di diluirlo discioglierne gli eventuali cristalli riscaldandolo a bagnomaria a 37 °C, poi miscelare bene. Diluire il concentrato così riscaldato 1:10 (1+9) con acqua distillata (es. 100 ml di concentrato + 900 ml di acqua distillata) o portare l'intero contenuto del flacone a 1250 ml. Una volta diluito, l' Allergen Extraction buffer si conserva per ca. 12 settimane se mantenuto a 2 - 8 °C.

Per la preparazione dell' **Allergen Extraction buffer contenente l'Additivo 1(A-AEP)** introdurre 1.35 g di Additivo 1 in un becher di vetro e aggiungere 15 ml di NaOH 1 M. Mescolare fino a disciogliere l'Additivo 1, quindi versare 700 ml dell' Allergen Extraction buffer diluito secondo la procedura precedente in un cilindro graduato. Aggiungere i 15 ml della soluzione contenente l'Additivo 1 mescolando continuamente, e trasferire gli eventuali residui della soluzione con l'Additivo 1 contenuta nel cilindro graduato risciacquandolo con l' Allergen Extraction buffer diluito. Portare a pH 9 l' Allergen Extraction buffer contenente l'Additivo 1 (A-AEP) con l'aggiunta di HCl 1 M HCl e portare il tutto a 750 ml aggiungendo l'Allergen Extraction buffer diluito.

750 ml di Tampone A-AEP è sufficiente per 45 campioni. Il tampone è utilizzabile per ca. 3 settimane se conservato a temperatura ambiente 20 - 25 °C (68 - 77 °F) (non congelare). Utilizzare provette pulite perché le particelle di polvere possono avviare la cristallizzazione. Eliminare il tampone se sono presenti cristalli.

L' **Extractor 2** è fornita concentrata 2x e deve essere diluita 1:2 (1+1) con acqua distillata (es. 30 ml di Soluzione di estrazione 2 + 30 ml di acqua distillata). L'intero volume di Extractor 2 diluito è sufficiente per 45 campioni ed utilizzabile per ca. 3 mesi se conservato a temperatura ambiente (20 - 25 °C).



## 9.2. Estrazione del campione

–omogeneizzare una quantità rappresentativa di campione (5 - 50 g)

### **Campioni solidi:**

- prelevare 1 g e aggiungere 4 ml di soluzione di Extractor 2 diluita e preparata secondo la procedura di 9.1., miscelare energicamente, chiudere la provetta e tenerla a bagnomaria a 100°C per 10 minuti
- raffreddare rapidamente il campione
- aggiungere 16 ml di soluzione A-AEP riscaldata (vedi 9.1.) al campione appena raffreddato

### **Campioni liquidi:**

- prelevare 1 ml e aggiungere 4 ml di Extractor 2 preparata secondo la procedura di 9.1., miscelare energicamente, chiudere la provetta e tenerla a bagnomaria a 100 °C per 10 minuti
- raffreddare rapidamente il campione
- aggiungere 15 ml di soluzione A-AEP riscaldata (60 °C) al campione appena raffreddato

### **procedere quindi come segue sia per i campioni solidi che per quelli liquidi:**

- miscelare energicamente con un agitatore
- estrarre per 10 minuti a 60 °C nel bagnetto termostato  
raffreddare (es.: immergendo in acqua gelata), centrifugare per 10 minuti a 2500 g (in alternativa: con una microcentrifuga centrifugare ad alta velocità per 10 minuti 2 ml di estratto in provette tipo eppendorf)
- filtrare il surnatante (con filtro in carta a pieghe)
- diluire il campione 1:5 (1+4) con l' Allergen Extraction buffer diluito preparato secondo 9.1., senza l'Additivo 1 (es. 100 µl + 400 µl - 1:100 di tampone finale)  
(**Nota:** nel saggio utilizzare direttamente questo surnatante diluito)
- utilizzare 100 µl per ogni pozzetto

**Al fine di eliminare i risultati falsi positivi si consiglia di aggiungere 0,5 g di BSA per l'estrazione dei campioni contenenti semi di girasole, semi di zucca e pinoli (per maggiori informazioni si prega di contattare [info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it)).**

**I campioni estratti con l' Extractor 2 possono essere analizzati anche con i kit RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (R4902) e RIDASCREEN®FAST Casein (R4612).**

**I campioni estratti possono essere conservato a 2 – 8 °C ( 35 - 46 °F) per 3 giorni. Gli estratti possono essere conservati a – 20°C ( - 4 °F) per diversi mesi.**

## **10. Esecuzione del test**

### 10.1. Preparazione del test per il saggio ELISA

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

Il **coniugato** (flacone con il tappo rosso) è fornito concentrato 11 volte. Poiché, una volta diluito, l'anticorpo ha una stabilità limitata, è bene diluire solo il quantitativo effettivamente necessario. Agitare bene il coniugato concentrato prima di pipettarlo. Diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) con il tampone di diluizione del coniugato (es. 200 µl di concentrato + 2 ml di tampone di diluizione del concentrato sono sufficienti per 2 strip).

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10 volte. Diluirlo prima dell'uso 1:10 (1+9) con acqua distillata (ovvero 100 ml di tampone concentrato + 900 ml di acqua distillata). Prima di diluire il tampone concentrato, discioglierne gli eventuali cristalli con un bagno termostato a 37 °C (99 °F). Il tampone diluito è stabile a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) per quattro settimane.

### 10.2. Procedura 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. Introdurre 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato nei pozzetti corrispondenti e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su un foglio di carta assorbente per tre volte in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre tre volte.
4. Aggiungere 100 µl del coniugato diluito in ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 -77 °F).
5. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su un foglio di carta assorbente per tre volte in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre tre volte.
6. Aggiungere 100 µl della soluzione substrato/cromogeno rossa in ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la micro piastra manualmente e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) e al buio.
7. Aggiungere 100 µl della soluzione di stop in ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la micro piastra manualmente 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/ RIDA®SOFT Win.net (Cod. N. Z9996). Eseguire i calcoli utilizzando la funzione spline cubica.

Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione della Qualità incluso nel kit.

Con riferimento ai valori riportati nel certificato, valori di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}}$ ) più elevati sulla curva di calibrazione, soprattutto se riferiti allo standard zero, possono essere prodotti o da un lavaggio insufficiente o da una contaminazione da proteine del latte.

Si raccomanda di diluire ulteriormente i campioni e di ripeterne l'analisi nel caso di valori di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}}$ ) superiori allo standard 5.

**Nota:**

Operando in base alla procedura consigliata, il fattore di diluizione è 100. La concentrazione di proteina del latte può essere letta direttamente sulla curva standard – il fattore di diluizione del campione pari a 100 è già stato tenuto in considerazione per le concentrazioni standard (vedi 4. \*).

Per diluizioni del campione superiori a 1:100 l'ulteriore fattore di diluizione del campione deve essere considerato nel calcolo della concentrazione di proteina del latte.

**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.

**Raccomandazioni:**

Ai prodotti alimentari sono spesso aggiunti diversi componenti del latte come latte in polvere, siero di latte ( $\beta$ -lattoglobulina), caseinati, ecc... Il kit RIDASCREEN®FAST Milk è calibrato per latte scremato in polvere. Pertanto, se l'alimento analizzato contiene:

- latte scremato in polvere o latte allora i risultati del test ELISA sono quantitativi
- siero di latte ( $\beta$ -lattoglobulina) allora i risultati del test ELISA possono essere sottostimati
- caseinati allora i risultati del test ELISA possono essere sottostimati.

Per avere risultati quantitativi per caseina e/o  $\beta$ -lattoglobulina, è necessario analizzare il campione con il kit RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) e/o RIDASCREEN®FAST  $\beta$ -lactoglobulin (R4902).

Se il risultato è sotto al limite di rilevazione, nel campione alimentare possono essere presenti ulteriori costituenti del latte (ad esempio proteine oppure zuccheri quali il lattosio).

Il latte contiene circa il 3.2 % di proteine di latte. Pertanto un campione contenente 1 mg/kg di proteine di latte avrà un corrispondente contenuto in latte di circa 31 mg/kg,

### **Suggerimenti:**

Per garantire risultati ottimali delle analisi:

- Analizzare ogni campione in duplicato
- Come controllo dell'analisi eseguita dovrebbero essere testati campioni privi di allergene e campioni contenenti allergene (spike)
- A causa della grande varietà di alimenti, non è possibile escludere eventuali effetti matrice. Per garantire un risultato preciso si raccomanda di eseguire prove di arricchimento (spike)
- Per informazioni dettagliate sull'utilizzo in automazione del kit con gli strumenti ChemWell® o GEMINI contattare [info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it).

**Ulteriori informazioni sono disponibili 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.