

DETERMINAZIONE DEGLI ALLERGENI

La determinazione degli allergeni è stata effettuata secondo le indicazioni riportate nei kit di estrazione, come di seguito riportato.

Determinazione delle proteine del latte

Per la determinazione delle proteine del latte è stato utilizzato il test immunoenzimatico RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin. È un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa della β -lattoglobulina nativa e processata in bevande e alimenti.

Il latte può essere presente come ingrediente o come contaminazione in prodotti sia grezzi che lavorati. Componenti del latte come la β -lattoglobulina o la caseina possono indurre reazioni allergiche. Il latte vaccino contiene circa il 3.2 % di proteine, il 10 % delle quali è rappresentato dalla β -lattoglobulina (la principale proteina del siero) e l'80 % dalle caseine.

L'allergene più importante, specie per i bambini, è la β -lattoglobulina. Per gli adulti sono invece le caseine a svolgere principalmente un ruolo allergizzante.

Il latte può indurre reazioni allergiche in età infantile. Siero o caseinati vengono spesso aggiunti agli alimenti ed è per questo che è importante quantificare la β -lattoglobulina negli alimenti.

Preparazione dei reagenti:

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

Il tampone di estrazione degli allergeni è fornito concentrato 20 volte. Prima della diluizione disciogliere eventuali cristalli, riscaldando il tampone in un bagnetto termostato a 37°C, e miscelare bene. Diluire il concentrato riscaldato 1:20 (1+19) con acqua distillata.

Per la preparazione del tampone per l'estrazione degli allergeni contenente l'Additivo 1 (A-AEP) pesare 1.8 g di Additivo 1 in un becher di vetro e aggiungervi 20 ml di NaOH 1 M. Mescolare fino a disciogliere completamente l'Additivo 1.

Introdurre quindi 900 ml di tampone di estrazione diluito degli allergeni in un cilindro graduato. Aggiungere i 20 ml della soluzione di Additivo 1 mescolando continuamente e trasferire gli eventuali residui della soluzione di Additivo 1 nel cilindro graduato mediante risciacquo con il tampone di estrazione degli allergeni diluito. Portare il tampone di estrazione degli allergeni contenente l'Additivo 1 (A-AEP) a pH 9 con HCl 1M e portarlo a 1 L con il tampone di estrazione degli allergeni diluito.

Estrazione del campione

La soluzione di estrazione 2 è fornita concentrata 2 volte e deve essere diluita 1:2 (1+1) con acqua distillata.

Omogeneizzare il campione e prelevare 1g. Aggiungere 4 ml di soluzione di estrazione 2, miscelare energicamente e porre il vial in un bagnetto termostato per 10 minuti a 100 °C. Raffreddare rapidamente il campione ed aggiungere 16 ml di miscela A-AEP riscaldata a 60 °C al campione trattato termicamente.

Miscelare energicamente con un agitatore, estrarre per 10 minuti a 60 °C in un bagnetto termostato, far raffreddare in acqua gelida, centrifugare per 10 minuti a 4000 rpm oppure filtrare, diluire il campione 1:5 (1+4) con il tampone per l'estrazione degli allergeni diluito privo dell'Additivo 1. Nel saggio utilizzare 100 μ l per pozzetto

Esecuzione del test

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

Il coniugato all'enzima è fornito concentrato 11 volte. Prima di pipettare il coniugato concentrato è necessario agitarlo accuratamente. Per la ricostituzione diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) con acqua distillata.

Il tampone di lavaggio è fornito concentrato 10 volte. Prima di utilizzarlo deve essere diluito 1:10 con acqua distillata. Prima della diluizione disciogliere i cristalli eventualmente formati immergendo il tampone a bagnomaria a 37°C.

Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni.

Aggiungere 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato ai pozzetti e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su carta assorbente per garantire l'eliminazione completa del liquido dai pozzetti. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio e svuotarli nuovamente. Ripetere per altre tre volte.

Aggiungere 100 µl del coniugato all'enzima diluito a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente la micropiastra su carta assorbente per garantire l'eliminazione completa del liquido dai pozzetti. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio e svuotarli nuovamente. Ripetere per altre tre volte.

Aggiungere 100 µl della soluzione rossastra Substrato/Cromogeno a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.

Aggiungere 100 µl della soluzione di stop a ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e misurare le assorbanze a 450 nm. Leggere entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

Risultati

La concentrazione di β-lattoglobulina può essere letta direttamente sulla curva standard. Per conoscere la quantità di proteine totali del latte si applica la seguente formula:

$$\text{ppm proteine totali} = (\text{ppm } \beta\text{-lattoglobulina} \times 3.2 \%) / 0.3 \%$$

Per determinare il contenuto totale di latte si applica la seguente formula:

$$\text{ppm contenuto totale latte} = (\text{ppm proteine totali} \times 100 \%) / 3.2 \%$$

DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE DELL'UOVA

Per la determinazione delle proteine dell'uovo è stato utilizzato il test immunoenzimatico RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein per l'analisi quantitativa delle proteine d'albume d'uovo. È un immunodosaggio enzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa dell'uovo negli alimenti quali pasta, insaccati, condimenti per insalata, vino, miscele per dolci da forno o per panificazione.

L'albume contiene il 9-11% delle proteine totali dell'uovo. Quattro delle principali proteine allergeniche provengono per l'80% dall'albume. 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.

Preparazione dei reagenti

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

L'anticorpo coniugato con enzima 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.

Il tampone di estrazione è fornito concentrato 20 volte. Prima della diluizione riscaldare nel bagno termostatico a 37°C il tampone concentrato per sciogliere eventuali cristalli, poi miscelarlo con cura. Prima dell'uso diluire il tampone concentrato riscaldato 1:20 (1+19) con acqua distillata.

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.

Preparazione dei campioni

Triturare finemente il campione e miscelare con cura. Pesare 1 g del campione così preparato, aggiungere 20 ml di tampone di estrazione diluito ed estrarre per 10 minuti a 60°C. Il tampone d'estrazione deve essere preventivamente portato alla temperatura di 60°C. Centrifugare il campione per almeno 10 minuti a 2500 g, possibilmente a 4°C, filtrare il surnatante. Nel saggio utilizzare 100 µl del surnatante ottenuto per ogni pozzetto.

Esecuzione del test.

Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni. Aggiungere 100 µl di ciascuna soluzione standard o di campione preparato ai pozzetti corrispondenti, miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la micropiastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. 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, quindi svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre due volte. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di coniugato all'enzima diluito, miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio. 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, quindi svuotarli nuovamente. Ripetere l'operazione altre due volte. 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 e al buio. Aggiungere in ogni pozzetto 100 μ l di soluzione di stop. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm contro aria, entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione stessa

Risultati

La concentrazione dell'uovo può essere letta direttamente sulla curva standard. Il risultato viene espresso come ppm di uovo intero in polvere. Lo standard RM8445 contiene il 49% delle proteine totali. Se si moltiplica il risultato per 0.49, si ottiene un valore in ppm di proteine totali. Se il risultato viene invece moltiplicato per 0.263 allora si ottiene il valore in ppm di proteine d'albume d'uovo.