BioSystems

COD 14113 96 tests
Reactivos para medir la concentración de caseína en muestras de alimentos
Solo para uso *in vitro* en el laboratorio

CASEINA

ELISA

INFORMACIÓN GENERAL

La leche de vaca es el alérgeno alimentario más frecuente en lactantes y niños. Incluso cantidades muy bajas de leche de vaca pueden causar reacciones alérgicas que pueden llevar a un choque anafiláctico en los casos más graves. Debido a esto, las personas alérgicas a la leche deben evitar de manera estricta el consumo de leche o de alimentos que contengan leche. En particular, la presencia de proteínas de leche ocultas en alimentos como por ejemplo productos cárnicos, galletas, comida preparada o bebidas, representa un problema crítico para las personas alérgicas a la leche. De acuerdo con la Directiva de la UE 2003/89/CE es obligatorio declarar en la etiqueta la adición de leche de vaca como ingrediente en los alimentos. Para detectar la proteína de la leche de vaca en los alimentos se requieren sistemas de detección sensibles.

Las α-, ß- y κ-caseínas son alérgenos termoestables que representan aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche de vaca.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ELISA de Caseina es un enzimoinmunoensayo para el análisis cuantitativo de trazas de caseína en muestras de galleta, pan rallado, productos cárnicos, zumo de naranja, vino, productos de soja y chocolate.

La caseína de la muestra se une a un anticuerpo específico contra la caseína que está inmobilizado en la superficie de los pocillos. En una segunda incubación se adiciona otro anticuerpo contra la caseína que está conjugado con peroxidasa y que se une a la caseína unida al pocillo. Finalmente, se añade tetrametilbenzidina (TMB) a cada pocillo como sustrato de la enzima y, tras el desarrollo de color, se detiene la reacción enzimática con ácido sulfúrico. El producto amarillo formado se mide a 450 nm, y es proporcional a la concentración de caseína presente en la muestra.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

A. Tampón de Lavado Concentrado. 60 mL. Tampón fosfato en solución salina.

B. Tampón de Dilución Concentrado. 2 x 120 mL. Tampón carbonato. Color rojo.

D. Conjugado. 15 mL. Anticuerpo anti-caseína conjugado con peroxidasa. Color rojo.

E. Sustrato. 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

F. Solución de Paro. 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.

PELIGRO: H315: Provoca irritación cutánea. H319: Provoca irritación ocular grave. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P362: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

M. Microplaca. 12 tiras de 8 pocillos recubiertos con anticuerpos anti-caseína.

S1-S5. Patrones de Caseína Concentrados. 5 x 2,0 mL. Concentración: 0, 0,2, 0,6, 2 y 6 mg/L (ppm). Color verde.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8ºC. Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Los componentes líquidos son estables una vez abiertos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven a la temperatura recomendada, bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca: roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Ejerza las precauciones habituales requeridas para manipular todos los reactivos de laboratorio. Las fichas de seguridad están disponibles para el usuario bajo petición. La eliminación de todos los residuos debe ser conforme a las normativas locales. Cualquier incidente grave que pueda ocurrir en relación al dispositivo debe ser comunicado a BioSystems S.A.

MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS (NO PROPORCIONADOS)

- Cámara húmeda.
- Pipeta multicanal o lavador automático de microplacas.
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta, y filtro de 450 $\pm$10 nm.
- No se proporcionan los reactivos y materiales necesarios para el tratamiento de las muestras.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de Lavado. Diluir el Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada en la proporción 1/10. Mezclar. Estable 4 semanas a 2-8ºC.

Tampón de Dilución. Diluir el Tampón de Dilución Concentrado (B) con agua destilada en la proporción 1/5. Mezclar. Estable 1 semana a 2-8ºC.

Patrones de Caseína. Diluir 20 µL de cada patrón con 1980 µL de Tampón de Dilución para conseguir las concentraciones indicadas arriba. Estables 24 horas a 2-8ºC.

Los demás componentes están listos para su uso.

Los reactivos A, B o E pueden precipitar durante el almacenaje refrigerado. Calentar a 37ºC y agitar hasta disolver antes de utilizarlos.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Debe obtenerse una muestra homogénea y representativa del compuesto.

1. Triturar y pulverizar la muestra (5 g) hasta obtener un polvo fino y homogéneo (Nota 1).
2. Diluir 0,5 g (ó 0,5 mL, líquidos) del compuesto homogéneo con 10 mL (9,5 mL para líquidos) del Tampón de Dilución e incubar durante 15 min en un baño de agua a 60°C. Agitar la suspensión cada 2 minutos.
3. Centrifugar la suspensión durante 10 minutos a 2000 x g. Separar completamente el sobrenadante del precipitado. Filtrar si es necesario.
4. Las muestras de carne y salchicha deben ser diluidas 1+4 con Tampón de Dilución.

PROCEDIMIENTO

Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente. Se recomienda realizar las determinaciones por duplicado.

1. Abrir la bolsa de la Microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
2. Pipetear 100 µL de los patrones (S1-S5) y de las muestras tratadas en los pocillos de la placa.
3. Incubar (Nota 3) durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
4. Aspirar o desechar el contenido y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de Tampón de Lavado (Nota 4).
5. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en todos los pocillos.
6. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
7. Aspirar o desechar el contenido y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de Tampón de Lavado.
8. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en todos los pocillos.
9. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
10. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en todos los pocillos y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente (Nota 5).
11. Leer la absorbancia del contenido de los pocillos a 450 nm (Nota 6). El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Representar gráficamente los valores medios de absorbancia para cada patrón en el eje Y frente a las correspondientes concentraciones de caseína en el eje X. La concentración de caseína en las muestras se calcula por interpolación de los valores de absorbancia en la curva de calibración (curvas recomendadas: 4-parámetros, spline cúbica, hipérbola).

La siguiente tabla contiene un ejemplo de una curva de calibración típica. El % de unión se ha calculado en forma de porcentaje relativo a la absorbancia obtenida para el patrón de 6 ppm.

Estos valores son solo un ejemplo y no deben utilizarse en lugar de una curva de calibración con los resultados obtenidos en cada ensayo.

Caseína mg/L (ppm)	% unión
6	100
2	75
0,6	44
0,2	23
0	8

Los patrones, una vez diluidos, permiten la determinación directa de concentraciones en las muestras. La dilución de las muestras que se produce en el proceso de extracción ya se ha tenido en cuenta.

En caso de utilizar el proceso de extracción para muestras de carne y salchicha, la concentración determinada debe multiplicarse por 5 para obtener la concentración de la muestra.

Para el cálculo, la concentración de caseína se ha de multiplicar por un factor de conversión específico (F) que depende del tipo de materia prima. Para llevar a cabo la validación del método se han determinado los siguientes factores de conversión:

Muestra	factor
Leche entera	42
Leche desnatada en polvo (MoniQA MQA 092014)	4,4
Leche desnatada en polvo (NIST RM1549)	3,6
Leche entera en polvo (NIST RM8435)	4,9
Caseinato	1,2

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 0,03 ppm.
- Límite de Cuantificación: 0,2 ppm. Debido a la variedad de posibles matrices de las muestras y a su influencia sobre el blanco, se recomienda que los resultados inferiores al límite de cuantificación sean informados como negativos.
- Linearidad: En diluciones seriadas de muestras (galletas, pan rallado, productos cárnicos, zumo de naranja, vino, productos de soja y chocolate) adicionadas con caseina, se obtuvo una linearidad de 100-127 %.
- Límite de linearidad: Para valores superiores a 6 ppm, diluir la muestra 1/10 con Tampón de Dilución y repetir el análisis. Esta dilución adicional debe tenerse en cuenta al calcular la concentración en la muestra.
- Precisión: Intraensayo (5-11 %), interensayo (8-14 %).
- Especificidad: La reactividad por reacción cruzada es < 1,2 % para la leche de oveja y < 1,1 % para la leche de cabra. No se ha detectado reacción cruzada con los siguientes alimentos:

Almendra	Avellana	Semilla de calabaza
Cebada	Lecitina	Arroz integral
Vaca	Haba	Arroz
Nuez de Brasil	Avena	Centeno
Trigo sarraceno	Guisante	Sacarosa
Pollo	Cacahuete	Sésamo
Garbanzo	Nuez pecana	Camarones
Cacao	Piñón	Soja
Coco	Pistacho	Guisante partido
Bacalao	Semilla de amapola	β-Lactoglobulina
Maiz	Cerdo	Nuez
Huevo	Gamba	Trigo

- Recuperación: La recuperación media se determinó añadiendo distintas cantidades de caseina a las muestras:

Muestra	Media
Galletas	99%
Pan rayado	84%
Chocolate	85%
Salchicha	82%
Leche de soja	94%
Zumo de naranja	84%
Vino blanco	102%
Vino tinto	102%

NOTAS

1. Debido al elevado riesgo de contaminación cruzada, es necesario que todos los instrumentos que se utilicen (aplicador, mortero, recipientes de vidrio etc.) sean cuidadosamente lavados antes y después de cada muestra.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
3. Se recomienda realizar todas las incubaciones en una cámara húmeda para proteger la microplaca de la evaporación y de la luz.
4. El lavado puede realizarse de forma manual o utilizando un lavador automático. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
5. La Solución de Paro detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el Sustrato en el paso 8.
6. Algunos lectores de microplacas permiten realizar lecturas bicromáticas. En estos casos, utilizar una longitud de onda secundaria en el rango de 600-700 nm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hefle SL, et al. (2004) – Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail milk-allergic complaint foods. J Food Prot, 67(9):1933-38
2. Patrick W, et al. (2009) – Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-Page, Western blot and immunostaining. J Agric Food Chem, 57(18):8399-405
3. Watanabe H et al. (2005)- Study on detection of allergenic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. Sho Eis Zas, 46(4):139-47

BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)
www.biosystems.global