

COD 14123 96 tests
Reactivos para medir la concentración de leche en muestras de alimentos
Solo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio

## INFORMACIÓN GENERAL

La leche bovina es uno de los alérgenos alimentarios más importantes especialmente en niños. Incluso muy pequeñas cantidades de leche bovina pueden ocasionar reacciones alérgicas que pueden derivar en un choque anafiláctico en casos severos. Por esto, las personas alérgicas a la leche deben evitar de forma estricta el consumo de leche y de alimentos que contengan leche. Concretamente, la presencia de proteínas de leche ocultas en los alimentos, como embutidos, galletas, alimentos precocinados o bebidas, representa un problema crítico para personas alérgicas a la proteína de la leche bovina. De acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 2003/89/EG, la adición de leche de vaca debe ser declarada en la etiqueta de los alimentos. Se precisan sistemas con la sensibilidad adecuada para poder detectar trazas de proteína de leche de vaca en los productos alimenticios.

Aproximadamente el 80 % de las proteínas de la leche bovina son caseínas. Además, la  $\beta$ -lactoglobulina, el alérgeno mayoritario en el suero de la leche, representa el 10 % del total de proteínas.

## FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ELISA de Leche es un ensayo inmunoenzimático para el análisis cuantitativo de trazas de leche en alimentos y está validado en galletas, pan rallado, embutidos, zumo de naranja, vino, productos de soja y chocolate.

La leche de la muestra se une a un anticuerpo específico contra las proteínas de la leche y que está inmovilizado en la superficie de los pocillos. En una segunda incubación se adiciona otro anticuerpo contra las proteínas de la leche que está conjugado con peroxidasa y que se une a las proteínas de la leche unidas 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 leche 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 Tris. Color rojo.

**D. Conjugado.** 15 mL. Anticuerpo anti-proteínas de leche 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.

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

**S1-S5. Patrones de Leche Concentrados.** 5 x 2,0 mL. Concentración: 0, 0,4, 1, 4 y 10 mg/L (ppm). Las concentraciones son trazables al CRM 1549 del NIST. Color azul.

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 °C. 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 ± 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 2-8 °C.

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

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

Los demás componentes están listos para su uso.

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

## PRECAUCIONES

- La Solución de Paro contiene ácido sulfúrico. Evitar el contacto con la piel.
- Evitar el contacto de los materiales biológicos con la piel y mucosas.
- No pipetear con la boca.
- No comer, beber, fumar, almacenar o preparar comida, o aplicar cosméticos en el área de trabajo designada.
- El TMB es tóxico por inhalación, en contacto con la piel o si es ingerido. Manejarlo con el debido cuidado.
- No utilizar componentes caducados y no mezclar componentes de distintos lotes.

## 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, líquidos) del Tampón de Dilución e incubar durante 15 minutos 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 diluirse 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 diluidos (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 leche en el eje X. La concentración de leche 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 10 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.

Leche mg/L (ppm)	% unión
10	100
4	86
1	50
0,4	32
0	9

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 proteína de leche se ha de multiplicar por un factor de conversión específico (F) dependiente del tipo de materia prima. Para llevar a cabo la validación del método se han determinado los siguientes factores de conversión:

Leche desnatada en polvo (NIST RM1549)	2,7
Leche entera en polvo (NIST RM8435)	4,4
Caseinato	1,0
$\beta$ -Lactoglobulina	1,1

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Límite de detección: 0,05 ppm. En la validación del método empleando diferentes matrices se obtuvieron los siguientes límites de detección:

Bebida de soja	0,13
Zumo de naranja	0,10
Vino blanco	0,03
Pan rallado	0,08
Galletas	0,16
Chocolate	0,10
Embutidos	0,18

– Límite de Cuantificación: 0,4 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.

– Linealidad: En diluciones seriadas de muestras (galletas, pan rallado, chocolate, embutidos, bebida de soja, zumo de naranja y vino blanco) adicionadas con leche, se obtuvo una linealidad de 80-130 %.

– Límite de linealidad: Para valores superiores a 10 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 (8-10 %), interensayo (10-17 %).

– Especificidad: La reactividad por reacción cruzada son 0,94 % para la leche de oveja y 0,01 % para la leche de cabra. No se ha detectado reacción cruzada con los siguientes alimentos:

Huevo	Sésamo	Almendra
Trigo	Mostaza	Cacao
Centeno	Altramuz	Vaca
Cebada	Apio	Cerdo
Avena	Cacahuete	Pollo
Arroz	Avellana	Bacalao
Maíz	Pistacho	Soja
Nuez		

– Recuperación: La recuperación media se determinó añadiendo distintas cantidades de leche a las muestras:

Muestra	Media
Galletas	102 %
Pan rallado	110 %
Chocolate	99 %
Embutido	88 %
Bebida de soja	79 %
Zumo de naranja	106 %
Vino blanco	122 %

## NOTAS

- 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.
- Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
- Se recomienda realizar todas las incubaciones en una cámara húmeda para proteger la microplaca de la evaporación y de la luz.
- 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.
- 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.
- 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

- De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin. J of Food Protection, 70(7):1691-97
- Restani P, et al. (1999) – Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. Clin Exp Allergy, 29(7):997-1004
- Mäkinen-Kiljunen S, et al. (1992) – A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin. Allergy, 47(4):347-52
- 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
- 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
- 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
- Downs ML, Taylor SL (2010) – Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. J Agric Food Chem, 58(18):10085-91
- De Luis R, et al. (2007) – Development of two immunoassay formats to detect  $\beta$ -lactoglobulin: influence of heat treatment on  $\beta$ -lactoglobulin immunoreactivity. J Food Prot, 70(7):1691-7
- Abbott M, et al. (2010) – Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. J AOAC Int, 93(2):442-50
- Levin ME, et al. (2005) – Anaphylaxis in a milk-allergic child after ingestion of soy formula cross contaminated with cow's milk protein. Pediatrics, 116(5):1223-5