



Stick cGMP

para la detección de glicomacropéptido de caseína en leche.

for the detection of casein glycomacropeptide (cGMP) in milk.

pour la détection du glycomacropeptide (cGMP) issu de la caséine du lait.



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN

+34 976 503597

ES Stick cGMP

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de glicomacropéptido de caseína en leche

UTILIZACIÓN SUGERIDA

Stick cGMP ha sido diseñado para la detección del glicomacropéptido de la caseína (cGMP) en leche. Esta molécula puede encontrarse en mayor concentración cuando la leche se encuentra adulterada con sueros procedentes de quesería.

FUNDAMENTO

El test de cGMP es un test inmunocromatográfico para la detección cualitativa de glicomacropéptido de caseína en leche. Esta proteína se produce por degradación de la caseína presente en dicha leche por el efecto de enzimas o bacterias, lo que en la mayor parte de las ocasiones se produce a lo largo del proceso de fabricación de quesos (para el que se emplean proteasas que rompen específicamente la caseína produciendo la cGMP). Por ello la cantidad presente en los sueros de dichos quesos es muy elevada y el incremento de su concentración en leche suele ser un indicativo de la adulteración de ésta con esos sueros de quesos. Otros procesos degradativos (frecuentemente relacionados con la actividad de bacterias presentes en los productos lácteos) son también capaces de incrementar la concentración de cGMP, pero no de forma tan espectacular.

Este test rápido e inmunológico de cGMP es muy sensible, lográndose detectar niveles de GMP que podrían indicar adulteraciones del 4% de suero de queso en leche, e incluso si las condiciones de ordeño, conservación, transporte y procesado son óptimas, podría llegarse hasta un 2% ó un 1%

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TEST.

La cGMP que pudiera estar presente en las muestras de leche reacciona con las partículas coloidales coloreadas que están recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos frente al glicomacropéptido. Este complejo partículas coloidales/anticuerpos/GMP migra por un proceso cromatográfico por la zona de reacción. En esta zona hay otros anticuerpos anti-GMP que reaccionan con el complejo. Esta reacción origina la formación de la línea roja.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

STICK cGMP	Kit 50 tests
Tiras de reacción	50
Vial con tampón de dilución de la muestra (250 ml)	1

STICK cGMP	Kit 5 tests
Tiras de reacción	5
Vial con tampón de dilución de la muestra (25 ml)	1

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

1. Acido tricloroacético (TCA) para la precipitación de la caseína íntegra
2. Pequeña centrífuga de laboratorio y/o filtros de 5 micras (ó de 0.2 micras en su defecto)
3. Tubos de ensayo o viales tipo "Eppendorf" para la dilución de muestras de sobrenadantes (una unidad para la precipitación por TCA / centrifugación y tres unidades para realizar la dilución –por cada muestra a analizar-).
4. Tubos de ensayo pequeños o microplacas de 96 pocillos de fondo plano para la realización del test (un tubo o pocillo por cada muestra).
5. Micropipetas calibradas para la preparación precisa de las diluciones: pipetas de 100 y 900 (ó 1000) μ l.
6. Pipeta para la adición del volumen aproximado de muestra al tubo (250-500 μ l, dependiendo del tamaño del tubo) o al pocillo de la microplaca (aproximadamente 150 μ l de muestra al pocillo) donde se introducirá la tira para realizar el test.
7. Cronómetro.

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. No intercambiar reactivos de kits con distinto numero de lote.
3. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.

4. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
5. Es importante realizar las diluciones pertinentes de forma **muy precisa**, ya que en caso contrario el factor de dilución final sería muy diferente del deseado y no se podrían garantizar la sensibilidad ni la especificidad del test.
6. Es importante añadir la cantidad correcta de muestra. Si la cantidad empleada de muestra fuera baja puede ser que no se produzca correctamente la cromatografía, mientras que si fuera demasiado alta podría diluirse el reactivo y dar una línea débil.
7. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
8. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
9. En el caso del producto Stick envasado en tubo es importante que se vuelva a **cerrarlo de manera inmediata** una vez sacada la tira reactiva dado que una humedad ambiental elevada podría dañar al resto de tiras que permanecen en el interior del tubo.
10. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información respecto a la lotificación de los componentes.

ALMACENAMIENTO

Las tiras reactivas se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30°C. Su fecha de caducidad está impresa en la envoltura.

El tampón de dilución de muestra se debe sacar de la caja y conservarse a 4°C en nevera.

MUY IMPORTANTE. No deje abierto el envase protector del dispositivo de reacción sin usarlo a continuación, puesto que puede deteriorarse. La humedad estropea las tiras.

LIMITACIONES EN ENSAYO DE LAS MUESTRAS DEL LECHE

Se recomienda no analizar muestras de leches en las siguientes situaciones:

- Leches no almacenadas correctamente (cadena de frío rota, por ejemplo)
- Leches muy ácidas

En todas ellas se han podido producir procesos degradativos que, aun no siendo específicamente productores de cGMP, podrían romper de forma no específica la caseína de la leche y dar como resultado un incremento de la concentración del glicomacropéptido.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

Las muestras de leche deben ser recogidas en recipientes limpios. **Deben conservarse refrigeradas para reducir la acción bacteriana, ya que ésta podría incrementar la concentración de GMP.** Para guardarlas por más tiempo se deben congelar a -18°C ó -70°C (si fuera posible). En este caso, antes de someter estas muestras al test, deberán descongelarse y alcanzar la temperatura ambiente. Las muestras no deben de congelarse/descongelarse más de una vez.

Leche en polvo: Reconstituir la leche en polvo disolviendo 10 g de muestra en 100 ml de agua (agua destilada). Agitar durante 10 minutos a una temperatura de 40°C para una completa disolución.

PROCEDIMIENTO:

1.- Procedimiento de tratamiento de las muestras (leche)

1. Tratar la muestra de leche para separar la caseína de la leche del glicomacropéptido. Para ello **mezclar TCA y la muestra de leche** de forma que la concentración final de TCA en la mezcla precipitante sea de aproximadamente el 8% (por ejemplo, mezclar 6 ml de leche con 4 ml de TCA comercial al 20% en peso). Agitar manualmente durante unos segundos y dejar actuar durante 10 minutos.
2. **Centrifugar** la mezcla resultante **aproximadamente desde 100 x g durante 20 minutos hasta 2000 x g durante 10 minutos** con el objeto de separar el precipitado (que incluye la caseína no soluble al pH empleado) del sobrenadante (donde ha quedado la cGMP, soluble en dichas condiciones).
3. Para asegurar una completa separación **filtrar el sobrenadante** empleando un filtro de 5 micras con baja absorción de proteínas (pueden emplearse otros tamaños de poro)
4. Transferir con una micropipeta calibrada **900 µl de diluyente de muestra a 3 viales** (tubo de ensayo o Eppendorf).
5. Añadir al primer vial –con una micropipeta calibrada- una porción de 100 µl del sobrenadante obtenido en el punto 3 sobre los 900 µl del tampón de dilución de la muestra. Mezclar bien empleando la misma pipeta (bombear con cuidado varias veces los 100 µl). Esto constituye la primera **dilución 1/10**.
6. Tomar 100 µl de este primer vial y añadirlos al segundo vial con otros 900 µl de tampón de dilución de la muestra. Mezclar bien empleando la misma pipeta (bombear con cuidado varias veces los 100 µl). Esto constituye la **dilución 1/100**.
7. Tomar 100 µl de este segundo vial y añadirlos al tercero con otros 900 µl de tampón de dilución de la muestra. Mezclar bien empleando la misma pipeta (bombear con cuidado varias veces los 100 µl). Con esto se dispone de

una dilución 1/1.000 del sobrenadante de la precipitación que contenía el 60% de leche en TCA, obtenida a partir de 3 diluciones seriadas 1/10. A ello se denomina **dilución 1/1.000**.

8. **Se recomienda** realizar **inicialmente** una **dilución 1/4000** (1/4 de la dilución 1/1000): Tomar 100 µl de este tercer vial y añadirle 300 µl de tampón de dilución de la muestra). Esta dilución 1/4000 equivale a un límite de detección del 4% de suero en leche. Si la mayoría de las muestras dan negativas para esta dilución 1/4000, ir probando la dilución 1/2000 (que equivaldrá a un límite del 2%) e incluso 1/1000 (que equivaldrá a un límite del 1%). La dilución óptima dependerá de la calidad microbiana de la muestra, que a su vez depende de las condiciones de manipulación y conservación de cada leche, diferentes según la explotación y país de procedencia.

2.- Realización del test:

1.- Con la ayuda de una micropipeta, transferir **500 µl del sobrenadante de la muestra** a valorar a un tubo de ensayo (o 150-250 µl a un pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano).

2.- **Introducir la tira reactiva** en el tubo de ensayo (o pocillo de la microplaca) , con las flechas indicando hacia el fondo del tubo o microplaca. **IMPORTANTE:** el líquido no debe nunca rebasar la punta de las flechas; si fuese necesario, utilizar un tubo mas ancho o reducir la cantidad de muestra.

3.- Tras **5 minutos** exactos tras la adición de la tira a la muestra*, leer el resultado revelado en la zona central blanca de la tira.

* Alternativamente la tira se puede sumergir por 10-20 segundos en el tubo o pocillo de la microplaca y luego ser extraída para dejarla reaccionar sobre una superficie horizontal.

RESULTADOS

NEGATIVO: (dependiendo de la dilución indicará leches entre 4-1% de cGMP). Solo aparece una línea transversal **AZUL** en la zona central del dispositivo de reacción. Siempre debe aparecer ésta línea.

POSITIVO: Además de la línea **AZUL** aparece otra línea transversal **ROJA** en la zona central del dispositivo de reacción. La intensidad de ésta coloración va a ser variable según la concentración presente en la muestra.

Si no aparece ninguna línea coloreada en la zona blanca central, o no aparece la línea azul, el test será **INVALIDO** porque no se ha procedido correctamente, porque los reactivos se han deteriorado o por una cantidad incorrecta de muestra. Repetir el test con una nueva tira.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados 5 minutos no tendrá valor diagnóstico.

El análisis final de los resultados deberá tener en cuenta posibles factores que hubieran podido aumentar la concentración del glicomacropéptido en la leche no relacionados con la adulteración de ésta.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea azul el test es invalido, ya sea por que se llevó a cabo incorrectamente o por que los reactivos se han deteriorado.

Se recomienda repetir el test con un nuevo dispositivo de reacción.

CARACTERISTICAS DEL TEST

1. SENSIBILIDAD

El límite de sensibilidad evaluado frente a una solución de GMP Sigma (Referencia C-7278) es de 15 -30 ng/ml en la muestra final analizada en la tira; esto significa se que pueden detectar 15 - 30 µg/ml en la muestra original precipitada (lo que equivale a un 1-2 % de suero de queso en leche para un factor de dilución 1/1000 y un contenido en leche de la mezcla precipitante -que típicamente ronda el 60%. También dependerá del protocolo de preparación de la mezcla TCA+leche.

Para su determinación se han analizado diferentes soluciones de GMP en el tampón de dilución de la muestra preparadas a partir de una solución madre de GMP de 1 µg/ml (1000 ng/ml). Dicho análisis se ha realizado de 2 modos: determinando el resultado de forma visual –cualitativa- y empleando un lector de tiras inmunocromatográficas –cuantitativo-.

2. ESPECIFICIDAD

El uso de anticuerpos monoclonales en la elaboración de Stick cGMP asegura su alto grado de especificidad para la detección de GMP o de la k-caseína y no de otras especies; sin embargo, la caseína se detecta de forma similar al GMP, por lo que siempre deberá de realizarse previamente una separación de la k-caseína por precipitación con TCA.

Compuesto	Concentración de partida (antes de diluir)	Resultado
k-caseína	3 gramos/litro	+
caseína total	3 gramos/litro	+

3. ESTUDIO COMPARATIVO

Se llevó a cabo un estudio comparativo sobre 60 muestras en Brasil, para detectar la presencia de suero de queso en leche. Los resultados obtenidos con la tira se compararon con los obtenidos por el método de referencia, el HPLC y el método colorimétrico del ácido siálico.

HPLC		Stick cGMP		Método del ácido siálico	
Porcentaje cGMP	Nº de muestras				
<2%	6	Todas negativas		2 ligeramente mayor que el blanco	4 análogo al blanco
2 – 4%	18	8 negativas (Valores entre 2 y 2.5%)	10 positivas	3 análogo al blanco 5 menor que el estándar 2%	10 análogo al estándar 2%
>4%	36	Todas positivas		2 menor que el estándar 2% 11 análogo al estándar 2% 10 entre los estándares 2 – 5 %	8 análogo al estándar 5% 5 mayor que el estándar 5%

La tira mostró siempre resultados positivos para aquellas muestras en las que el porcentaje de suero añadido era mayor del 4% de acuerdo al HPLC. La única diferencia en los resultados tuvo lugar en aquellas muestras con una concentración determinada por HPLC de entre 2 y 4%, cantidad en la zona del límite de detección del test. En estos casos, la cantidad de suero añadido fue muy pequeña e improbable de tener un impacto tecnológico.

El método del ácido siálico mostró que el suero de queso no siempre se detecta correctamente. Las dos muestras detectadas como negativas (en el caso >4%) tenían en realidad concentraciones superiores al 10%.

4. SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se han evaluado las sustancias descritas en la tabla y a las concentraciones ensayadas (superiores a las presentes en la leche) no poseen ningún efecto sobre el resultado del test.

Compuesto	Concentración de partida (antes de diluir)	Resultado
BSA	10 %	-
Anticuerpos bovinos (PAb IgG's)	1%	-
Lactosa	10%	-
Lactoalbúminas (α y β)	4 gramos/litro (total LA)	No disponible

5. PRECISIÓN INTRA-ENSAYO - REPETIBILIDAD

Se estudiaron diez replicas de tres concentraciones (Control negativo; Control positivo bajo y Control positivo) de la curva de sensibilidad y se obtuvieron los mismos resultados.

6. PRECISIÓN INTER-ENSAYO - REPRODUCIBILIDAD

PRECISIÓN INTER-DIA

Con un lote de producto se estudiaron diez replicas de la curva de sensibilidad a lo largo de diez días consecutivos, sin que se observaran diferencias en los resultados de la evaluación.

PRECISIÓN INTER-LABORATORIO

Tres laboratorios diferentes estudian las mismas muestras, presentando una alta precisión y concordancia. Sólo se aprecia una diferencia de una dilución $\frac{1}{2}$, asumible y tolerable por el ensayo realizado.

PRECISIÓN INTER-LOTE

Basándose en datos históricos de todos los lotes fabricados del producto, se estudia la curva de sensibilidad de todos ellos. Tan sólo se aprecian diferencias de una dilución $\frac{1}{2}$, asumible y tolerable por el ensayo realizado.

7. EFECTO HOOK

Con el fin de verificar si una alta concentración de cGMP puede afectar a la eficiencia del test (prozona) se analizaron un gran número de concentraciones desde 1.106 hasta 1 $\mu\text{g/ml}$. Cerca de 4 órdenes pueden ser detectadas visualmente con el stick cGMP y la mayor de las concentraciones detectables (más alta de 50 $\mu\text{g/ml}$) son mucho más elevadas que las de suero de queso puro después de una dilución 1/1000.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

¿Qué dilución he de realizar a mis muestras de leche?

Se ha indicado anteriormente que la GMP puede tener dos orígenes:

- 1.- Un origen fraudulento por adición de suero de quesería.
- 2.- Pero también puede tener un origen microbiano (en menor cantidad que el fraudulento), típico en leches no conservadas íntegramente en frío o leches envejecidas, donde la flora láctica de la leche ha aumentado y provocado procesos de proteólisis (y formación de GMP).

Así pues, el nivel basal de GMP en leches no adulteradas es no-nulo y dicho valor puede estar incrementado en determinados casos, por lo que se podrían obtener falsos positivos con leches no adulteradas al emplear la dilución 1/1.000 ó 1/2000 sobretodo si la carga bacteriana fuese elevada. Si esto fuera así, se debe aumentar la dilución para reducir la capacidad de detección del test, con lo que la falsa positividad desaparecerá a la vez que se reduce la sensibilidad o límite inferior detectable.

Por ello se recomienda comenzar los análisis realizando una dilución 1/4000 (límite 4%) y en función de los resultados (si la mayoría son negativos o la calidad de la leche es muy buena) ir disminuyendo hasta una dil 1/2000 (límite 2%) ó incluso 1/1000 (límite 1%) hasta que se consiga determinar el límite óptimo.

En resumen:

En zonas de muy elevada calidad microbiana de la leche (leche desde su ordeño es conservada en frío, es transportada en frío y procesada en menos de 24 horas) la cantidad de bacterias lácticas es baja y los procesos de proteólisis lo serán también muy bajos, por lo que se puede tomar como límite el 1%. Es decir, haremos una dilución de la muestra 1/1.000 y esa dilución es la que vamos a medir con las tiras reactivas. Así cuando veamos en el test línea positiva rosa/roja esto implica que la muestra posee más de 1% de GMP.

En zonas de no tan buena calidad microbiana de la leche la cantidad de bacterias lácticas o general puede ser mayor y los procesos proteolíticos estarán incrementados, por lo que se recomienda usar como límite el 2%. Es decir haremos una dilución de la muestra 1/2.000. Así, cuando veamos en el test línea positiva rosa/roja esto implica que la muestra posee más de 2% de GMP. En este caso si hubiésemos hecho la dilución 1/1.000 en lugar de 1/2.000 algunas muestras con carga microbiana ligeramente alta y sin adulterar con suero de quesería podrían haber dado un resultado positivo.

En zonas donde se puede romper la cadena de frío o el procesado de la leche sea de más de 36-48 horas, la cantidad de bacterias lácticas puede ser todavía mucho mayor y los procesos proteolíticos estarán incrementados más que en el caso anterior. En estas situaciones se recomienda usar como límite el 4%. Es decir, haremos una dilución de la muestra 1/4.000 y cuando veamos en el test línea positiva rosa/roja esto implica que la muestra posee más de 4% de GMP. En este caso si hubiésemos hecho la dilución 1/2.000 en lugar de 1/4.000 algunas muestras con carga microbiana muy alta pero sin adición de suero de quesería podrían dar un resultado positivo.

¿Existe un estándar o control de referencia?

Con el objeto de disponer de un control externo, Operon sugiere la posibilidad de preparar un Control Positivo con 4% de cGMP. (Se trata de cGMP Sigma Referencia C-7278). Esta cGMP debe diluirse en tampón diluyente de la muestra (tampón Tris/HCl 0,25M pH=7.2, 1M NaCl, BSA 1%, azida Na 0,1%). Este estándar debe ser utilizado dentro de las 24 horas siguientes a su preparación manteniéndolo a 4°C durante los tiempos de espera y debe desecharse tras su uso.

Este control puede diluirse en diferentes proporciones en función del límite que se quiera detectar (que como ya hemos dicho, dependerá de la calidad microbiana de las leches a analizar):

Deberá ser diluido 1/4.000 si se desea ver una señal que da un contenido de GMP al 4% como límite; 1/2.000 si se desea ver un 2% como límite ó 1/1.000 si se desea ver un 1% como límite.

Con este control puede observarse la intensidad de la señal correspondiente al límite elegido para comparar con las muestras reales (que deberán prepararse en la dilución adecuada para dicho límite. Ver punto 8 del apartado "Procedimiento de tratamiento de las muestras")

Valoración del standard de referencia: 4% de suero en queso

- 1.- Con la ayuda de una micropipeta, transferir 500 μ l de la dilución del standard de referencia a valorar a un tubo de ensayo (o 150-250 μ l a un pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano).
- 2.- Introducir la tira reactiva en el tubo de ensayo (o pocillo de la microplaca) , con las flechas indicando hacia el fondo del tubo o microplaca. **IMPORTANTE:** el liquido no debe nunca rebasar la punta de las flechas; si fuese necesario, utilizar un tubo mas ancho o reducir la cantidad de muestra.
- 3.- Tras 5 minutos exactos tras la adición de la tira al standard, comparar con la tira de la leche a evaluar leyendo el resultado revelado en la zona central blanca de la tira.

EN **Stick cGMP**

Immunochromatographic one step test for the qualitative detection of casein glycomacropeptide (cGMP) in milk.

INTENDED USE

Stick cGMP has been designed for the detection of casein glycomacropeptide(cGMP) in milk. This molecule concentration may increase when milk has been adulterated with whey.

BASIS

Immunochromatographic test for the qualitative detection of casein glycomacropeptide (cGMP) in milk. The cGMP is produced by enzymatic or bacterial induced degradation of the casein present in milk. This degradation takes place

during the cheese manufacturing process, where specific proteases are added to act on the milk casein. Therefore **its presence in milk is an indication of milk adulteration with whey**. Other degradation processes (mostly related to the **bacterial activity** present in lactic products) are also capable of increasing the cGMP concentration but not as much as adulteration.

This immunochromatographic test is very sensitive, detecting even GMP levels that could indicate adulterations of the 4% of whey in milk. If the conditions of milk, conservation, transport and process are optimal, levels as low as 2% of whey in milk could be detected.

TEST PRINCIPLE

The cGMP present in the milk samples will react with coloured latex particles coated with monoclonal antibodies against the glycomacropptide. This complex of latex particles/monoclonal antibodies/GMP reaches, through a chromatographic process, the reaction zone, where there are another anti-GMP antibodies that react with the complex. This reaction causes the formation of a red line.

In parallel a similar reaction occurs with the colloidal particles that originate a blue precipitation line.

MATERIALS PROVIDED

STICK cGMP	Kit 50 tests
Test strips	50
Sample dilution buffer bottle (250 mL)	1

STICK cGMP	Kit 5 tests
Test strips	5
Sample dilution buffer bottle (25 mL)	1

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Trichloroacetic acid (TCA) for casein precipitation.
2. Bench top centrifuge and 5.0 μm filters (or 0.2 μm filters).
3. Eppendorf tubes for each supernatant sample dilution: one for TCA casein precipitation/centrifugation and three for serial dilutions- one for each sample.
4. Flat bottom 96-well Microtitter plates for the test (one well per sample).
5. 100 μl , 900 μl or 1000 μl calibrated micropipettes to carry out the dilutions.
6. Calibrated micropipettes for sample addition to the Eppendorf tube (250 – 500 μl) or to the microtitter well (150 μl) where the stick test will be placed.
7. Timer/Stopwatch

PRECAUTIONS

1. All reagents are for *in vitro* use only.
2. Do not interchange kit components from different kit lot numbers.
3. Allow kit components and specimens to reach the room temperature before use, as cold reagents and/or specimens may decrease assay performances. 20-30 minutes are recommended.
4. Do not use kit components beyond labelled expiration date.
5. It is very important to prepare the dilutions very **accurate**. Otherwise, sensitivity or specificity are not guaranteed
6. It is very important to add the correct quantity of sample. If it is lower than the suggest one, the sample may not arrive to the reaction area and the test would not run. If it is higher, the reactive could be diluted and the line very slight.
7. All product used should be rejected according to the legislation in force.
8. Do not use the test if any coloured line can be seen in the test zone before performing the test.
9. Very important: In Stick in tube final format is very important to keep the tube closed after taking a reactive strip. In case of a high environmental humidity the strips that remain in the tube can turn out to be damaged by this environmental factor.
10. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains information regarding the lotification of the components.

STORAGE

The reactive strips can be stored at temperatures between 2°C and 30°C. Their expiry date are printed in the envelope. The sample dilution buffer must be removed from the box and stored at 4°C.

VERY IMPORTANT. Do not leave the test sticks exposed to the atmospheric humidity. Close the tube after taking out the strip.

TEST LIMITATIONS

It is recommended not to test milk samples from:

- Inadequate cold storage. Storage temperature not maintained until consumption.
- Very acid milk.

Degradation processes will take place, in the above mentioned conditions, which could result in the non-specific casein degradation and in an increase in casein glycomacropeptide (cGMP) concentration.

SPECIMEN COLLECTION

Samples will be collected in clean containers and will be kept refrigerated to diminish bacterial activity which could increase cGMP concentration. Long time sample storage will be done at -18°C or -70°C (if possible). Samples can be frozen and defrosted just one time. Defrosted samples must reach room temperature before use.

Milk powder: Reconstitute milk powder by solubilizing 10 g of sample in 100 ml water (distilled water). Stir for 10 minutes at 40°C for complete dissolution.

TEST PROCEDURE

1.- Procedure of treatment of sample (milk)

1. The milk sample will be pretreated to separate the glycomacropeptide (cGMP) from the casein. **Add TCA to the milk sample** to reach a final concentration of 8% (e.g. to 6 mL milk sample add 4 mL of 20% TCA). Mix and wait for 10 minutes.
2. **Centrifuge** the mixture **from approximately 100 x g during 20 minutes to 2000 x g during 10 minutes** to separate the casein precipitate (non soluble at this pH) from the supernatant containing cGMP.
3. **Filter supernatant** through a 5 μm low protein adsorption filter (other pore size could also be used)
4. **Add 900 μl of sample diluent to 3 vials** (assay tubes or Eppendorf)
5. Prepare the **1/10 dilution** by adding 100 μl of supernatant from step 3 to an Eppendorf tube containing 900 μl of sample diluent buffer (pump carefully several times the 100 μl) Mix well using the micropipette.
6. Prepare the **1/100 dilution** by adding 100 μl from the 1/10 dilution to an Eppendorf tube containing 900 μl of sample diluent buffer (pump carefully several times the 100 μl) Mix well using the micropipette.
7. Prepare the **1/1000 dilution** by adding 100 μl from the 1/100 dilution to an Eppendorf tube containing 900 μl of sample diluent buffer (pump carefully several times the 100 μl). Mix well using the micropipette. We call this dilution as 1/1.000 dilution.
8. It is recommended to start with a 1/4000 ditution (4% whey in milk) diluting 1/4 the 1/1000 dilution (add 100 μl of supernatant from step 7 to an Eppendorf tube containing 300 μl of sample diluent buffer) If the most of the results are negative or the milk quality is very good, try with the 1/2000 dilution (2% limit) and even 1/1000 (1% limit) The optimal dilution will depend on the microbial quality of the sample, that depend itself on the conditions of handling and conservation of the milk and also on the farming and country of origin.

2.- Test developing:

- 1.- Using a micropipette **transfer 500 μl supernatant** of the milk dilution into an Eppendorf tube or we can also transfer 150 – 250 μl supernatant of the milk if we use a flat bottom 96-well microtiter plates.
- 2.-**Dip a test stick** into the Eppendorf tube or microtiter plate well with the arrows pointing to the bottom. **IMPORTANT**: the liquid should never overpass the arrows; if necessary use a bigger tube or reduce the sample amount.
- 3.- Read the test result in the central white area of the strip after **5 minutes***

* Alternatively, the stick can be placed in the Eppendorf tube or microtiter plate well for 10-20 seconds after which is removed and placed on a horizontal surface.

RESULTS

NEGATIVE: (depending on the dilution milks will be between 4-1% of cGMP) Only one **BLUE** band appears across the result window. This line must always appear.

POSITIVE: In addition to the **BLUE** control band, a distinguishable **RED** band also appears across the result window. The intensity of the line depends on the concentration of sample.

If no blue line appears, the test is **INVALID**, it has not been correctly run, reagents has been damaged or the sample added was incorrect. Run another test.

Any line or colour that should appear after 5 minutes has no diagnostic value.

The final diagnosis should take into account all factors that could increase glycomacropeptide(cGMP) concentration in the milk and not related to its adulteration.

QUALITY CONTROL

If no blue band appears the test is invalid, since improper test procedure was carried out or deterioration of the reagents has occurred.

It is recommended to repeat the test.

TEST CHARACTERISTICS

1. SENSITIVITY

The sensitivity limit is 15 – 30 ng/mL with GMP Sigma (Ref. C-7278). This means that the test can detect 15 – 30 ug/mL in the precipitated sample (1- 2 % of whey added to milk), taking into consideration the dilution used (usually 1/1000) and the milk content in the precipitate (usually 60% and depending of the sample preparation protocol of TCA+milk).

Sensitivity determination has been carried out using serial dilutions of 1 ug/mL GMP Sigma (Ref. C-7278). Two determinations have been done: qualitative or visual determination and quantitative using an immunochromatographic test-strip reader.

2. SPECIFICITY

Stick cGMP contains monoclonal antibodies that assure the high specificity for GMP or k-casein detection and no other species; however, since casein and GMP are detected in a similar fashion, it is necessary the previous k-casein separation by TCA precipitation.

Compound	Starting concentration (before dilution)	Result
k-casein	3 g/L	+
Total casein	3 g/L	+

3. COMPARATIVE TRIAL

A survey for the detection of added rennet whey in raw milk was carried out in 60 samples from Brazil. The results obtained with the strip test were compared with those obtained with the official HPLC method and the colorimetric sialic acid method.

HPLC		Stick cGMP		Sialic acid method	
cGMP percentage	Nº of samples				
<2%	6	All negatives		2 slightly higher than blank	4 same than blank
2 – 4%	18	8 negatives (values between 2 and 2.5%)	10 positives	3 same than blank 5 lower than standard 2%	10 same than standard 2%
>4%	36	All positives		2 lower than standard 2% 11 same than standard 2% 10 between standards 2 – 5 %	8 same than standard 5% 5 higher than standard 5%

The strip could always detect the presence of rennet whey in samples in which an amount of rennet whey higher than 4% was found by the HPLC. The only difference takes place in samples between 2-4%, close to the limit of detection of the test. In these cases, the amount of added rennet whey was very low and unlikely to have any technological impact.

The sialic acid method showed the whey rennet was not always correctly detected, the two samples detected as negative (in the case >4%) had in fact an amount higher than 10%.

4. INTERFERING SUBSTANCES

None of the possible interfering substances listed below had any effect on the test even though they were assayed at higher concentrations than those found in the milk.

Compound	Starting concentration (before dilution)	Result
BSA	10 %	-
Bovine antibodies (PAb IgG's)	1%	-
Lactose	10%	-
Lactoalbumins (α y β)	4 g/L (total LA)	Not available

5. INTRA-ASSAY PRECISION - REPETEABILITY

Ten replicates of three concentrations (Negative control; Low positive control and Positive control) from the sensitivity curve are tested and the same results are obtained.

6. PRECISION - REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION

Using 1 lot of the product, ten duplicates of the sensitivity curve are performed throughout ten consecutive days. There are no differences in the evaluation.

INTER-LAB PRECISION

Three different laboratories-operators test those same samples, presenting high precision and concordance. Only a difference of one ½ dilution is observed, acceptable and tolerable for the assay.

INTER-LOT PRECISION

Based on the historical data of all manufactured lots and studying the sensitivity curve, there is only a difference of one ½ dilution, acceptable and tolerable for the assay.

7. HOOK EFFECT

In order to verify whether a high concentration of cGMP may affect efficiency of test (prozone or high dose effect) a large number of GMP concentrations from 1.106 to 1 µg/ml were analysed. Close to 4 orders can be visually detected with the Stick cGMP and the higher detectable concentrations (higher than 50 µg/ml) are much higher than those from pure cheese whey after one 1000 fold dilution.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

What dilution should I prepare for the milk samples?

As we have mentioned before GMP can have two different origins:

1.- Milk adulteration with sweet whey.

2.- Bacterial source in milks which are not kept in cold containers and the lactic bacteria's of the milk has increased and have made proteolytic process.

So, it should be taken into consideration that non-adulterated milk samples contain a basal level of casein glycomacropeptide (cGMP). Additionally this basal level can be increased under certain conditions and false positives can be obtained with 1/1000 or 1/2000 dilution from non-adulterated but degraded milk samples. In these cases the sample dilution should be increased to reduce the detection limit of the test so false positiveness would disappear at the same time that sensitivity or lower detection limit.

It is recommended, then, starting with a 1/4000 dilution (4% limit) and depending on the results (if the most of them are negative or the milk quality is very good) decrease the dilution to 1/2000 (2% limit) or even 1/1000 (1% limit) until determination of the optimum limit for our samples.

So, depending on the microbial quality of the raw milk, we will have to select our limit detection.

In places where the microbial quality is excellent (Milk is always kept in containers at 4° C and it is used in less than 24 hours) the quantity of lactic bacteria's is very small, then, the proteolytic process is also very slow and we could select 1% cGMP as limit. In this situation we will prepare the 1/1.000 dilution for the milk sample and this is the dilution that we will use with the Strips. So, if we see a line pink-red in the strip this means that the sample will have more than 1% of GMP.

In places where the microbial quality is not as good as before, the quantity of lactic bacteria's can increase and the proteolytic process can be bigger than in excellent milks. For this group of milks we recommend to select 2% as a limit. So, we will prepare the 1/2.000 dilution for the milk sample and this is the dilution that we will use with the Strips. So, if we use the 1/2.000 dilution and if we see a line pink-red in the strip this means that the sample will have more than 2% of GMP.

In places where the milk is not properly kept under low temperature (4°C) or it is used in more than 36 – 48 hours the lactic bacteria's of the milk can be bigger than in the milks that we have comment before, so the proteolytic process will be increased. For this group of milks we recommend to select 4% as a limit. So, we will prepare the 1/4.000 dilution for the milk sample and this is the dilution that we will use with the Strips. So, if we use the 1/4.000 dilution and if we see a line pink-red in the strip this means that the sample will have more than 4% of GMP.

Can we have a standard or reference control?

You can prepare a Positive control cGMP 4% using the cGMP Sigma (ref: C-7278) diluted in the sample diluent buffer (Tris/HCl buffer 0,25M pH=7.2, 1M NaCl, BSA 1%, Na azide 0,1%). This standard should be used maximum in 24 hours after preparation, keeping it at 4°C during the waiting times. It should be discarded after used.

This control can be diluted in different proportions depending on the desired detection limit (which would depend on the microbial quality from the milks to analyse):

1/4.000 dilution if we select 4% GMP as a limit or dilution; 1/2.000 if we select 2% GMP as a limit or dilution or 1/1.000 if we select 1% GMP as a limit.

With this standard it can be observed the band intensity corresponding to the chosen limit. It can be compared with the real samples (prepared in the right dilution for that limit. See 8. in "Procedure of treatment of sample-milk")

Evaluation of the reference standard cGMP 4%:

1.- Using a micropipette and transfer 500 ul reference standard dilution into an Eppendorf tube or we can also transfer 150 – 250 ul supernatant of the milk if we use a flat bottom 96-well microtiter plates.

2.-Dip a test stick into the Eppendorf tube or microtiter plate well with the arrows pointing to the bottom. IMPORTANT: the liquid should never overpass the arrows; if necessary use a bigger tube or reduce the sample amount.

3.- Read the test result in the central white area of the strip after 5 minutes*.

FR Stick cGMP

(Bandelette cGMP)

Test Immunochromatographique pour la détection du glycomacropeptide issu de la caséine (cGMP) du lait

UTILISATION :

La bandelette cGMP a été mise au point pour détecter le glycomacropeptide de caséine (cGMP) du lait. On peut en effet trouver des concentrations élevées de cette molécule lorsque du lactosérum a été ajouté de façon anormale dans du lait.

PROPOS:

Le test par immunochromatographie cGMP est un test permettant la détection qualitative du glycomacropeptide de caséine du lait. Cette protéine est produite par la dégradation de la caséine présente dans le lait sous l'effet d'enzymes ou de bactéries, mécanisme généralement observé lors de la fabrication des fromages (notamment durant l'étape où des protéases spécifiques sont utilisées afin de rompre et dégrader la caséine en cGMP). Le « petit lait » issu de la fabrication fromagère est donc un composé très riche en glycomacropeptide et l'augmentation de la concentration de cette protéine dans le lait est généralement un marqueur caractéristique de son adjonction au lait. Bien qu'il existe d'autres processus de dégradation de la caséine (souvent associés à l'activité bactériologique présente dans les produits lactés), ils ne sont pas capables d'augmenter la concentration de cGMP de façon aussi spectaculaire.

Le test immunologique cGMP est rapide et très sensible en termes de détection dans la mesure où il peut mettre en évidence une adjonction de 4% de petit lait dans un volume donné de lait et, si les conditions de traite, de conservation, de transport et de transformation sont optimales ; on peut détecter de 1 à 2% de petit lait ou lactosérum.

PRINCIPES BASIQUES DU TEST:

Le cGMP éventuellement présent dans un échantillon de lait réagit avec les particules colloïdales colorées qui sont recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques au glycomacropeptide. Le complexe particules colloïdales/anticorps/GMP migre par le biais d'un processus chromatographique jusqu'à la zone de réaction. D'autres anticorps anti-GMP se trouvent dans cette zone et réagissent avec le complexe; cette réaction provoque la formation d'une ligne rouge.

CONTENU DU COFFRET:

STICK cGMP	Kit de 50 tests
Bandelettes de réaction	50
Flacon de tampon de dilution (250 ml)	1

STICK cGMP	Kit de 5 tests
Bandelettes de réaction	5
Flacon de tampon de dilution (25 ml)	1

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON INCLUS:

1. Acide Trichloroacétique (TCA) pour la précipitation de la caséine présente dans le lait
2. Petite centrifugeuse de laboratoire, filtres à 5 microns (ou 0,2 microns à défaut)

3. Tubes à essais ou flacons de type « Eppendorf » pour la dilution des surnageants (1 pour la précipitation par TCA/centrifugation et 3 pour réaliser les dilutions successives des échantillons à analyser)
4. Petits tubes à essais ou microplaques 96 puits à fond plat pour la réalisation du test (un tube ou puits pour chaque échantillon)
5. Micropipettes calibrées pour la préparation précise de la dilution : 100 μ l et 900 ou 1000 μ l
6. Pipette pour l'addition du volume approximatif d'échantillon au tube (de 250 à 500 μ l en fonction de la taille du tube) ou dans le puits de la microplaque (environ 150 μ l d'échantillon dans le puits) dans lequel la bandelette sera introduite pour réaliser le test
7. Chronomètre

PRÉCAUTIONS:

1. Utiliser les réactifs uniquement *in vitro*.
2. Ne pas échanger les réactifs de lots différents.
3. Utiliser les composants du coffret ainsi que des échantillons à température ambiante; des réactifs et/ou des échantillons trop froids peuvent réduire la fonctionnalité du test. Il est recommandé d'attendre 20 à 30 minutes pour atteindre la température ambiante.
4. Ne pas utiliser les composants du kit après la date de péremption.
5. Il est important de réaliser les dilutions adéquates de façon **très précise** car, dans le cas contraire, le facteur de dilution final serait erroné et ni la sensibilité ni la spécificité du test ne pourraient être garanties.
6. Il est important d'ajouter la quantité correcte d'échantillon. Une quantité trop faible risque d'empêcher la migration, tandis qu'une quantité trop importante risque de diluer les réactifs et de ne pas faire apparaître de ligne claire.
7. Les produits utilisés doivent être détruits conformément à la législation.
8. Ne pas utiliser le test si une ligne colorée apparaît dans la zone de résultat avant le début du test.
9. Le tube contenant les bandelettes doit être **immédiatement refermé** après prélèvement du nombre de bandelettes nécessaire à la manipulation, ceci afin de protéger les bandelettes restantes de toute humidité.
10. Ne jetez pas la boîte externe du kit jusqu'à ce que son contenu ait été totalement utilisé. La boîte externe contient des informations concernant les lots de composants.

STOCKAGE:

Les bandelettes réactives doivent être conservées à une température comprise entre 2 et 30°C. La date de péremption est inscrite sur l'emballage.

Le tampon de dilution de l'échantillon doit être retiré du kit et conservé à +4°C au réfrigérateur.

TRÈS IMPORTANT: Ne jamais laisser ouvert l'emballage qui protège les bandelettes, sous peine de détérioration – l'humidité rend les bandelettes inutilisables.

LIMITATIONS DANS L'ANALYSE DES ÉCHANTILLONS DE LAIT:

Il est recommandé de ne pas analyser d'échantillons de lait dans les cas suivants:

- lait non stocké correctement (chaîne du froid interrompue par exemple)
- lait très acide

Ces types de laits peuvent en effet induire des processus qui, même s'ils ne produisent pas directement de cGMP, peuvent rompre de manière non spécifique la caséine et donner un résultat positif pour la concentration en glycomacropeptide

COLLECTE DE L'ÉCHANTILLON :

Les échantillons de lait doivent être collectés dans des récipients propres. **Ils doivent être réfrigérés afin de limiter les actions bactériennes susceptibles d'augmenter la concentration en cGMP.** Pour des conservations longues, congeler à -18°C ou -70°C (si possible). Dans ce cas, les échantillons doivent être décongelés et atteindre la température ambiante avant de pouvoir être testés. Les échantillons ne doivent pas être congelés puis décongelés plus d'une fois.

Lait en poudre: Reconstituer le lait en poudre avec 10 g de l'échantillon dissous dans 100 ml d'eau (eau distillée). Remuer pendant 10 minutes à une température de 40 ° C pour une dissolution complète.

PROCÉDURE :

1. Procédure de traitement de l'échantillon (lait):

1. Traiter l'échantillon en vue de séparer la caséine du lait du glycomacropeptide : pour cela, **verser du TCA dans l'échantillon de lait** de manière à ce que la concentration finale en TCA du mélange précipitant soit d'environ de

8% (mélanger par exemple 6ml de lait avec 4ml de TCA commercial à 20%). Agiter manuellement pendant quelques secondes et laisser agir 10 minutes.

2. **Centrifuger** ce mélange **d'environ 100 x g pendant 20 minutes à 2000 x g pendant 10 minutes** afin de séparer le précipité (contenant la caséine non soluble au pH utilisé) du surnageant (contenant la cGMP soluble aux mêmes conditions).
3. **Filter le surnageant** à l'aide du papier filtre de 5μ à faible absorption de protéines, de manière à séparer complètement la cGMP (on peut utiliser une autre taille de pore).
4. A l'aide d'une pipette, transférer **900 μ l de diluant dans 3 tubes** conteneurs différents (tubes à essais ou de type Eppendorf).
5. Dans le premier tube, ajouter à l'aide d'une pipette calibré, 100 μ l d'échantillon filtré (obtenu au point 3) aux 900 μ l du tampon de dilution de l'échantillon. Bien mélanger en employant la même pipette (prélever/relâcher plusieurs fois le mélange). Ceci constitue la première **dilution au 1/10^{ème}**.
6. Prendre 100 μ l de ce premier tube et les ajouter au du deuxième tube également avec 900 μ l du tampon de dilution de l'échantillon. Bien mélanger en employant la même pipette (prélever/relâcher plusieurs fois le mélange). Ceci constitue la deuxième dilution au 1/10^{ème} (dilution totale à ce stade : **1/100^{ème}**).
7. Prendre 100 μ l de ce deuxième tube et les ajouter au tampon de dilution du troisième tube toujours avec 900 μ l du tampon de dilution de l'échantillon. Bien mélanger en employant la même pipette (prélever/relâcher plusieurs fois le mélange). Ceci constitue la troisième dilution au 1/10^{ème} et permet d'obtenir au final une dilution au **1/1000^{ème}** du surnageant de précipité (précipité qui contient 60% de lait dans le TCA). Ceci constitue donc la **dilution au 1/1000^{ème}**.
8. Il est **recommandé** de réaliser également au départ une **dilution au 1/4000^{ème}** (soit $\frac{1}{4}$ de la dilution 1/1000) : prélever 100 μ l du troisième tube et ajouter, dans un quatrième tube, 300 μ l de tampon de dilution. Cette dilution au 1/4000^{ème} correspond à une limite de détection de 4 % de cGMP dans le lait. Si la majorité des échantillons sont négatifs pour cette dilution au 1/4000^{ème}, utiliser une dilution au 1/2000^{ème} (qui équivaut a une limite de 2 %) ou 1/1000^{ème} (qui équivaut a une limite de 1 %). Le choix de la dilution optimale dépend principalement de la qualité microbienne de l'échantillon, elle-même directement dépendante des conditions de manipulation et de conservation du lait, conditions qui diffèrent selon les modes d'exploitation ou le pays de production.

2.-Réalisation du Test :

1. A l'aide d'une micropipette, transférer **500 μ l de surnageant de l'échantillon** à mesurer dans un tube à essai (ou 150 à 200 μ l dans un puits de microplaque à fond plat).
2. **Introduire la bandelette réactive** jusqu'au fond du tube à essai (ou dans le puits de la microplaque), dans le sens indiqué par les flèches. **IMPORTANT** : le liquide ne doit jamais dépasser les pointes des flèches. Si nécessaire, prendre un tube plus large ou réduire la quantité d'échantillon.
3. Attendre exactement **5 minutes** puis lire le résultat révéle* dans la zone centrale blanche de la bandelette.
*Autre méthode : tremper la bandelette pendant 10-20 secondes dans le tube ou le puits de la microplaque puis l'extraire pour laisser se développer la réaction sur une surface horizontale.

RÉSULTATS :

NÉGATIF : (dépend de la dilution, indiquera les laits compris entre 4 et 1% de cGMP). Seule apparaît une ligne transversale **BLEUE** dans la zone centrale du dispositif de réaction. Cette ligne doit toujours apparaître.

POSITIF : En plus de la ligne **BLEUE** apparaît une autre ligne de couleur **ROUGE** dans la zone centrale du dispositif de réaction. L'intensité de cette coloration variera selon la concentration présente dans l'échantillon.

Si aucune ligne n'apparaît dans la zone centrale, ou si la ligne bleue n'apparaît pas, le test doit être déclaré **INVALIDE** (causes possibles : manipulation incorrecte, réactifs détériorés, ou volume d'échantillon insuffisant).

Toute ligne apparaissant au-delà des 5 minutes ne constitue pas un indicateur permettant l'établissement d'un diagnostic. L'analyse finale des résultats doit prendre en compte les éventuels facteurs qui pourraient provoquer une augmentation du glycomacropeptide dans le lait sans relation directe avec une adjonction de lactosérum.

CONTRÔLE QUALITÉ :

Si aucune ligne bleue n'apparaît, le test est invalide et doit être refait. Les causes peuvent être soit une erreur de manipulation, soit des réactifs détériorés.

Répéter avec une nouvelle bandelette.

CARACTÉRISTIQUES DU TEST :

1. SENSIBILITÉ

La limite de sensibilité évaluée face à la solution de cGMP Sigma (Référence C-7278) se situe entre 15 et 30ng/ml dans l'échantillon final analysé sur bandelette. Ceci signifie que l'on peut détecter de 15 à 30 μ g/ml dans l'échantillon précipité original, ce qui équivaut à 1-2% de lactosérum dans le lait pour un facteur de dilution au 1/1000^{ème} et pour

une proportion de lait à 60% dans le mélange précipité avec le TCA. Le mode de préparation du mélange TCA + lait peut également produire des variations.

Ce seuil a été déterminé à l'aide d'analyses effectuées à partir d'une solution mère de cGMP de 1 µg/ml (1000ng/ml) qui a été ajoutée à différentes solutions de tampon de dilution. Les résultats ont été obtenus de deux manières : détermination du résultat de forme visuelle (qualitative) et utilisation d'un lecteur de bandelettes immuno-chromatographiques (quantitative).

2. SPÉCIFICITÉ

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans la fabrication des bandelettes cGMP garantit de façon significative la détection de cGMP ou de κ-caséine et non d'autres substances ; la κ-caséine étant détectée de manière identique à la cGMP, il est donc toujours nécessaire de procéder à la séparation de la κ-caséine par précipitation au TCA.

Composé	Concentration de départ (avant dilution)	Résultat
κ-caséine	3 grammes/litre	+
Caséine totale	3 grammes/litre	+

3. ÉTUDE COMPARATIVE

L'étude a été menée sur 60 échantillons au Brésil pour détecter la présence du « petit lait » dans le lait. Les résultats obtenus avec le test ont été comparés avec ceux obtenus par la méthode de référence, la HPLC et la méthode colorimétrique, l'acide sialique.

HPLC		Stick cGMP		Méthode de l'acide sialique	
Pourcentage cGMP	Qté. d'échantillons				
<2%	6	Tous négatifs		2 légèrement plus grandes que les blancs	4 analogues au blanc
2 – 4%	18	8 négatifs (Valeurs entre 2 et 2.5%)	10 positifs	3 analogues au blanc 5 inférieurs au standard 2%	10 analogues au standard 2%
>4%	36	Tous positifs		2 inférieurs au standard 2% 11 analogues au standard 2% 10 entre les standards 2 – 5 %	8 analogues au standard 5% 5 supérieurs au standard 5%

La bandelette a toujours affiché des résultats positifs pour les échantillons dont le pourcentage de sérum ajouté a été supérieur à 4% selon HPLC. La seule différence est survenue dans les échantillons avec une concentration déterminée par HPLC de 2 à 4% (dans la limite de détection de l'essai). Dans ces cas, la quantité de sérum ajoutée était très faible et peu susceptible d'avoir un impact technologique. La méthode de l'acide sialique a montré que le lactosérum n'est pas toujours détecté correctement. Les deux échantillons détectés comme négatifs (dans le cas > 4%) avaient effectivement des concentrations supérieures à 10%.

4. SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Les substances décrites dans le tableau ont été évaluées avec les concentrations citées (supérieures à celles présentes dans le lait). Ces substances n'interfèrent pas dans le résultat du test.

Composé	Concentration de départ (avant dilution)	Résultat
BSA	10%	-
Anticorps Bovins	1%	-
Lactose	10%	-
Lactalbumine (α et β)	4 grammes/litre	non présent

5. PRÉCISION INTRA-ESSAI - RÉPÉTABILITÉ

3 concentrations (contrôle négatif, contrôle positif bas et contrôle positif) connues de la courbe de sensibilité ont été analysées 10 fois et les résultats obtenus ont été identiques.

6. PRÉCISION INTRA-ESSAI - REPRODUCTIBILITÉ

PRÉCISION INTER-JOURS

Avec 1 lot de Stick cGMP on a réalisé dix répliques de la courbe de sensibilité pendant 10 jours consécutifs et les résultats obtenus ont été identiques.

PRÉCISION INTER-LABORATOIRES

Trois laboratoires différents ont étudié les mêmes échantillons, montrant une grande précision et cohérence. On a trouvé une seule différence, d'une dilution 1/2, gérable et supportable pour cette méthode. .

PRÉCISION INTER-LOTS

On a étudié la courbe de sensibilité de tous les lots du produit, en se basant sur leurs données historiques respectives. Une seule différence, d'une dilution $\frac{1}{2}$, a été trouvée, gérable et supportable pour cette méthode.

7. EFFET CROCHET

Pour déterminer si de fortes concentrations de cGMP peuvent affecter l'efficacité de l'essai (prozone), on a examiné un large éventail de concentrations de 1.106 à 1 μg / ml. Environ 4 ordres peuvent être détectés visuellement avec le stick cGMP et les plus grandes concentrations de cGMP détectables (supérieures à 50 μg / ml) sont beaucoup plus élevés que celles du lactosérum pur après une dilution au 1/1000^{ème}.

LIMITES DU PROCÉDÉ :

Quelle dilution dois-je faire subir à mes échantillons de lait ?

Il a été indiqué précédemment que le cGMP peut provenir de deux origines :

1. Une origine frauduleuse par adjonction de petit lait (lactosérum) dans le lait
2. Mais aussi une possible origine microbienne (avec une concentration en cGMP moins significative que dans le cas d'une fraude) que l'on constate surtout sur des laits n'ayant pas été conservés au frais de façon continue (rupture de la chaîne du froid) ou sur de laits trop vieux, et dans lesquels une augmentation de la flore lactique aboutit à des processus de protéolyse (et par conséquent à la formation de cGMP).

Il est important de noter que les niveaux normaux de cGMP dans le lait non altéré et conservé dans de bonnes conditions ne sont pas nuls ; la concentration peut même être assez élevée dans certains cas précis, ce qui peut induire des résultats faussement positifs sur des échantillons dilués au 1/1000^{ème} ou au 1/2000^{ème} (notamment si la charge bactérienne est élevée). Si de tels cas se présentent, le taux de dilution devra être augmenté pour réduire la capacité de détection du test, afin que les faux positifs disparaissent tout en réduisant la sensibilité ou la limite inférieure détectable.

C'est pour cela qu'il est recommandé de commencer les analyses par une dilution au 1/4000^{ème} (limite 4%) et, en fonction des résultats (si la majorité des tests sont négatifs ou si le lait est de bonne qualité), procéder par étapes jusqu'à une dilution au 1/2000^{ème} ou même 1/1000^{ème} jusqu'à détermination de la limite optimale.

En résumé:

Dans des conditions microbiennes optimales (lait conservé au froid depuis la traite, transporté au froid et testé dans les 24 heures), la quantité de bactéries lactiques reste faible et les processus de protéolyse quasi absents. Dans ces conditions, on pourra utiliser un seuil de détection à 1%, c'est-à-dire travailler sur une solution diluée au 1/1000^{ème}. Si le test est positif (lignes bleue et rouge), cela veut dire que l'échantillon contient plus de 1% de cGMP.

Dans des conditions microbiennes dégradées, la quantité de bactéries lactiques ou générales peut être plus élevée et les processus de protéolyse plus actifs. Il est alors recommandé d'utiliser un seuil de détection à 2%, c'est-à-dire travailler sur une dilution au 1/2000^{ème} afin d'identifier des taux de cGMP supérieurs à 2% pour tout résultat positif du test. En effet, si la dilution est réalisée au 1/1000^{ème} au lieu de 2/1000^{ème}, quelques échantillons avec une charge microbienne légèrement élevée donneront des résultats positifs sans qu'il soit pour autant question d'adjonction de lactosérum.

Dans des conditions de rupture de la chaîne du froid, ou dans les cas où la conservation du lait excède 36 à 48 heures, la quantité de bactéries lactiques peut être encore plus élevée et les processus de protéolyse encore plus significatifs que dans le cas précédent. Il est recommandé dans ce cas d'utiliser un seuil de détection à 4%, c'est-à-dire réaliser une dilution au 1/4000^{ème} afin d'identifier des taux de cGMP supérieurs à 4% pour tout résultat positif du test. Dans ce cas avec une dilution au 1/2000^{ème} au lieu du 1/4000^{ème}, quelques échantillons avec une charge microbienne légèrement élevée donneront des résultats positifs sans qu'il soit pour autant question d'adjonction de lactosérum.

Existe-t-il un standard ou contrôle de référence?

Afin de disposer d'un contrôle externe, OPERON suggère la possibilité de préparer un contrôle positif à 4% à partir de cGMP de la société Sigma (référence : C-7278). Cette solution doit être diluée avec la solution de tampon de dilution (Tris/HCL : 0,25M, pH : 7,2, 1M NaCl, BSA 1%, Sodium Na : 0,1%). Ce contrôle doit être utilisé dans les 24 heures suivant sa préparation et maintenu à 4°C pendant le temps d'attente de l'analyse. Il doit ensuite être détruit selon le processus adéquat.

Il convient de diluer ce contrôle en différentes proportions selon le seuil de détection que l'on souhaite obtenir (qui, comme nous l'avons indiqué antérieurement, dépend de la qualité microbienne du lait à analyser). Pour un seuil positif au-dessus de 4% de cGMP, la solution de contrôle doit être diluée au 1/4000^{ème} ; pour un seuil à 2%, la dilution doit être effectuée au 1/2000^{ème}, et au 1/1000^{ème} pour un seuil à 1%.

Avec ce contrôle, l'intensité de la bande qui correspond à la limite choisie peut être observée et comparée avec les échantillons réels (préparés avec la dilution précise correspondant à ce seuil). Voir point 8 «Procédure de traitement des échantillons»)

Utilisation du contrôle de référence pour un seuil de 4% de petit lait.

1. A l'aide d'une pipette, transférer 500µl de la solution de contrôle dans un tube à essai (ou 150 à 250µl dans un puits de microplaque à fonds plat).
2. Introduire la bandelette témoin dans le sens des flèches jusqu'au fond du tube ou du puits. **IMPORTANT** : le liquide ne doit jamais dépasser la pointe des flèches. Si nécessaire, utiliser un tube plus large ou réduire la quantité de solution de contrôle.
3. Après exactement 5 minutes, comparer la bandelette témoin avec la bandelette de lait à évaluer en lisant le résultat révélé dans la zone centrale blanche de la bandelette.

BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE

- 1.- Isolation of Monoclonal Antibodies Monoespecific for Bovine k-Casein. Konrad M. Kuzmanoff, John W. Andresen, and Craig W. Beattie. 1990 J.Dairy Sci 73:2741-2748
- 2.-Determination of caseinmacropeptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. J.van Riel and C. Olieman. Electrophoresis 1995, 529-533.
- 3.- Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. Isidra Recio, Mónica R.García-Risco, Rosina López-Fandiño, Agustín Olano, Mercedes Ramos. International Dairy Journal 10 (2000) 333-338.
- 4.- Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. C. Olieman and J.A.: van Riel. Neth.Milk Dairy J. (1989) 171-184
- 5.- Isolation and Analysis of k-Casein Glycomacropeptide from Goat Sweet whey. Eryck R. Silva-Hernandez, Takuo Nakano, and Lech Ozimek. J.Agric.Food Chem. 2002, 50, 2034-2038.
- 6.- Purification of k-casein glycomacropeptide from Sweet Whey with Undetectable Level of Phenylalanine. Takuo Nakano, Eryck R. Silva-Hernandez, Noriaki Ikawa, and Lech Ozimek Biotechnol. Prog. 2002, 18, 409-412.
- 7.- Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Capítulo 5. Editorial Reverté, S.A.



Fecha de caducidad / Expiry date / Date de péremption



Número de lote / Lot number / Numéro de lot



Uso diagnóstico in vitro /For in vitro diagnostic use / Usage *in vitro*



Sólo para evaluación del funcionamiento / For IVD Performance evaluation only / Réservés à l'évaluation des performances



Número de catálogo / Catalogue number / Référence article



Leer instrucciones de uso / Please read pack insert / Lire attentivement le mode d'emploi



Fabricado por / Manufactured by / Fabriqué par



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests



Conservar a / Store at / Conserver entre



Precaución / Caution / Prudence

DO-090582 Rev. 8 – 16.06.2017



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN
+34 976 503597