

*Read instructions carefully before starting test*

# Veratox<sup>®</sup> **for Almond Allergen**

## **Quantitative Test**

*REFRIGERATE AT 2–8°C (35–46°F) • DO NOT FREEZE*

### **ALMOND ALLERGEN**

Food allergens are proteins in food that can create an immune response in sensitive individuals. Once ingested, food allergens can cause a number of reactions, ranging in severity from hives and itching to anaphylaxis. Anaphylaxis is a severe allergic reaction, involving vomiting, diarrhea, difficulty breathing, swelling of the mouth and tongue, and a rapid drop in blood pressure.

An estimated 3.5 to 4 percent of adults, and 6 to 8 percent of children, are sensitive in some degree to food allergens. More than 12 million people in the United States alone are known to have a food allergy.

Food manufacturers protect those with food allergies by clearly labeling their products with a list of ingredients. Testing for the presence of almond components ensures food manufacturers that an unlabeled—and potentially dangerous—ingredient did not make its way into a food product.

### **INTENDED USE**

Veratox for Almond Allergen is intended for the quantitative analysis of almond protein residue in food products such as cookies, chocolate bars, ice cream, beverages and clean-in-place rinses.

### **INTENDED USER**

This test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with foods possibly contaminated by almonds or almond products. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has completed the Neogen training.

## **ASSAY PRINCIPLES**

Veratox for Almond Allergen is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Almond residues are extracted from samples with a buffered salt solution (PBS) by shaking in a heated water bath, followed by centrifugation or filtration. Extracted almond residue is sampled and added to antibody-coated wells (capture antibody) where it binds to the antibody during an incubation. Any unbound almond residue is washed away and a second antibody (detector antibody), which is enzyme labeled, is added. The detector antibody binds to the already bound almond residue. After a second wash, the substrate is added. Color develops as a result of the presence of bound detector antibody. Red Stop reagent is added and the color of the resulting solution is observed. The test is read in a microwell reader to yield optical densities. The optical densities of the controls form a standard curve, and the sample optical densities are plotted against the curve to calculate the exact concentration of almond residue.

## **STORAGE REQUIREMENTS**

The kit can be used until the expiration date on the label when stored refrigerated at 2–8°C (35–46°F). Do not freeze.

## **MATERIALS PROVIDED**

1. 48 antibody-coated microwells
2. 48 red-marked transfer wells
3. 5 yellow-labeled bottles of 0, 2.5, 5, 10, 25 ppm almond controls
4. 2 blue-labeled bottles of enzyme-labeled antibody conjugate
5. 1 green-labeled bottle of K-Blue® Substrate
6. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution
7. Foil pouch of 10 mM PBS dry powder extraction solvent. Each pouch is enough to prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
8. 40 mL of 10 mM PBS-Tween washing reagent in a wide mouth bottle. Each bottle is enough to prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
9. 50 g of extraction additive in a specimen cup
10. Plastic scoop to measure extraction additive

## MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Allergen Extraction Kit (Neogen item 8429)
  - a. 20 disposable plastic extraction bottles
  - b. 20 sample collection tubes (12 x 75 mm) with caps
2. Allergen Environmental Swabbing Kit (Neogen item 8432S)
  - a. 100 sterile swabs
  - b. 100 dropper tips
3. Shaker water bath capable of maintaining  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  with clamps to hold 250 mL disposable plastic bottles
4. Whatman #4 filters or equivalent (Neogen item 9429)
5. Centrifuge (optional)
6. Pipettor, adjustable 50–200  $\mu\text{L}$  (Neogen item 9276)
7. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
8. Pipette tips (Neogen item 9410, 9407, 9417)
9. Timer (Neogen item 9426)
10. Microwell reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
11. 1 L bottle to prepare washing solution (Neogen item 9472)
12. 1 L heat safe bottle to prepare extract solution (Neogen item 9472)
13. Paper towels or equivalent absorbent material
14. Microwell holder (Neogen item 9402)
15. Waterproof marker
16. Wash bottle (Neogen item 9400)
17. Distilled or deionized water
18. 3 reagent boats for 12-channel pipettor (Neogen item 9435)
19. Graduated cylinder capable of measuring 125 mL (Neogen item 9368)
20. Scale capable of weighing  $5 \pm 0.1$  g (Neogen item 9427)

## PRECAUTIONS

1. Components of Veratox for Almond Allergen, such as controls and extraction reagents, may contain one or more of the following potentially allergic materials: casein, almond protein and soy protein. If allergic to any of these compounds, please use caution when using this product.
2. Concentrated food additives, colors and flavors may cause interferences on ELISA test methods. Contact Neogen's technical services for validation information.
3. Hydrolyzed and fermented proteins may not be detected using ELISA methods for allergen testing. Due to the breakdown of the proteins to small peptides or amino acids, they may become undetectable by this assay, but still could be allergenic and cause an allergic reaction.
4. Almonds are from the genus *Prunus* and seeds or pits from similar genus, *Prunus* foods, (ie. plums, cherries, peaches, nectarines and apricots) may cross react with this kit.
5. Sponges should not be used for sample collection and allergen testing. Sample collection swabs other than Neogen swabs should be validated prior to use. General sponges and swabs may contain solutions or materials that may interfere with the test kit.
6. Store test kit between  $2\text{--}8^\circ\text{C}$  ( $35\text{--}46^\circ\text{F}$ ) when not in use. Do not freeze test kits, and avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
7. Bring kits to room temperature  $18\text{--}30^\circ\text{C}$  ( $64\text{--}86^\circ\text{F}$ ) prior to use.
8. Cool sample extracts to room temperature prior to testing.
9. Do not use kit components beyond expiration date.
10. Do not mix reagents from one kit serial with reagents from a different kit serial.
11. Do not run more than 24 wells per test when running the quantitative method.
12. When running the screening procedure, do not run more than 6 wells unless using a multichannel pipettor.

13. Follow proper pipetting techniques (e.g., prime tips and use clean tips).
14. Use only incubation times specified. Others may give inaccurate results.
15. Use clean pipette tips and glassware for each sample to avoid cross-contamination. Thoroughly wash all glassware between samples.

## PROCEDURAL NOTES

1. **Substrate:** K-Blue Substrate is ready for use. The substrate should be clear to light blue—discard if it has turned dark blue. Only pour the needed volume of substrate into a reagent boat. **Do not return unused substrate to the bottle.** Cover the reagent boat to keep the substrate protected from light until needed.
2. **Conjugate.** The conjugate supplied with this kit is ready to use. One bottle is enough for 24 wells. Cover the reagent boat to keep the conjugate protected from direct light and contaminants.
3. **Antibody wells.** Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after samples are extracted, and the test procedure is set to begin.
4. **Extraction solution.** Prepare extraction solution by adding a foil pouch of extraction solvent, 10 mM PBS, to 1 L distilled or deionized water. Swirl to mix thoroughly. Cover and store any unused portions refrigerated at 2–8°C (35–46°F).
5. **Wash buffer.** Prepare the wash buffer solution by pouring all the wash buffer concentrate into an empty 1 L container. Rinse the wash buffer concentrate bottle with distilled or deionized water and pour into the 1 L container to ensure all the concentrate is used. Fill the 1 L container with additional distilled or deionized water, and swirl to assure thorough mixing. Cover and store any unused portions refrigerated at 2–8°C (35–46°F).

**NOTE:** Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when the test kit has been used completely.

## SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques (see Neogen's Food Allergen Handbook). The sample should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure. For collecting and extracting environmental swabs, reference the Allergen Environmental Swabbing Kit (Neogen item 8432S) instructions.

1. Prepare the extraction solution as described in the procedural notes.
2. Preheat extraction solution to 60°C (140°F) by immersing the bottle containing the solution into the water bath and allowing it to reach 60°C.
3. Using your sampling and collection procedure, obtain a representative sample and grind it to a very fine particle size.
4. Transfer 5 g of sample or 5 mL of liquid sample into a disposable extraction bottle.
5. Add one level scoop of the extraction additive to the sample bottle. Do not use the extraction additive from another allergen test kit.
6. Pour 125 mL of the 60°C (140°F) extraction solution to the sample bottle.
7. Cap the sample bottle to prevent contents from splashing during the extraction.
8. Extract by shaking (150 rpm) in a water bath at 60°C (140°F) for 15 minutes. Remove the bottle from the bath.
9. Let material settle for 5 minutes to enable some of the sample to settle before proceeding to the next step.
10. Filter the extract by pouring at least 5 mL through a Whatman #4 filter and collecting the filtrate as a sample.

**ALTERNATIVE:** Centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes (20 minutes for lower speeds). Use the clear supernatant as a sample.

11. Allow extracts to cool to room temperature before beginning analysis.
12. Discard extracts after completion of analysis.

## TEST PROCEDURE FOR QUANTITATION

Allow the test kit and all reagents to warm to room temperature 18–30°C (64–86°F) before using.

1. Remove 1 red-marked mixing well for each sample to be tested plus 5 red-marked wells for controls, and place in the well holder.
2. Remove an equal number of antibody-coated wells. Return antibody wells which will not be used immediately to the foil pack with desiccant. Reseal the foil pack to protect the antibody. Mark one end of the strip with a "1", and place strip in the well holder with the marked end on the left.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Using a new pipette tip for each, transfer 150 µL of controls and sample extracts to the red-marked transfer wells as shown in the template below. Only run up to two 12-well strips at a time.

0	2.5	5	10	25	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Strip 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Strip 2

5. Place tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of the controls and sample extracts to the antibody-coated wells. Mix for 20 seconds by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
6. Incubate microwells **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F). Discard the red-marked transfer wells.
7. Empty the contents of the wells into a sink. With a wash bottle fill each antibody well with the wash buffer solution and dump out. Repeat the washing 5 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until all washing solution is removed.
8. Pour the needed volume of conjugate from the blue-labeled bottle into a clean reagent boat.
9. Using the 12-channel pipettor and new tips, transfer 100 µL of the conjugate into all the wells and mix for 20 seconds by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
10. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
11. Wash all wells with the wash buffer solution as described in step 7.
12. Pour the needed volume of substrate solution from the green-labeled bottle into a clean reagent boat.
13. Place new tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of substrate into each well and mix for 20 seconds. Do not eject tips.
14. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
15. Pour the needed volume of Red Stop solution from the red-labeled bottle into a clean reagent boat.
16. With the same tips used to dispense the substrate, transfer 100 µL of Red Stop into each well and mix for 20 seconds.
17. Wipe the bottom of the microwells and read in a microwell reader with a 650 nm filter. Air bubbles should be eliminated, as they could affect analytical results. Results should be read within **20 minutes** after the addition of Red Stop solution.
18. Interpret the test's results using Neogen's microwell reader, or an equivalent strip reader. If using a strip reader, calculate the results using Neogen's Veratox for Windows® software.

## TEST PROCEDURE FOR SCREENING

Allow the test kit and all reagents to warm to room temperature 18–30°C (64–86°F) before using.

1. Remove 1 well for each sample to be tested plus 1 well for the control, and place into the well holder.
2. Choose the 5 ppm yellow-labeled control bottle to serve as the screening level for the test.
3. Mix each reagent by swirling its bottle prior to use.
4. Add 100 µL from the yellow-labeled control bottle to the first well. Add 100 µL from each sample extract to a respective well as indicated in the template below. For environmental swabs, add 3 drops from swab tube with dropper tip. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.

Control	S1	S2	S3	S4	S5
---------	----	----	----	----	----

5. Incubate microwells **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
6. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer solution, fill each well and shake out. Repeat 5 times. Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
7. Add 100 µL from the blue-labeled conjugate bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
8. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
9. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer solution, fill each well and shake out. Repeat 10 times. Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
10. Add 100 µL from the green-labeled substrate bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
11. Incubate for 10 minutes at room temperature 18–30°C (64–86°F).
12. Add 100 µL from the red-labeled Red Stop bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface. The results are now ready to be interpreted.
13. Visually compare the color of a sample well to the color of the control well. If the sample well has more blue color than the control well, the sample tests positive for almond contamination of more than the control used. If the sample well has less blue color, or more red color, than the control well, the sample contains less than the control used of almond contamination.  
**Alternative:** Read wells (wipe the bottom of wells with a dry cloth or towel first) in a microwell reader with a 650 nm filter. If the sample well has an optical density (OD) higher than the control well, the sample is positive for almond contamination of more than the control used. If the sample well has an OD lower than the control well, the sample contains less than the control used of almond contamination.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of quantitation: 2.5 ppm (Described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect almond.)

Range of quantitation: 2.5–25 ppm (For quantitating samples above 25 ppm, contact a Neogen representative for dilution instructions.)

Allergen detection: This test detects almond protein, and the results are expressed as ppm of total almond.

Cross-reactivity: Cross reacts with apple seed and common *Prunus* genus foods (ie. apricots, cherries, nectarines, peaches and plums). Cross reactivity has been identified with the seed (stone); however the flesh (seedless fruit) does not cross react.

**CUSTOMER SERVICE**

Neogen Customer Assistance and Technical Service can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

**SDS INFORMATION AVAILABLE**

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's Food Safety test kits, at [www.neogen.com](http://www.neogen.com), or by calling Neogen at 800/234-5333 or 517/372-9200.

**TERMS AND CONDITIONS**

For Neogen's full terms and conditions, please visit [www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html](http://www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html).

**WARRANTY**

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen will provide a replacement product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

## TESTING KITS AVAILABLE FROM NEOGEN

### Natural toxins

- Aflatoxin, DON, ochratoxin, zearalenone, T-2/HT-2 toxins, fumonisin, histamine

### Foodborne bacteria

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

### Sanitation

- ATP, yeast and mold, total plate count, generic *E. coli* and total coliforms, protein residues

### Food allergens

- Almonds, crustaceans, eggs, gliadin, hazelnut, lupine, milk, mustard, peanuts, sesame, soy, walnuts, multi-treenut

### Genetic modification

- CP4 (Roundup Ready®)

### Ruminant by-products

- Meat and bone meal, feed

### Species Identification

- Raw and cooked meat samples



### North America

#### Neogen Headquarters

620 Leshar Place, Lansing, MI 48912 USA  
800/234-5333 (USA/Canada) or  
517/372-9200  
Fax: 517/372-2006  
foodsafety@neogen.com  
www.neogen.com

### Europe, Middle East and Africa

#### Neogen Europe

The Dairy School, Auchincruive, Ayr  
KA6 5HU Scotland, UK  
+ 44 (0) 1292 525 600  
Fax: + 44 (0) 1292 525 601  
info\_uk@neogeneurope.com  
www.neogen.com

### Mexico

#### Neogen Latinoamérica

Prolongación 5 de Mayo #27  
Col. Parque Industrial Naucalpan  
Naucalpan, Estado de Mexico C.P. 53489  
+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-0111,  
+52 (55) 5531-2837  
Fax: +52 (55) 5531-1647  
informacion@neogenlac.com  
www.neogen.com

### Brazil

#### Neogen do Brasil

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João  
Narezzi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402  
Tel: +55 19 3935.3727  
info@neogendobrasil.com.br  
www.neogen.com



*Lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba*

# Veratox<sup>®</sup> **para Alérgenos de Almendras**

## **Prueba Cuantitativa**

*REFRIGÉRESE A 2–8°C (35–46°F) • NO CONGELAR*

### **ALÉRGENOS DE ALMENDRAS**

Los alérgenos alimentarios son proteínas contenidas en los alimentos que pueden crear una respuesta inmune en individuos sensibles. Una vez ingeridos, los alérgenos presentes en los alimentos pueden provocar muchas reacciones, cuya gravedad va desde urticaria y comezón hasta anafilaxia. La anafilaxia es una reacción alérgica grave, que incluye vómito, diarrea, dificultad para respirar, hinchazón de la boca y la lengua y un rápido descenso de la presión arterial.

Se estima que del 3,5 al 4 por ciento de los adultos y del 6 al 8 por ciento de los niños son sensibles en cierta medida a los alérgenos presentes en los alimentos. Tan solo en los Estados Unidos se conoce que existen 12 millones de personas que padecen alergias alimentarias.

Los fabricantes de alimentos protegen a las personas con alergias por alimentos al etiquetar sus productos con una lista de ingredientes. El realizar pruebas para detectar la presencia de las proteínas de la almendra asegura a los fabricantes de alimentos que un ingrediente no indicado (y potencialmente peligroso) no penetró en un producto alimenticio.

### **PROPÓSITO DE USO**

La prueba de Veratox para Alérgenos de Almendras está destinada para el análisis cuantitativo de residuos de proteína de almendra en productos alimenticios tales como galletas, barras de chocolate, helados, bebidas y aguas residuales de enjuague.

### **USUARIO PREVISTO**

Este kit de prueba está diseñado para ser usado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con los alimentos posiblemente contaminados por almendras o productos de almendra. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben ser capacitados por un representante de Neogen o alguna persona que haya terminado con éxito dicha capacitación.

## FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

La prueba de Veratox para Alérgenos de Almendras es un ensayo inmunoenzimático (S-ELISA) de captura. Los residuos de almendra se extraen de las muestras con una solución salina neutralizada (PBS, Phosphate Buffered Saline) agitándolos en un baño de agua caliente, seguido por centrifugación o filtración. El residuo de almendra es extraído de la muestra y se agrega a los micropocillos recubiertos con anticuerpo (anticuerpo de captura) en donde se adhiere al anticuerpo durante una incubación. Cualquier residuo de almendra que no se haya adherido o unido se retira por medio de lavado y se agrega un segundo anticuerpo (anticuerpo detector), el cual es la enzima etiquetada. El anticuerpo detector se adhiere al residuo de almendra ya unida. Después de un segundo lavado, se agrega el sustrato. Como resultado de la presencia del anticuerpo detector adherido se produce color. Se agrega la solución detenedora Red Stop y se observa el color de la solución resultante. La prueba se lee en un lector de micropocillos para producir densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles forman una curva estándar y las densidades ópticas de la muestra se grafican comparándolas con la curva para calcular la concentración exacta del residuo de almendra.

## REQUERIMIENTOS DE ALMACENAMIENTO

El kit de prueba puede utilizarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta si se almacena refrigerado a 2–8°C (35–46°F). No congelar.

## MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 micropocillos recubiertos con anticuerpo
2. 48 micropocillos para transferencia marcados con rojo
3. 5 frascos de controles de almendra de 0, 2.5, 5, 10, 25 ppm con etiqueta amarilla
4. 2 frascos con etiqueta azul de conjugado de anticuerpos con etiqueta de enzima
5. 1 frasco con etiqueta verde de solución de Sustrato K-Blue®
6. 1 frasco gotero con etiqueta roja de solución detenedora Red Stop
7. Bolsa de aluminio con disolvente de extracción de polvo seco PBS de 10 mM. Cada bolsa es suficiente para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7,4)
8. 40 mL de 10 mM de reactivo de lavado PBS-Tween en un frasco de boca ancha. Cada frasco es suficiente para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7,4)
9. 50 g de aditivo de extracción en un recipiente de muestras
10. Cuchara plástica para medir el aditivo de extracción

## MATERIALES RECOMENDADOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Kit para Extracción de Alérgenos (Producto Neogen 8429)
  - a. 20 frascos de plástico desechables para extracción
  - b. 20 tubos para recolección de muestras (12 x 75 mm) con tapas
2. Kit con Hisopos para Alérgenos Ambientales (Producto Neogen 8432S)
  - a. 100 hisopos estériles
  - b. 100 puntas para gotero
3. Baño agitado de agua capaz de conservar  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  con mordazas para sostener frascos de plástico desechables de 250 mL
4. Filtro Whatman No. 4 o equivalente (Producto Neogen 9429)
5. Centrífuga (opcional)
6. Pipeta ajustable de 50–200  $\mu\text{L}$  (Producto Neogen 9276)
7. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
8. Puntas de pipeta (Producto Neogen 9410, 9407, 9417)
9. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
10. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
11. Frasco de 1 L para preparar solución de lavado (Producto Neogen 9472)
12. Frasco de 1 L para preparar solución de extracción (Producto Neogen 9472)
13. Toallas de papel o material absorbente equivalente

14. Estante para micropocillos (Producto Neogen 9402)
15. Marcador a prueba de agua
16. Pisseta de lavado (Producto Neogen 9400)
17. Agua destilada o desionizada
18. Botes de reactivo para pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9435)
19. Probeta graduada con capacidad de 125 mL (Producto Neogen 9368)
20. Balanza con capacidad de  $5 \pm 0,1$  g (Producto Neogen 9427)

## PRECAUCIONES

1. Los componentes de Veratox para Alérgenos de Almendras, como son controles y reactivos de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alérgicos: caseína, proteína de almendra y proteína de soja. Si usted es alérgico a cualquiera de estos compuestos, tenga precaución al manejar o manipular este producto.
2. Los aditivos, colores y sabores de alimentos concentrados pueden provocar interferencia con los métodos de pruebas ELISA. Comuníquese con el Departamento de Servicios Técnicos de Neogen para obtener información actualizada de validación.
3. Es posible que no se detecten las proteínas hidrolizadas y fermentadas utilizando los métodos ELISA para pruebas de alérgenos. Debido a la separación de las proteínas en péptidos o aminoácidos pequeños, éstas pueden que no sean detectadas por esta prueba pero seguir siendo alérgenos y provocar una reacción alérgica.
4. Las almendras pertenecen al género *Prunus*, las semillas de géneros similares y alimentos clasificados en la familia *Prunus*, (ie. ciruelas, cerezas, melocotones o duraznos, nectarinas y albaricoques) pueden reaccionar cruzadamente con este kit de prueba.
5. Las esponjas no deben ser utilizadas para la recolección de muestras en pruebas para detectar alérgenos. En el caso que usted utilice hisopos para la recolección de muestras que NO sean de Neogen, éstos deben ser validados antes de su uso. Las esponjas en general y los hisopos pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con el kit de prueba.
6. Almacene el kit de prueba entre  $2-8^{\circ}\text{C}$  ( $35-46^{\circ}\text{F}$ ) cuando no lo utilice. No congele los kits de pruebas y evite el almacenamiento prolongado de los kits de pruebas y reactivos a temperatura ambiente.
7. Permita que los kits de prueba y los reactivos alcancen una temperatura ambiente entre  $18-30^{\circ}\text{C}$  ( $64-86^{\circ}\text{F}$ ), antes de utilizarlos.
8. Antes de efectuar la prueba, enfríe los extractos de muestra a temperatura ambiente.
9. No utilice los componentes del kit de prueba después de la fecha de vencimiento.
10. No mezcle los reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
11. No utilice más de 24 micropocillos por cada prueba si está siguiendo el método cuantitativo.
12. Si está siguiendo el procedimiento para evaluación, no utilice más de 6 micropocillos por cada prueba a menos que esté usando una pipeta multicanal.
13. Observe las técnicas adecuadas para pipeteado (por ejemplo, el cebado de las puntas y el uso de puntas limpias).
14. Utilice los tiempos de incubación especificados. El uso de otros tiempos pueden generar resultados inexactos.
15. Utilice puntas de pipeta y material de vidrio limpios para cada muestra a fin de evitar la contaminación cruzada. Lave cuidadosamente todo el material de vidrio antes de extraer las muestras.

## NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato.** El Sustrato K-Blue está listo para su uso. El sustrato debe presentar un color entre transparente y azul claro—deséchelo si se ha tornado azul oscuro. Solamente vierta el volumen de sustrato necesario dentro del bote de reactivo. **No regrese al frasco el sustrato no utilizado.** Cubra el bote de reactivo para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
2. **Conjugado.** El conjugado que se proporciona con este kit de prueba está listo para su uso. Un frasco es suficiente para 24 micropocillos. Cubra el bote de reactivo para mantener el conjugado protegido de la luz directa y de los contaminantes.
3. **Micropocillos recubiertos con anticuerpo.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio sólo después de obtener los extractos de las muestras y cuando esté listo para empezar el procedimiento de la prueba.
4. **Solución de extracción.** Prepare la solución de extracción agregando una bolsa de disolvente de extracción, 10 mM PBS, a 1 L de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar completamente. Cubra y refrigere las porciones no utilizadas a 2–8°C (35–46°F).
5. **Solución buffer de lavado.** Prepare la solución buffer de lavado vertiendo todo el concentrado de tamponado de lavado en un recipiente vacío de 1 L. Enjuague el frasco del concentrado de tamponado de lavado con agua destilada o desionizada y vierta en el recipiente de 1 L para asegurar que se utilice todo el concentrado. Llene el recipiente de 1 L con agua destilada o desionizada adicional y revuelva para asegurar un buen mezclado. Cubra y refrigere las porciones no utilizadas a 2–8°C (35–46°F).  
**NOTA:** Deseche las porciones no utilizadas de la solución de extracción y de tampón de lavado cuando el kit de prueba ha sido usado completamente.

## PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

La recolección de la muestra a analizar deberá efectuarse según las técnicas de muestreo aceptadas (por favor consulte el Manual de Alérgenos Alimentarios de Neogen). Se deberá triturar la muestra y mezclar completamente antes de proceder con el procedimiento de extracción. Para información relacionada con la recolección y extracción de muestras ambientales con hisopos, refiérase a las instrucciones que aparecen en el kit con Hisopos para Alérgenos Ambientales (Producto Neogen 8432S).

1. Prepare la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Caliente la solución de extracción a 60°C (140°F) sumergiendo el frasco con la solución dentro del baño de agua permitiendo que alcance una temperatura de 60°C (140°F).
3. Utilice su procedimiento de muestreo y recopilación para obtener una muestra representativa y trítúrela a un tamaño de partícula muy fina.
4. Transfiera 5 g de muestra o 5 mL de muestra líquida, a un frasco de extracción desechable de 250 mL.
5. Agregue una cucharada rasa de aditivo de extracción al frasco de la muestra. No utilice el aditivo de extracción de otro juego de muestras de alérgenos.
6. Vierta 125 mL de la solución de extracción a 60°C (140°F) dentro del frasco de muestra.
7. Tape el frasco de muestra para evitar que el contenido salpique o se derrame durante la extracción.
8. Extraiga agitando (150 rpm) en un baño de agua a 60°C (140°F) durante 15 minutos. Retire el frasco del baño de agua.
9. Permita que el material repose por 5 minutos para que parte de la muestra se asiente antes de proceder con el paso siguiente.
10. Filtre el extracto vertiendo cuando menos 5 mL a través de un filtro Whatman No. 4 y recolecte el material filtrado como una muestra.

**Alternativa:** Centrifugue a 14,000 rpm durante 5 minutos (20 minutos para velocidades más bajas). Utilice el sobrenadante transparente como una muestra.

11. Antes de empezar el análisis, deje que se enfríen los extractos a temperatura ambiente.
12. Deseche los extractos después de terminar el análisis.

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA PARA CUANTIFICACIÓN

Permita que el kit de prueba y todos los reactivos alcancen una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).

1. Retire 1 micropocillo de mezclado marcado con rojo para cada muestra que se va a probar más 5 micropocillos marcados con rojo para controles y colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Retire un número igual de micropocillos recubiertos con anticuerpo. Devuelva inmediatamente los micropocillos de anticuerpos que no se van a utilizar a la bolsa de aluminio con desecante. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio para proteger el anticuerpo. Marque un extremo de la tira con un "1" y coloque la tira en el estante para micropocillos con el extremo marcado al lado izquierdo.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo su frasco de reactivo antes de usarlo.
4. Utilice una punta de pipeta nueva para cada uno, transfiera 150 µL de controles y extractos de muestra a los micropocillos para transferencia marcados con rojo como se muestra en la plantilla siguiente. Utilice solamente un máximo de dos tiras de 12 micropocillos a la vez.

0	2.5	5	10	25	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

5. Coloque las puntas en la pipeta de 12 canales y transfiera 100 µL de los controles y los extractos de muestras a los micropocillos recubiertos con anticuerpo. Mezcle durante 20 segundos deslizando hacia atrás y hacia adelante el estante para micropocillos sobre una superficie plana.
6. Incube los micropocillos **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F). Deseche los micropocillos para transferencia marcados con rojo.
7. Vacíe en un lavaplatos o lavabo el contenido de los micropocillos. Con un frasco de lavado llene cada micropocillo revestido de anticuerpo con la solución buffer de lavado y deseche el contenido. Repita 5 veces este procedimiento de lavado, luego invierta los micropocillos y golpéelos sobre una toalla de papel absorbente hasta eliminar toda la solución de lavado restante.
8. Vierta el volumen necesario de conjugado del frasco con etiqueta azul a un bote de reactivo limpio.
9. Utilizando la pipeta de 12 canales y puntas nuevas, transfiera 100 µL del conjugado dentro de todos los micropocillos y mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
10. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
11. Lave todos los micropocillos con la solución tamponada de lavado como se describe en el paso 7.
12. Vierta el volumen necesario de la solución de sustrato del frasco con etiqueta verde a una bote de reactivo limpio.
13. Coloque las puntas nuevas sobre la pipeta de 12 canales y transfiera 100 µL de sustrato dentro de cada micropocillo y mezcle durante 20 segundos. No saque las puntas.
14. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
15. Vierta el volumen necesario de la solución de solución detenedora Red Stop del frasco con etiqueta roja a un bote de reactivo limpio.
16. Con las mismas puntas que se usaron para distribuir el sustrato, transfiera 100 µL de solución detenedora Red Stop dentro de cada micropocillo y mezcle durante 20 segundos.

17. Limpie el exterior de los micropocillos con un paño seco y lea en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Se deberán eliminar las burbujas de aire, ya que pueden afectar los resultados analíticos. Los resultados deberán leerse dentro de los **20 minutos** siguientes a la adición de la solución detenedora Red Stop.
18. Interprete los resultados de la prueba utilizando el lector de micropocillos de Neogen o un lector de tiras equivalente. Si se usa un lector de tiras, calcule los resultados utilizando el software Veratox para Windows® de Neogen.

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA PARA EVALUACIÓN

Permita que el kit de prueba y todos los reactivos alcancen una temperatura ambiente de 18–30°C (64–86°F) antes de utilizarlos.

1. Retire 1 micropocillo por cada muestra a ser analizada y 1 micropocillo para el control, colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Escoja una botella de control con etiqueta amarilla de 5 ppm para ser utilizada como nivel de detección.
3. Mezcle cada reactivo agitando o deslizando su botella antes de su uso.
4. Adicione 100 µL de la botella con etiqueta amarilla al primer micropocillo. Adicione 100 µL de cada extracto de la muestra al micropocillo respectivo como se indica en la tabla que aparece abajo. Para hisopados ambientales, adicione 3 gotas del tubo con un gotero. Mézclelos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante durante **20 segundos** sobre una superficie plana.

Control	S1	S2	S3	S4	S5
---------	----	----	----	----	----

5. Incube los micropocillos a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F) durante **10 minutos**.
6. Sacuda los micropocillos para eliminar su contenido. Utilizando una piseta o botella de lavado con solución buffer de lavado, llene cada micropocillo y vacíelos. Repita esto por 5 veces. Invierta los micropocillos para retirar el exceso de la solución buffer de lavado y golpéelos vigorosamente sobre una toalla de papel absorbente.
7. Adicione a cada micropocillo 100 µL de la botella con etiqueta azul conteniendo el conjugado. Mezcle por 20 segundos, deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
8. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
9. Sacuda los micropocillos para retirar su contenido. Utilizando una piseta o botella de lavado, llene cada micropocillo y sacúdalos. Repita este proceso **10 veces**. Invierta los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente y golpéelos vigorosamente para eliminar el exceso de solución de lavado.
10. Vierta en cada micropocillo 100 µL del sustrato contenido en la botella con etiqueta verde. Mézclelos deslizando por **20 segundos** hacia atrás y hacia adelante el estante para micropocillos sobre una superficie plana.
11. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
12. Agregue a cada micropocillo 100 µL de la solución detenedora Red Stop con etiqueta roja. Mézclelos deslizando por **20 segundos** el estante para micropocillos hacia adelante y hacia atrás sobre una superficie plana. Los resultados pueden ser ahora interpretados.
13. Visualmente compare el color del micropocillo que contiene la muestra contra el micropocillo de control. Si el azul en el micropocillo con la muestra es más oscuro o más azul que el del control, la muestra es positiva para contaminación con almendras. Si el micropocillo con la muestra presenta menos azul, o es más rojizo que el del control, significa que la muestra contiene menos contaminación con almendras que el control usado.

**Método Alternativo:** Limpie el exterior de los micropocillos con una toalla o paño seco y lea el resultado en un lector de micropocillos utilizando un filtro de 650 nm. Si el micropocillo con la muestra tiene una densidad óptica (DO) más alta que el micropocillo de control, la muestra es positiva para contaminación con almendras o superior a la contaminación en el control usado. Si el micropocillo con la muestra tiene una DO más baja que la del micropocillo de control, la muestra contiene menos contaminación con almendras que el micropocillo de control utilizado.

## **CARACTERÍSTICAS DEL DESEMPEÑO**

Límite de la cuantificación: 2,5 ppm (Descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración en que esta prueba puede detectar almendra con veracidad.)

Rango de la cuantificación: 2,5–25 ppm (Para muestras de cuantificación superiores a 25 ppm, comuníquese con un representante de Neogen a fin de obtener indicaciones para la dilución.)

Detección de alérgenos: Esta prueba detecta proteína de almendra y los resultados se expresan en ppm de almendra total.

Reactividad cruzada: Reacciona cruzadamente con semillas de manzana y con alimentos pertenecientes al género *Prunus* (ie. albaricoques, cerezas, nectarinas, melocotones o duraznos y ciruelas). Se ha identificado reactividad cruzada con la semilla (nuez); sin embargo, la pulpa (fruta sin semilla) no presenta reacción cruzada.

## **SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE**

Para obtener mayor información por favor contacte al Departamento de Servicio al Cliente y/o al Departamento de Servicios Técnicos de Neogen localizado en la parte de atrás de este folleto. Hay disponibilidad de entrenamiento para este producto y para todos los kits de Neogen.

## **DISPONIBILIDAD DE LAS FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD (SDS)**

Usted puede obtener las fichas de seguridad para este kit y para todos los kits analíticos de Neogen en [www.neogen.com](http://www.neogen.com), o llamando a los números +1 800-234-5333 o +1 517-372-9200.

## **TÉRMINOS Y CONDICIONES**

Por favor visite [www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html](http://www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html) para los términos y condiciones completos de Neogen.

## **GARANTÍA**

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un remplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgo resultante del uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comercialización de este producto o del rendimiento del mismo para ningún propósito. Neogen no se hará responsable por daños y perjuicios, incluyendo daños especiales o consecuentes, o gastos derivados directa o indirectamente por el uso de este producto.

## KITS ANALÍTICOS DISPONIBLES DE NEOGEN

### Toxinas naturales

- Aflatoxina, deoxinivalenol (DON), ochratoxina, zearalenona, toxina T-2/HT-2, fumonisina, histamina

### Bacterias presentes en los alimentos

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

### Saneamiento

- Trifosfato de adenosina (ATP), mohos y levaduras, recuento total en placa, *E. coli* genérico y total de coliformes, residuos proteínicos

### Alérgenos alimentarios

- Almendras, crustáceos, huevos, gliadina, avellana, lupino, leche, mostaza, maní, ajonjolí, soja, nuez de nogal y múltiples–nueces de árbol

### Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

### Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, alimento o concentrado para animales

### Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas



#### Norteamérica

##### Oficinas Corporativas de Neogen

620 Leshar Place, Lansing, MI 48912 EE.UU.

+1 800/234-5333 (EE.UU./Canadá) o

+1 517/372-9200

Fax: +1 517/372-2006

foodsafety@neogen.com

www.neogen.com

#### Europa, Medio Oriente y África

##### Neogen Europe

The Dairy School, Auchincruive, Ayr

KA6 5HU Escocia, Reino Unido

+ 44 (0) 1292 525 600

Fax: + 44 (0) 1292 525 601

info\_uk@neogeneurope.com

www.neogen.com

#### México

##### Neogen Latinoamérica

Prolongación 5 de Mayo # 27

Colonia Parque Industrial Naucalpan

Naucalpan, Estado de México C.P. 53489

+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-1198

Fax: +52 (55) 5531-1647

informacion@neogenlac.com

www.neogen.com

#### Brasil

##### Neogen do Brasil

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João Narezzí, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402

Tel: +55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogen.com

©Neogen Corporation, 2016. Neogen, K-Blue y Veratox son marcas comerciales registradas de Neogen Corporation. Todas las otras marcas y nombres de productos son marcas registradas o marcas comerciales de sus respectivas compañías.