

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®] for Hazelnut Allergen

Quantitative Test

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

HAZELNUT 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% of adults, and 6% to 8% 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 hazelnut components ensures food manufacturers that an unlabeled—and potentially dangerous—ingredient did not make its way into a food product.

INTENDED USE

Veratox for Hazelnut Allergen is intended for the full quantitative analysis or simple screening, of hazelnut protein residues in food products such as cookies, chocolate bars, ice cream and cereals.

INTENDED USER

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

ASSAY PRINCIPLES

The Veratox for Hazelnut Allergen test is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Hazelnut protein is extracted from samples with a phosphate buffered salt solution (PBS) by shaking in a heated water bath, followed by centrifugation or filtration. Extracted hazelnut protein is sampled and added to antibody-coated wells (capture antibody) where it binds to the antibody during an incubation. Any unbound hazelnut protein is washed away and a second antibody (detector antibody), which is enzyme labeled, is added. The detector antibody binds to the already bound hazelnut protein. After a second wash, 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 hazelnut expressed as parts per million of hazelnut.

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, and 25 ppm hazelnut 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. 5 foil pouches 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 holders for 250 mL disposable plastic bottles (Neogen items 9298, 9299)
4. Whatman No. 4 filters or equivalent (Neogen item 9429)
5. Centrifuge (optional)
6. Pipettor, 50–200 μL , adjustable (Neogen item 9276)
7. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
8. Pipette tips (Neogen item 9410, 9407, 9417)
9. Timer (Neogen items 9426, 9452)
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 ± 0.1 g (Neogen item 9427)

PRECAUTIONS

1. Components of Veratox for Hazelnut Allergen, such as controls and extraction reagents, may contain one or more of the following potentially allergic materials: casein; egg protein; peanut protein; soy protein; or tree nut protein. If allergic to any of these compounds, please use caution when handling 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 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. 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.
5. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze test kits.
6. Do not use kit components beyond expiration date.
7. Do not mix reagents from one kit serial with reagents from a different kit serial.
8. Do not run more than 24 wells per test.
9. Follow proper pipetting techniques (e.g., prime tips and use clean tips).
10. Use only incubation times specified. Others may give inaccurate results.
11. Bring kits to room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.
12. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
13. 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.

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 250 mL disposable plastic bottle.
5. Add one level scoop of the extraction additive to the sample bottle.
6. Pour 125 mL of the 60°C (140°F) extraction solution to the sample plastic bottle.
7. Cap the 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 No. 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.

ENVIRONMENTAL SWABBING PREPARATION AND EXTRACTION

1. Prepare the extraction solution as described in the procedural notes.
2. Prepare a working solution by combining 125 mL of the extraction solution to a separate container, and add one level scoop of extraction additive to a container. Prepare a fresh working solution daily.
NOTE: Prepare 125 mL of working solution for every 25 environmental swabs to be tested.
3. Preheat the working solution to 60°C (140°F). Shake container to dissolve additive.
4. Gather the sample with a swab, using one of the following methods:
For dry surfaces: Open a new swab and wet with extraction solution. Swab a 10 x 10 cm area by using a crosshatch technique. (Do not use working solution to moisten swabs.)
For wet surfaces: Open a new swab and swab a 10 x 10 cm area by using a crosshatch technique. Do not moisten swab prior to use.
5. Return the swab to its original tube once sampling is complete. Remember to label each tube.
6. Remove the swab from its tube, and add 5 mL of working solution at 60°C to the tube. Mix by placing the swab back into the tube and shaking for 2 minutes by hand (inverting tube), or for 30 seconds with a vortex mixer.
7. Remove the swab from its tube.
8. Place a new sample dropper tip onto the tube. The solution in the tube now serves as the sample.
NOTE: Use caution when inverting the tube, as some liquid may drip.

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 the remaining 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. Results should be read within **20 minutes** after the addition of Red Stop solution.
18. Interpret the test's results using Neogen's Stat-Fax microwell reader, or an equivalent strip reader. If using a strip reader, calculate the results using Neogen's Veratox 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 one yellow-labeled control bottle to serve as your screening level for the test. 5 ppm is recommended.**
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 5 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 hazelnut 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 hazelnut contamination.
Alternative: Read wells (wipe bottom of wells 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 hazelnut 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 hazelnut contamination.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

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

Protein conversion: Test kit results are expressed as total hazelnut. To express results as protein, multiply the hazelnut result by 0.15 (e.g., 2.5 ppm total hazelnut \times 0.15 = 0.375 ppm hazelnut protein). *On average, hazelnut contains 15% protein.

*Source: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, #12120 - Nuts, hazelnut or filberts.

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 foodsafety.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/en/terms-and-conditions.

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.

TEST 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, 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, feed



North America

Neogen Headquarters

800/234-5333 (USA/Canada)

foodsafety@neogen.com

foodsafety.neogen.com

Europe, Middle East and Africa

Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600

info_uk@neogeneurope.com

www.neogeneurope.com

Mexico

Neogen Latinoamerica

+52 (55) 5254-8235

informacion@neogenlac.com

www.neogenlac.com

Brazil

Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogendobrasil.com.br

China

Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013

info@neogenchina.com.cn

www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582

info@neogenindia.com

www.neogenindia.com

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox[®] **para alérgeno de avellana**

Prueba cuantitativa

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

ALÉRGENO DE AVELLANA

Los alérgenos alimentarios son proteínas en los alimentos que pueden crear una respuesta inmune en individuos sensibles. Una vez ingeridos, los alérgenos alimentarios pueden causar una serie de reacciones, que van desde urticaria y picazón hasta anafilaxia. La anafilaxia es una grave reacción alérgica que implica vómitos, diarrea, dificultad para respirar, hinchazón de la boca y la lengua, y una disminución rápida de la presión arterial.

Se estima que del 3.5 al 4 % de los adultos y del 6 al 8 % de los niños son sensibles en algún grado a los alérgenos alimentarios. Se sabe que más de 12 millones de personas en los Estados Unidos tienen una alergia alimentaria.

Los fabricantes de alimentos protegen a las personas con alergias alimentarias al etiquetar claramente sus productos con una lista de ingredientes. El análisis para la presencia de componentes de avellana asegura a los fabricantes de alimentos que un ingrediente no etiquetado — y potencialmente peligroso — no llegó al producto alimenticio.

USO PREVISTO

La prueba Veratox para alérgeno de avellana está destinada para el análisis cuantitativo o detección de residuos proteicos de avellana en productos alimenticios como galletas, barras de chocolate, helado y cereales.

USUARIO PREVISTO

El kit de prueba está diseñado para ser utilizado por personal de control de calidad y otros familiarizados con alimentos posiblemente contaminados por avellana o productos de avellana. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben ser entrenados por un representante de Neogen o alguien que haya completado exitosamente el entrenamiento de Neogen.

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.

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

La prueba Veratox para alérgenos de avellana es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas tipo sándwich (S-ELISA). El residuo de proteína de avellana se extrae de las muestras con buffer fosfato salino (PBS) agitándolas en un baño de agua caliente, seguido por una centrifugación o filtración. El residuo de avellana extraído se muestrea y se añade a los pocillos recubiertos de anticuerpos (anticuerpo de captura), donde se une al anticuerpo durante una incubación. Cualquier residuo de avellana no unido se elimina con un lavado y se añade un segundo anticuerpo (anticuerpo detector), que está marcado con enzima. El anticuerpo detector se une al residuo de avellana ya unido. Después de un segundo lavado, se añade el sustrato. El color se desarrolla como resultado de la presencia del anticuerpo detector unido. Se añade el reactivo Red Stop y se observa el color de solución resultante. La prueba se lee en un lector de micropocillos para obtener densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles forman una curva estándar, y las densidades ópticas de la muestra se trazan contra la curva para calcular la concentración exacta de avellana expresada como partes por millón de avellana.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 micropocillos recubiertos de anticuerpo
2. 48 micropocillos de transferencia marcados en rojo
3. 5 botellas con etiquetas amarillas de controles de avellana de 0, 2.5, 5, 10, 25 ppm
4. 2 botellas con etiqueta azul de conjugado de anticuerpo marcado con enzima
5. 1 botella con etiqueta verde de sustrato K-Blue®
6. 1 botella con etiqueta roja de solución Red Stop
7. 5 bolsas de aluminio de solvente de extracción en polvo seco PBS 10 mM; cada bolsa es suficiente para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7.4)
8. 40 mL de reactivo de lavado PBS-Tween 10 mM en una botella de boca ancha; cada botella 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, PERO NO PROPORCIONADOS

1. Kit de extracción de alérgenos (producto Neogen 8429)
 - a. 20 botellas plásticas desechables de extracción
 - b. 20 tubos para recolección de muestras (12 x 75 mm) con tapas
2. Kit de hisopado ambiental para alérgenos (producto Neogen 8432S)
 - a. 100 hisopos estériles
 - b. 100 goteros
3. Baño de agua con agitación capaz de mantener $60 \pm 1^\circ\text{C}$ con abrazaderas para las botellas de extracción de 250 mL (productos Neogen 9298, 9299)
4. Filtro Whatman No. 4 o equivalente (producto Neogen 9429)
5. Centrífuga (opcional)
6. Pipeteador, 50–200 μL , ajustable (producto Neogen 9276)
7. Pipeteador, 12 canales (producto Neogen 9273)
8. Puntas de pipeta (producto Neogen 9410, 9407, 9417)
9. Cronómetro (productos Neogen 9426, 9452)
10. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (producto Neogen 9303)
11. Botella de 1 L para preparar solución de lavado (producto Neogen 9472)
12. Botella de 1 L a prueba de calor para preparar la solución de extracción (producto Neogen 9472)
13. Toallas de papel o material absorbente equivalente
14. Gradilla para micropocillos (producto Neogen 9402)
15. Marcador impermeable
16. Piseta de lavado (producto Neogen 9400)
17. Agua destilada o desionizada

18. 3 reservorios para reactivos para pipeteador de 12 canales (producto Neogen 9435)
19. Cilindro graduado capaz de medir 125 mL (producto Neogen 9368)
20. Balanza capaz de pesar 5 ± 0.1 g (producto Neogen 9427)

PRECAUCIONES

1. Los componentes de Veratox para alérgeno de avellana, como controles y reactivos de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alergénicos: caseína, proteína de huevo, proteína de maní, proteína de soya o proteína de frutos secos. Si usted es alérgico a cualquiera de estos compuestos, tenga precaución al usar este producto.
2. Los aditivos, colores y sabores concentrados de los alimentos pueden causar interferencias con los métodos de prueba ELISA. Póngase en contacto con los servicios técnicos de Neogen para obtener información de validación.
3. Las proteínas hidrolizadas y fermentadas pueden no detectarse usando los métodos ELISA para las pruebas de alérgenos. Debido a la descomposición de las proteínas en pequeños péptidos o aminoácidos, pueden ser indetectables en el ensayo, pero aún podrían ser alergénicos y causar una reacción alérgica.
4. No se deben usar esponjas para la recolección de muestras y las pruebas de alérgenos. Los hisopos para recolección de muestra que no sean de Neogen deben validarse antes de su uso. Las esponjas e hisopos generales pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con el kit de prueba.
5. 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.
6. No utilice los componentes del kit después de su fecha de vencimiento.
7. No mezcle los reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
8. No ejecute más de 24 micropocillos por prueba.
9. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas (p. ej., cebar las puntas y usar puntas limpias).
10. Use los tiempos de incubación especificados; otros tiempos pueden dar resultados inexactos.
11. Permita que los kits de prueba alcancen una temperatura ambiente entre $18-30^{\circ}\text{C}$ ($64-86^{\circ}\text{F}$), antes de su uso.
12. Evite el almacenamiento prolongado de los kits de prueba a temperatura ambiente.
13. Use puntas de pipeta y cristalería limpia para cada muestra, para evitar la contaminación cruzada. Lave completamente toda la cristalería entre las muestras.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato.** El sustrato K-Blue está listo para su uso. El sustrato debe ser color transparente o azul claro – deséchelo si el líquido se ha vuelto azul oscuro. Solamente vierta el volumen necesario dentro del reservorio para reactivos. **No regrese a la botella el sustrato que no haya utilizado.** Cubra el reservorio para reactivos, para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
2. **Conjugado.** El conjugado suministrado con el kit está listo para usar. Una botella es suficiente para 24 micropocillos. Cubra el reservorio para reactivos para mantener el conjugado protegido de la luz directa y los contaminantes.
3. **Micropocillos recubiertos con anticuerpos.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio después de la extracción de las muestras y cuando esté listo para comenzar la prueba.
4. **Solución de extracción.** Prepare la solución de extracción añadiendo una bolsa de aluminio de buffer de extracción (PBS 10 mM) a 1 L de agua destilada o desionizada. Mezcle agitando para disolver completamente. Cubra y guarde las porciones no utilizadas, refrigeradas entre $2-8^{\circ}\text{C}$ ($35-46^{\circ}\text{F}$).

5. **Buffer de lavado.** Prepare la solución de buffer de lavado vertiendo todo el buffer de lavado concentrado en un recipiente vacío de 1 L. Enjuague la botella de buffer de lavado concentrado con agua destilada o desionizada y vierta en el recipiente de 1 L para asegurarse de que se utiliza todo el concentrado. Llene el recipiente de 1 L con agua destilada o desionizada adicional y agite para garantizar una mezcla completa. Cubra y guarde las porciones no utilizadas, refrigeradas entre 2–8°C (35–46°F).

NOTA: Deseche las porciones no utilizadas de la solución de extracción y de buffer de lavado cuando el kit se haya utilizado por completo.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra a ser analizada debe recolectarse de acuerdo con las técnicas de muestreo aceptadas (consulte el Manual de Alérgenos Alimentarios de Neogen). La muestra debe molerse y mezclarse bien antes de proceder con el procedimiento de extracción.

1. Prepare la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Precaliente la solución de extracción a 60°C (140°F) sumergiendo la botella con la solución en el baño de agua, permitiendo que alcance 60°C.
3. Utilizando su procedimiento de muestreo y recolección, obtenga una muestra representativa y tritúrela a un tamaño de partícula muy fino.
4. Transfiera 5 g de muestra o 5 mL de muestra líquida a una botella plástica de extracción desechable de 250 mL.
5. Añada una cucharada rasa del aditivo de extracción en la botella de muestra.
6. Vierta 125 mL de la solución de extracción a 60°C (140°F) en la botella de muestra.
7. Tape la botella de muestra para evitar que el contenido salpique durante la extracción.
8. Extraiga por agitación (150 rpm) en un baño de agua a 60°C (140°F) durante 15 minutos. Retire la botella del baño.
9. Permita que el material se asiente durante 5 minutos antes de continuar con el siguiente paso.
10. Filtre el extracto vertiendo al menos 5 mL a través de un filtro Whatman no. 4 y recolecte el filtrado como muestra.

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

11. Permita que los extractos se enfríen a una temperatura ambiente antes de comenzar el análisis.
12. Deseche los extractos después de terminar el análisis.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN PARA HISOPADO AMBIENTAL

1. Prepare la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Prepare una solución de trabajo combinando 125 mL de la solución de extracción en un recipiente separado y añada una cucharada rasa del aditivo de extracción a un recipiente. Prepare una solución de trabajo fresca diariamente.

NOTA: Prepare 125 mL de solución de trabajo por cada 25 hisopos ambientales que se analizarán.

3. Precaliente la solución de trabajo a 60°C (140°F). Agite el recipiente para disolver el aditivo.
4. Recolecte la muestra con un hisopo, usando uno de los siguientes métodos:

Para superficies secas: Abra un hisopo nuevo y humedézcalo con solución de extracción. Muestree con el hisopo un área de 10 x 10 cm usando una técnica de rayado cruzado. (No use solución de trabajo para humedecer hisopos.)

Para superficies húmedas: Abra un hisopo nuevo y muestree un área de 10 x 10 cm usando una técnica de rayado cruzado. No humedezca el hisopo antes de usarlo.

5. Devuelva el hisopo a su tubo original una vez que se complete el muestreo. Recuerde etiquetar cada tubo.
6. Retire el hisopo del tubo y añada 5 mL de solución de trabajo a 60°C al tubo. Mezcle colocando el hisopo en el tubo y agite durante 2 minutos a mano (invirtiendo el tubo) o durante 30 segundos con un vortex.
7. Retire el hisopo del tubo.

8. Coloque un nuevo gotero en el tubo. La solución en el tubo ahora sirve como muestra.

NOTA: Tenga cuidado al invertir el tubo, ya que puede gotear un poco de líquido.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA PARA CUANTIFICACIÓN

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

1. Retire 1 micropocillo de mezcla marcado en rojo para cada muestra a ser analizada, más 5 micropocillos marcados en rojo para cada control; colóquelos en la gradilla para micropocillos.
2. Retire una cantidad igual de micropocillos recubiertos con anticuerpos. Devuelva inmediatamente los micropocillos que no serán utilizados 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 la gradilla para micropocillos con el extremo marcado a la izquierda.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo la botella del reactivo antes de usar.
4. Usando una nueva punta de pipeta para cada uno, transfiera 150 µL de controles y de extractos de muestra a los micropocillos de transferencia marcados con rojo, como se muestra en la tabla a continuación. Ejecute solo 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 puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL de los controles y de extractos de muestras a los micropocillos recubiertos con anticuerpos. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
6. Incube los micropocillos durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F). Deseche los micropocillos de transferencia marcados en rojo.
7. Vacíe el contenido de los micropocillos en un fregadero. Con una piseta de lavado, llene bien cada micropocillo de anticuerpos con la solución buffer de lavado y viértalo. Repita el lavado 5 veces, luego voltee los micropocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel hasta eliminar toda la solución de lavado restante.
8. Vierta el volumen necesario de conjugado de la botella con etiqueta azul en un reservorio para reactivo limpio.
9. Usando el pipeteador de 12 canales y puntas nuevas, transfiera 100 µL del conjugado a todos los micropocillos y mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
10. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
11. Lave todos los micropocillos con la solución buffer de lavado como se describe en el paso 7.
12. Vierta el volumen necesario de solución de sustrato de la botella con etiqueta verde en un reservorio para reactivo limpio.
13. Coloque puntas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL del sustrato en cada micropocillo y mezcle durante 20 segundos. No quite las puntas.
14. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
15. Vierta el volumen necesario de la solución Red Stop de la botella con etiqueta roja en un reservorio para reactivo limpio.
16. Con las mismas puntas usadas para dispensar el sustrato, transfiera 100 µL de la solución Red Stop a todos los micropocillos y mezcle durante 20 segundos.
17. Con un paño seco limpie el exterior de los micropocillos y léalos en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Los resultados deben leerse dentro de los **20 minutos** posteriores a la adición de la solución Red Stop.
18. Interprete los resultados de la prueba usando el lector de micropocillos Stat-Fax de Neogen o un lector de tiras equivalente. Si usa un lector de tiras, calcule los resultados usando Veratox de Neogen.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA PARA EL CRIBADO

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

1. Retire 1 micropocillo para cada muestra a ser analizada y 1 micropocillo para el control; colóquelos en la gradilla para micropocillos.
2. **Escoja una botella de control con etiqueta amarilla para que sirva como nivel de detección para la prueba. Se recomiendan 5 ppm.**
3. Mezcle cada reactivo revolviendo su botella antes de usar.
4. Añada 100 µL del control en la botella con etiqueta amarilla al primer micropocillo. Añada 100 µL de cada extracto de muestra al micropocillo respectivo, como se indica en la tabla que aparece a continuación. Para hisopos ambientales, añada 3 gotas del tubo del hisopo con un gotero. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante 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. Elimine el contenido de los micropocillos. Usando una piseta de lavado con solución de buffer de lavado, llene cada micropocillo y vacíelos. Repita 5 veces. Elimine el exceso de buffer de lavado volteando los pocillos y golpeándolos vigorosamente en una toalla de papel.
7. Añada 100 µL del conjugado en la botella con etiqueta azul a cada micropocillo. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla 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. Elimine el contenido de los micropocillos. Usando una piseta de lavado con solución de buffer de lavado, llene cada micropocillo y vacíelos. Repita 5 veces. Elimine el exceso de buffer de lavado volteando los pocillos y golpeándolos vigorosamente en una toalla de papel.
10. Añada 100 µL del sustrato en la botella con etiqueta verde a cada micropocillo. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
11. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
12. Añada 100 µL de la botella con etiqueta roja de Red Stop a cada micropocillo. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Los resultados están listos para ser interpretados.
13. Compare visualmente el color de un micropocillo de muestra con el color del micropocillo de control. Si el micropocillo de muestra tiene **más color azul** que el micropocillo de control, la muestra contiene más contaminación de avellana **que el control utilizado**. Si el micropocillo de muestra tiene **menos color azul o más color rojo** que el micropocillo de control, la muestra contiene **menos contaminación que el control utilizado**.

Alternativa: Lea los micropocillos (limpie el fondo de los micropocillos primero) en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Si el micropocillo de muestra tiene una densidad óptica (DO) más alta que el micropocillo de control, la muestra contiene más contaminación de avellana que el control utilizado. Si el micropocillo de muestra tiene una DO más baja que el micropocillo de control, la muestra contiene menos contaminación de avellana que el control utilizado.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de cuantificación: 2.5 ppm de avellana total (Descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración en la que esta prueba puede detectar avellana de manera confiable).

Rango de cuantificación: 2.5–25 ppm de avellana total (Para cuantificar muestras por encima de 25 ppm, comuníquese con un representante de Neogen para obtener instrucciones de dilución).

Detección de alérgenos: Esta prueba detecta la proteína de avellana y los resultados se expresan como ppm de avellana total.

Conversión de proteínas: Los resultados del kit de prueba se expresan como avellana total. Para expresar los resultados como proteína, multiplique el resultado de avellana por 0.15 (p. ej., 2.5 ppm de avellana total x 0.15 = 0.375 ppm de proteína de avellana). *En general, la avellana contiene 15% de proteína.

*Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, #12120 - nueces, avellanas.

SERVICIO AL CLIENTE

Puede contactar los Servicios Técnicos y Asistencia al Cliente de Neogen usando la información de contacto en la parte posterior de este folleto. Entrenamiento para este producto, y para todos los kits de Neogen, está disponible.

INFORMACIÓN DE HOJAS DE SEGURIDAD (SDS) DISPONIBLE

Las Hojas de Seguridad (SDS) para este kit, y para todos los kits de Neogen, están disponibles en la página electrónica de Neogen foodsafety.neogen.com/sp, o llamando a Neogen al +1 800/234-5333 o +1 517/372-9200.

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite 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 riesgos resultantes por el uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comerciabilidad de este producto o de la idoneidad de éste para cualquier propósito. Neogen no será responsable de ningún daño, incluyendo daños especiales o consecuenciales, o de gastos derivados directa o indirectamente del uso del producto.

KITS DE PRUEBAS DISPONIBLES DE NEOGEN

Toxinas naturales

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

Bacterias transmitidas por 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 coliformes totales, residuos proteicos

Alérgenos alimentarios

- Almendras, crustáceos, huevos, gliadina, avellana, leche, mostaza, maní, sésamo, soya, nogal y múltiples frutos secos

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos de rumiantes

- Harina de carne y huesos, piensos

Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas, piensos



Norteamérica

Oficinas Corporativas de Neogen

+1 800/234-5333 (EEUU/Canadá)
foodsafety@neogen.com
foodsafety.neogen.com/sp

Europa, Medio Oriente y África Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

México

Neogen Latinoamérica

+52 (55) 5254-8235
informacion@neogenlac.com
www.neogenlac.com

Brazil

Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br
www.neogendobrasil.com.br

China

Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013
info@neogenchina.com.cn
www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582
info@neogenindia.com
www.neogenindia.com