

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®]

for Aflatoxin M₁

THE TOXIN

Aflatoxin M₁ is a toxin metabolite of aflatoxin B₁, which is produced by certain strains of the molds *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. There are four principle types of aflatoxin: B₁, B₂, G₁ and G₂. Aflatoxin B₁ is the most frequently encountered of the group and the most toxic.

Aflatoxin is carcinogenic and may be present in grains and animal feeds. When animals are fed grain or feed contaminated with the toxin, aflatoxin B₁ is converted by hydroxylation to aflatoxin M₁, which is subsequently secreted in the milk of lactating cows.

Many countries have set maximum allowable levels of aflatoxin M₁ in dairy products. Therefore, accurate determination of the toxin's presence is of major importance to those monitoring the quality of products in which aflatoxin may occur. Testing these commodities for the toxin requires careful sampling, chemical extraction, sanitation, and quantitative analysis.

The U.S. Food and Drug Administration has issued regulatory levels for aflatoxin at 500 parts per trillion (ppt) in milk. In the European Union, the limit for aflatoxin M₁ is 50 ppt in raw milk, heat treated milk, and milk for the manufacture of milk-based products.

INTENDED USE

Veratox[®] for Aflatoxin M₁ is intended for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in commodities such as milk, milk powder, butter and cheese.

INTENDED USER

The test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with commodities possibly contaminated with aflatoxin M₁. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has successfully completed training.

ASSAY PRINCIPLES

Veratox for Aflatoxin M₁ is a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that allows the user to obtain exact concentrations of aflatoxin M₁ in dairy products in parts per trillion (ppt). Free aflatoxin M₁ in the samples and controls is added to microwells that have been coated with anti-aflatoxin M₁ monoclonal antibody. A wash step will remove any unbound aflatoxin.

During a second incubation, an aflatoxin-HRP conjugate will bind to the remaining free binding site on the antibody. After a wash step, substrate is added and allowed to react with the bound conjugate to produce blue color. More blue color means less aflatoxin M₁. The test is read in a microwell reader to yield optical densities. The optical densities of the controls form the standard curve, and the sample optical densities are plotted against the curve to calculate the exact concentration of aflatoxin M₁.

STORAGE REQUIREMENTS

The kit can be used until the expiration date on the label when stored refrigerated at 2–8°C (35–46°F).

MATERIALS PROVIDED

1. Microwell holder
2. 96 antibody-coated microwells
3. 96 red-marked mixing wells
4. 6 yellow-labeled bottles of 0, 5, 15, 30, 60, and 100 ppt aflatoxin controls
5. 1 bottle of sample diluent
6. 1 bottle of 25X wash buffer. Each bottle is enough to prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
7. 2 blue-labeled bottles of aflatoxin-HRP conjugate solution
8. 1 green-labeled bottle of K-Blue® Substrate solution
9. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Scale capable of weighing 1–11 grams
2. Microwell reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
3. 12-channel pipettor (Neogen item 9273)
4. 100 µL pipettor (Neogen item 9272)
5. Tips for 100 µL and 12-channel pipettors (Neogen item 9410)
6. Paper towels or equivalent absorbent material
7. Plastic bucket for use as waste receptacle
8. Plate rotary shaker
9. Timer (Neogen item 9426)
10. Vortex
11. Waterproof marker
12. Wash bottle (Neogen item 9400)
13. 3 reagent boats for 12-channel pipettor (blue, green and red-labeled) (Neogen item 9435)
14. Centrifuge with rotor for 50 cc tubes
15. 50 cc tubes with caps
16. Distilled or deionized water
17. Dichloromethane (cheese testing only)
18. Hexanes (cheese testing only)
19. 100% methanol (cheese testing only)
20. Chemical fume hood (cheese testing only)
21. High-speed blender (cheese testing only)
22. Grater (cheese testing only)
23. Water bath evaporator with nitrogen gas stream (cheese testing only)
24. Incubator capable of maintaining 50°C (cheese testing only)
25. Glass tube for evaporation (cheese testing only)

PRECAUTIONS

1. Methanol, dichloromethane and hexanes are highly flammable. Keep container tightly closed and keep away from heat, sparks, open flame and those smoking. They are toxic if swallowed, or if vapor is inhaled. Avoid contact with skin.
2. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze.
3. Do not use kit components beyond expiration date.
4. Do not mix reagents from one kit lot with reagents from a different lot.
5. Do not run more than 24 wells per test.
6. Run controls and samples in duplicate.
7. Follow proper pipetting technique (e.g., prime tips and use clean tips).
8. Use of incubation times other than those specified may give inaccurate results.
9. Kits and components should be brought to room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.
10. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
11. Treat all used liquids, including sample extract, and labware as if contaminated with aflatoxin. Gloves and other protective apparel should be worn at all times.
12. To avoid cross-contamination, use clean pipette tips and glassware for each sample, and thoroughly detoxify and 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 it is needed.
2. **Conjugate.** The conjugate supplied with this kit is ready to use. The two bottles provided are enough for 96 wells. Cover the reagent boat to keep conjugate protected from direct light and contaminants.
3. **Wash Buffer.** Prepare the wash buffer solution by pouring all the 25X 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 ensure 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.
4. **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.

SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques (see Neogen's Food Allergen Handbook). Cheese samples should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction. Store samples at 2–8°C (35–46°F) until analyzed.

Liquid milk

1. Centrifuge milk samples to separate fat for **10 minutes** at 3500 rpm (2740 x g) at 10°C (50°F).
NOTE: If a refrigerated centrifuge is not available, pre-cool the sample in an ice bath for **10–15 minutes**.
2. After centrifugation, collect the defatted supernatant (bottom layer).
NOTE: Be sure to avoid collecting the upper fatty layer as this will add an additional matrix to the sample, which could adversely impact the outcome of the assay.
3. The supernatant (skimmed milk) will be used directly in the test (100 µL per well).
NOTE: No dilution factor is used.

Dried milk powders

1. Weigh 10 g of milk powder in a flask. Add 100 mL of distilled water.
2. Stir to dissolve and homogenize.
3. Extract in a rotary shaker for **30 minutes**.
NOTE: If whole milk powder is used, continue with steps 4 and 5. If not testing whole milk powder, proceed to step 6.
4. Centrifuge milk samples to separate fat for **10 minutes** at 3500 rpm (2740 x g) at 10°C (50°F).
NOTE: If a refrigerated centrifuge is not available, pre-cool the sample in an ice bath for **10–15 minutes**.
5. After centrifugation, collect the defatted supernatant (bottom layer).
NOTE: Be sure to avoid collecting the upper fatty layer as this will add an additional matrix to the sample, which could adversely impact the outcome of the assay.
6. The supernatant (skimmed milk) will be used directly in the test (100 µL per well).
NOTE: Because the milk powders were diluted 1:10 during extraction, predicted values need to be multiplied by 10 in order to obtain ppt of aflatoxin M₁ per gram of the powdered milk.

For example, if the predicted reading is 10 ppt, this refers to the level in reconstituted milk. To calculate the amount in milk powder, multiply by 10:

$$10 \text{ ppt} \times 10 = 100 \text{ ppt/g powdered milk}$$

Cheese

NOTE: Carefully grate a representative sample. In cheeses with high amounts of external mold, shave off the outer layer prior to sampling, as the mold will hinder the performance of the assay.

1. Weigh out 2 g of finely grated cheese in a 50 cc centrifuge tube.
2. Add 10 mL of 100% dichloromethane.
3. Vortex for **1 minute**.
4. Extract in a rotary shaker for **15 minutes**.
5. Incubate at 50°C (122°F) for **30 minutes**.
6. Centrifuge at 3500 rpm (2740 x g) for **15 minutes** at 10°C (50°F).
7. Withdraw 5 mL of the dichloromethane supernatant and place in a glass tube.
8. Evaporate dichloromethane to dryness using a water bath evaporator set at 60°C (140°F) with the use of a nitrogen gas stream to help speed evaporation.
9. Re-dissolve the oily residue in 0.5 mL of 100% methanol and 0.5 mL of distilled water, then add 4 mL of 100% hexanes.
10. Vortex for **1 minute**.
11. Centrifuge at 3500 rpm (2740 x g) for **10 minutes** at 10°C (50°F).
12. Remove hexanes (upper layer) completely using a Pasteur pipette.
13. Take a 0.5 mL aliquot of the remaining methanol-water layer and dissolve in 2 mL of the sample diluent.
14. Vortex for **1 minute**.
15. Use this reconstituted material directly in the test (100 µL per well).

NOTE: Because the cheeses were diluted 1:5 during extraction, predicted values need to be multiplied by 5 in order to obtain ppt of aflatoxin M₁ per gram of the cheese.

For example, if predicted reading is 10 ppt, this refers to the level in cheese. To calculate the amount in cheese, multiply by 5:

$$10 \text{ ppt} \times 5 = 50 \text{ ppt/g cheese}$$

TEST PROCEDURE

Allow all reagents to warm to room temperature 8–30°C (64–86°F) before use. All standards and samples will be run in duplicate wells. This will be achieved by transferring standards and samples from 1 red-marked mixing well into 2 antibody-coated microwells.

1. Remove 1 red-marked mixing well for each sample to be tested plus 6 red-marked wells for controls, and place in the well holder.
2. Remove 2 antibody-coated wells per 1 red-marked mixing well to be used. Return antibody wells that will not be used immediately to the foil pack with desiccant. Reseal the foil pack to protect the antibody. Mark one end of strip with a “1” and place strip in the well holder with the marked end on the left. Do not mark the inside or bottom of the wells.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Using a new pipette tip for each, transfer 250 µL of controls and samples to the red-marked mixing wells as described below.

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Strip 1
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	---------

5. Using a 12-channel pipettor, transfer 100 µL from the above mixing wells to the 2 antibody-coated wells as described below.

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Strip 1
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	---------

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Strip 2
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	---------

6. Place the microwell holder on an automatic plate shaker (~600 rpm) and allow continuous shaking for **20 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F). Discard the red-marked mixing wells.
7. Shake out the contents of the antibody wells. Fill the wells with diluted wash buffer and dump them out. Repeat this step a total of 5 times, then turn the wells upside-down and tap out on a paper towel until the remaining wash buffer has been removed.
8. Pour the needed volume of conjugate from the blue-labeled bottle into the blue-labeled reagent boat.
9. With new tips on the 12-channel pipettor, prime and pipette 100 µL of conjugate into the wells.
10. Place the microwell holder on an automatic plate shaker (~600 rpm) and allow continuous shaking for **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
11. Shake out the contents of the antibody wells. Fill the wells with diluted wash buffer and dump them out. Repeat this step a total of 5 times, then turn the wells upside-down and tap out on a paper towel until the remaining wash buffer has been removed.
12. Pour the needed volume of substrate from the green-labeled bottle into the green-labeled reagent boat.
13. With new tips on the 12-channel pipettor, prime and pipette 100 µL of substrate into the wells.
14. Place the microwell holder on an automatic plate shaker (~600 rpm) and allow continuous shaking for **15 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
15. Discard remaining substrate and rinse the reagent boat with water.
16. Pour Red Stop Solution from the red-labeled bottle into the red-labeled reagent boat.
17. Eject the excess substrate from the 12-channel pipettor, prime the tips, and pipette 100 µL of Red Stop to each well. Mix by sliding back and forth on a flat surface. Discard the tips.
18. Wipe the bottom of the microwells with a dry cloth or towel and read in a microwell reader using 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.
19. Read and calculate results using Neogen's microwell reader, or an equivalent strip reader. If using another strip/plate reader, calculate results using Neogen's Veratox for Windows® software.

RETESTING

If positives occur in commodities not previously tested, confirm with an additional approved method prior to taking action.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross-reactivity: Aflatoxin M₁ 100%. Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, and M₂ < 1%.

Limit of detection: 4.3 ppt (Determined by the mean average of 10 aflatoxin M₁-free samples plus 2 standard deviations.)

Limit of quantitation: 5 ppt (Described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect aflatoxin M₁.)

Range of quantitation: 5–100 ppt (For quantitating samples above 100 ppt, contact Neogen Technical Services for dilution instructions.)

Validated matrixes: Liquid raw milk, nonfat dried milk, dried whole milk powders, cheese and butter.

CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Services 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 test kits, on Neogen's website at 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.

WARRANTY

Neogen makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. 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.



NOTES



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, 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 Latinoamerica

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@neogen.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

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

 **Veratox[®]**

para Aflatoxina M₁

LA TOXINA

La aflatoxina M₁ es una toxina metabolita de la aflatoxina B₁, la cual es producida por ciertas cepas de los mohos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Existen cuatro tipos principales de aflatoxina: B₁, B₂, G₁ y G₂. La aflatoxina B₁ es la más frecuente de este grupo y la más tóxica.

La aflatoxina es carcinogénica y puede estar presente en cereales y en alimentos para animales. Al alimentar a los animales con cereales o alimentos contaminados con la toxina, la aflatoxina B₁ es convertida por hidroxilación a aflatoxina M₁ y posteriormente secretada en la leche de las vacas lactantes.

Muchos países han establecido niveles máximos permitidos de aflatoxina M₁ en productos lácteos. Por lo tanto, la exacta determinación de la presencia de la toxina es de suma importancia para quienes monitorean la calidad de los productos que puedan contener aflatoxina. La realización de pruebas a estos materiales para determinar la presencia de esta toxina requiere de un muestreo cuidadoso, extracción química, saneamiento y análisis cuantitativos.

La FDA (U.S. Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) ha establecido niveles regulatorios de aflatoxina en 500 partes per trillón (ppt) en la leche. En la Unión Europea el límite para la aflatoxina M₁ es de 50 ppt para leche cruda, leche tratada con calentamiento y leche usada en la fabricación de productos lácteos.

PROPÓSITO DE USO

La prueba Veratox[®] para Aflatoxina M₁ está diseñada para el análisis cuantitativo de aflatoxina M₁ en productos como la leche, leche en polvo, mantequilla y queso.

USUARIO PREVISTO

Este kit de prueba está diseñado para ser usado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con alimentos posiblemente contaminados con aflatoxina M₁. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben ser capacitados por un representante de Neogen o por alguna persona que haya terminado con éxito dicho entrenamiento.

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

La prueba Veratox para Aflatoxina M_1 es un ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) de captura que permite al usuario obtener concentraciones exactas de aflatoxina M_1 en productos lácteos en partes por trillón (ppt). La aflatoxina M_1 libre en las muestras y controles es adicionada a micropocillos que han sido recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra la aflatoxina M_1 . Se realiza un paso de lavado para remover la aflatoxina que no se haya unido o adherido.

Durante una segunda incubación, un conjugado de aflatoxina-HRP) o (peroxidasa de rábano picante, por sus siglas en inglés) se unirá a los sitios de absorción libres en el anticuerpo. Luego de un proceso de lavado, se adiciona el sustrato y se permite que reaccione con el conjugado ya adherido para producir un color azul. Un color más azul significa que hay menos cantidad de aflatoxina M_1 . El análisis se lee en un lector de micropocillos para obtener densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles forman una curva estándar. Las densidades ópticas de la muestra se grafican comparándolas con la curva para calcular la concentración exacta de aflatoxina M_1 .

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Este kit de prueba puede ser usado hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta si se almacena refrigerado entre 2–8°C (35–46°F).

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Estante para micropocillos
2. 96 micropocillos recubiertos con anticuerpo
3. 96 micropocillos para mezclado marcados con rojo
4. 6 botellas de controles de aflatoxina con etiquetas amarillas de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt
5. 1 botella con diluyente de muestras
6. 1 botella de tampón de lavado a 25X. Cada botella es suficiente para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7,4)
7. 2 botellas con etiqueta azul de solución conjugada de aflatoxina-HRP
8. 1 botella con etiqueta verde de solución de Sustrato K-Blue®
9. 1 botella con etiqueta roja de solución detenedora Red Stop

MATERIALES REQUERIDOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Balanza con capacidad de 1–11 gramos
2. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
3. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
4. Pipeta de 100 µL (Producto Neogen 9272)
5. Puntas para pipeta de 100 µL y puntas para pipeta de 12-canales (Producto Neogen 9410)
6. Toallas desechables de papel o de un material absorbente equivalente
7. Balde plástico para ser usado como recipiente para desechos
8. Agitador rotatorio para placas
9. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
10. Vortex
11. Marcador a prueba de agua
12. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
13. 3 recipientes para reactivos para pipeta de 12 canales (con etiqueta azul, verde y roja) (Producto Neogen 9435)
14. Centrífuga con rotor para tubos de 50 cc
15. Tubos de 50 cc con tapas
16. Agua destilada o desionizada
17. Diclorometano (únicamente para pruebas de queso)
18. Hexanos (únicamente para pruebas de queso)
19. Metanol al 100% (únicamente para pruebas de queso)
20. Campana extractora de humos (únicamente para pruebas de queso)
21. Licuadora de alta velocidad (únicamente para pruebas de queso)

22. Rallador (únicamente para pruebas de queso)
23. Evaporador baño maría con flujo de gas de nitrógeno (únicamente para pruebas de queso)
24. Incubadora capaz de mantener una temperatura de 50°C (únicamente para pruebas de queso)
25. Tubo de vidrio para evaporación (únicamente para pruebas de queso)

PRECAUCIONES

1. El metanol, los diclorometanos y hexanos son altamente inflamables. Mantenga el envase firmemente sellado y alejado del calor, chispas, llamas abiertas y personas fumadoras. Los productos antes mencionados son tóxicos si son ingeridos o si su vapor es inhalado. Evite el contacto con la piel.
2. Almacene el kit de prueba y sus componentes entre 2–8°C (35–46°F) cuando no lo utilice. No lo congele.
3. No utilice los componentes del kit de prueba después de su fecha de vencimiento.
4. No mezcle los reactivos de una serie de kit con reactivos de una serie y lote diferentes.
5. No trabaje con más de 24 micropocillos para cada prueba.
6. Trabaje con controles y con muestras en duplicado.
7. Observe la técnicas adecuadas para pipeteado (por ejemplo, el cebado de las puntas y el uso de puntas limpias).
8. Utilice los tiempos de incubación especificados. El uso de otros tiempos pueden generar resultados inexactos.
9. Permita que el kit de prueba y sus componentes alcancen una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F), antes de utilizarlos.
10. Evite el almacenamiento prolongado de los kits de prueba a una temperatura ambiente.
11. Trate todos los líquidos, incluyendo el extracto de la muestra, y los objetos del laboratorio como si estuvieran contaminados con aflatoxina. Se requiere usar todo el tiempo el equipo de protección personal adecuado y guantes al trabajar con estos materiales.
12. Utilice nuevas puntas de pipeta y materiales de vidrio para cada muestra a fin de evitar la contaminación cruzada. Lave escrupulosamente y a fondo todo el material de vidrio entre la toma de una muestra y la siguiente.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato.** El sustrato K-Blue está listo para su uso. El color del sustrato debe oscilar entre transparente hasta azul claro — deséchelo si se ha oscurecido o se ha tornado azul oscuro. Vierta sólo el volumen de sustrato necesario en un bote de reactivo. **No devuelva al frasco el sustrato que no haya utilizado.** Cubra el bote de reactivo para proteger el sustrato de los efectos de la luz hasta que lo necesite.
2. **Conjugado.** El conjugado suministrado con este kit de prueba está listo para su uso. Los dos botellas suministradas son suficientes para 96 micropocillos. Cubra el bote de reactivo para mantener el conjugado protegido de la luz directa y contaminantes.
3. **Solución tampón de lavado.** Prepare la solución tampón de lavado vertiendo todo el contenido de la botella de tampón de lavado con concentración de 25X en un recipiente vacío de 1 L. Enjuague la botella del concentrado 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 entre 2–8°C (35–46°F).
NOTA: Deseche las porciones no usadas de la solución de extracción y de la solución tampón de lavado cuando el kit de prueba ha sido utilizado completamente.
4. **Micropocillos recubiertos con anticuerpo.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Extraiga los micropocillos de la bolsa de aluminio sólo después de obtener los extractos de las muestras y cuando el análisis esté listo para empezar.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

La recolección de la muestra a analizar deberá efectuarse según las técnicas de muestreo aceptadas. Las muestras de queso deben ser completamente trituradas y mezcladas antes de proceder con el procedimiento de extracción. Almacene las muestras entre 2–8°C (35–46°F) hasta el momento de realizar el análisis.

Leche líquida

1. Centrifuge las muestras de leche líquida hasta que ocurra una separación de la grasa durante **10 minutos** a 3500 rpm (2740 x g) a una temperatura de 10°C (50°F).
NOTA: Si no hay disponibilidad de una centrifuga refrigerada, se debe pre-enfriar la muestra en un baño con cubos de hielo durante **10–15 minutos**.
2. Luego de la centrifugación, recolecte el supernadante sin grasa (capa inferior).
NOTA: Asegúrese de evitar recolectar la capa de grasa superior pues esto adicionará una matriz adicional a la muestra, lo cual puede impactar adversamente los resultados del ensayo.
3. El supernadante (leche descremada) será usado directamente en la prueba (100 µL por cada micropocillo).
NOTA: No se requiere un factor de dilución.

Leche seca en polvo

1. En un matraz pese 10 g de leche en polvo. Adicione 100 mL de agua destilada o desionizada.
2. Agite hasta disolver y homogeneizar.
3. Extraiga en un agitador rotatorio por **30 minutos**.
NOTA: Si está trabajando con leche entera en polvo, continúe con los pasos 4 y 5. Si usted no está trabajando con leche entera en polvo, proceda con el paso 6.
4. Centrifuge las muestras de leche para separar la grasa durante **10 minutos** a 3500 rpm (2740 x g) a una temperatura de 10°C (50°F).
NOTA: Si no hay disponibilidad de una centrifuga refrigerada, se debe pre-enfriar la muestra en un baño con cubos de hielo durante **10–15 minutos**.
5. Luego de la centrifugación, recolecte el supernadante sin grasa (capa inferior).
NOTA: Asegúrese de evitar recolectar la capa de grasa superior pues esto adicionará una matriz adicional a la muestra, lo cual puede impactar adversamente los resultados del ensayo.
6. El supernadante (leche descremada o sin grasa) será usado directamente en la prueba (100 µL por cada micropocillo).
NOTA: Debido a que la leche en polvo fue diluida en una proporción de 1:10 durante el proceso de extracción, los valores estimados deben ser multiplicados por 10 para obtener un resultado en ppt de aflatoxina M₁ por gramo de leche en polvo.

Por ejemplo, si la lectura estimada es de 10 ppt, esto se refiere al nivel en la leche reconstituída. Para calcular la cantidad en la leche en polvo, se debe multiplicar por 10:

$$10 \text{ ppt} \times 10 = 100 \text{ ppt/g en leche en polvo}$$

Queso

NOTA: Ralle cuidadosamente una muestra representativa de queso. Para quesos con gran cantidad de mohos en su superficie, corte y deseche la capa exterior del queso antes de tomar la muestra pues el moho obstaculizará el rendimiento del ensayo.

1. Pese 2 g de queso finamente rallado en un tubo de centrifuga de 50 cc.
2. Adicione 10 mL de diclorometano al 100%.
3. Coloque en el vortex por **1 minuto**.
4. Extraiga en un agitador rotatorio por **15 minutos**.
5. Incube a 50°C (122°F) durante **30 minutos**.
6. Centrifuge a 3500 rpm (2740 x g) durante **15 minutos** a 10°C (50°F).
7. Retire 5 mL del supernadante de diclorometano y colóquelo en un tubo de vidrio.
8. Evapore el diclorometano hasta su secado usando un evaporador de baño maría a una temperatura 60°C (140°F), use flujo de gas de nitrógeno para agilizar la evaporación.
9. Vuelva a disolver el residuo grasoso en 0,5 mL de metanol al 100% y 0,5 mL de agua destilada, luego agregue 4 mL de hexanos al 100%.

10. Coloque en el vortex por **1 minuto**.
11. Centrifuge a 3500 rpm (2740 x g) por **10 minutos** a una temperatura de 10°C (50°F).
12. Remueva completamente los hexanos (capa superior) usando una pipeta tipo Pasteur.
13. Tome una alícuota de 0,5 mL de la capa de agua-metanol y disuélvala en 2 mL del diluyente de la muestra.
14. Coloque en el vortex durante **1 minuto**.
15. Use este material reconstituido directamente en la prueba (100 µL por micropocillo).

NOTA: Debido a que los quesos fueron diluidos durante la extracción en una proporción de 1:5, los valores estimados deben ser multiplicados por 5 con el fin de obtener el resultado en ppt de aflatoxina M₁ por gramo de queso.

Por ejemplo, si la lectura estimada es de 10 ppt, esto se refiere al nivel en el queso. Para calcular la cantidad en el queso, se debe multiplicar por 5:

$$10 \text{ ppt} \times 5 = 50 \text{ ppt/g de queso}$$

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Permita que todos los reactivos alcancen una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F) antes de usarlos. Todos los estándares y muestras deben trabajarse en micropocillos por duplicado. Esto se logrará transfiriendo los estándares y muestras desde un micropocillo marcado en rojo hasta dos micropocillos recubiertos con anticuerpos.

1. Retire 1 micropocillo de mezclado marcado con rojo para cada muestra a analizar más 6 micropocillos para controles marcados en rojo y colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Retire 2 micropocillos recubiertos con anticuerpo por cada micropocillo marcado en rojo a ser usado. Devuelva inmediatamente a la bolsa de aluminio con desecante aquellos micropocillos recubiertos con anticuerpo que no vaya a utilizar. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio para proteger el anticuerpo. Marque un extremo de la tira reactiva con “1” y colóquela dentro del micropocillo y luego en el estante para micropocillos con el extremo marcado al lado izquierdo. No marque el interior ni el fondo de los micropocillos.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo su frasco de reactivo antes de su uso.
4. Utilizando una punta de pipeta nueva para cada uno, transfiera 250 µL de controles y extractos de muestra a los micropocillos marcados en rojo como se muestra abajo.

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Tira 1
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	--------

5. Utilizando una pipeta de 12 canales, transfiera 100 µL de los micropocillos de mezclado mostrados arriba a 2 micropocillos recubiertos con anticuerpo como se muestra abajo

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Tira 1
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	--------

0	5	15	30	60	100	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Tira 2
---	---	----	----	----	-----	----	----	----	----	----	----	--------

6. Coloque el estante para micropocillos en un agitador automático para placas (~600 rpm) y permita un continuo agitación durante **20 minutos** a una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F). Deseche los micropocillos de mezclado marcados en rojo.
7. Sacuda los micropocillos para retirar su contenido. Llene cada micropocillo con solución diluida de tampón de lavado, retire su contenido y sacúdalos. Repita este paso de lavado 5 veces, luego invierta los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente y golpéelos ligeramente hasta eliminar todo el exceso de solución de lavado.
8. Vierta el volumen necesario de conjugado del frasco con etiqueta azul a un bote de reactivo con etiqueta azul.
9. Utilizando una pipeta de 12 canales y puntas de pipeta nuevas, cebe las puntas y transfiera 100 µL de conjugado dentro de los micropocillos.
10. Coloque el estante de micropocillos en un agitador automático de placas (~600 rpm) y permita un agitación continuo durante **10 minutos** a una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).

11. Sacuda el contenido de los micropocillos. Llene los micropocillos con solución diluida tampón de lavado, sacuda el contenido. Repita este paso de lavado 5 veces, luego invierta los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente y golpéelos ligeramente hasta eliminar todo el exceso de solución de lavado.
12. Vierta el volumen necesario de sustrato del frasco con etiqueta verde a un bote de reactivo con etiqueta verde.
13. Utilizando una pipeta de 12 canales con puntas nuevas, cebe las puntas y transfiera 100 μ L del sustrato en los micropocillos.
14. Coloque el estante de micropocillos en un agitador automático (~600 rpm) y permita un continuo agitación por **15 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
15. Deseche el sustrato restante y enjuague el bote de reactivo con agua.
16. Vierta la solución detenedora Red Stop de la botella con etiqueta roja en un bote de reactivo marcado en rojo.
17. Saque el exceso de sustrato de la pipeta de 12 canales, cebe las puntas y transfiera 100 μ L de solución detenedora Red Stop a cada uno de los micropocillos. Mezcle los micropocillos deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche las puntas.
18. Limpie la parte exterior de los micropocillos con un paño seco y lea los resultados en un lector de micropocillos con filtro de 650 nm. Se deben eliminar las burbujas de aire pues podrían afectar los resultados analíticos. Los resultados deberán leerse dentro de los **20 minutos** después de la adición de la solución detenedora Red Stop.
19. Lea y calcule los resultados usando el lector de micropocillos de Neogen o un lector de tiras equivalente. Si usa un lector de tiras, calcule los resultados usando el software Veratox para Windows® de Neogen.

REPETICIÓN DE LA PRUEBA

Si usted obtiene resultados positivos en productos no analizados previamente, confírmelos mediante otro método aprobado antes de tomar alguna medida.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Reactividad-cruzada: Aflatoxina M_1 100%. Aflatoxina B_1 , B_2 , G_1 , G_2 y $M_2 < 1\%$.

Límite de detección: 4,3 ppt (Determinado por el promedio de 10 muestras libres de aflatoxina M_1 más 2 desviaciones estándar.)

Límite de la cuantificación: 5 ppt (Descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración en que esta prueba puede detectar con veracidad la aflatoxina M_1 .)

Rango de la cuantificación: 5–100 ppt (Para muestras de cuantificación por encima de 100 ppt, contacte al Departamento de Servicios Técnicos de Neogen para obtener las instrucciones de dilución.)

Matrices validadas: Leche cruda líquida, leche descremada en polvo, leche entera en polvo, queso y mantequilla.

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 la ficha de seguridad para este kit y para todos los kits analíticos de Neogen en 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 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 comercialización de este producto o del rendimiento del mismo para ningún propósito. Neogen no será 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 cocidas



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

Narezzi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402

Tel: +55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogen.com