

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®]

for T-2/HT-2

Quantitative Test

Refrigerate at 2–8°C • Do not freeze

THE TOXINS

T-2/HT-2 toxins are trichothecene mycotoxins produced by several species of *Fusarium* molds. As T-2 toxin is readily metabolized to HT-2 toxin, and the toxins have been shown to produce numerous adverse effects on many animals, these two mycotoxins are frequently evaluated together.

Animals affected by the toxins include swine, dairy cattle, poultry, dogs, cats and horses. Effects of the toxins include digestive disorders, hemorrhage, edema, oral lesions, dermatitis, and blood disorders. Damage caused by the toxins to the digestive track is irreversible. In the most severe cases, these toxins will cause death. T-2 toxin is the principal causal toxin in the human disease alimentary toxic aleukia.

Poultry studies have shown T-2 intoxication has led to a reduction in weight gain and other problems such as beak lesions, poor feathering, motor function impairment and increased susceptibility to *Salmonella* spp.

The best protection against these mycotoxins is monitoring for their presence in feeds and foods. That means testing all along the pathway from initial harvest of grains to the finished product.

INTENDED USE

The Veratox[®] for T-2/HT-2 test kit is a competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (CD-ELISA) for the quantitative analysis of T-2/HT-2 toxins in such commodities as corn, barley, oats, rice, rye, soy and wheat.

INTENDED USER

The test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with food and feed possibly contaminated by T-2 and/or HT-2 toxins. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has successfully completed the Neogen training.

ASSAY PRINCIPLES

Veratox for T-2/HT-2 is a competitive direct ELISA in a microwell format that allows the user to obtain exact concentrations in parts per billion (ppb) of either T-2, HT-2 or a combination of both. Free T-2 or HT-2 toxins in the samples and controls are allowed to compete with enzyme-labeled HT-2 toxin (conjugate) for the antibody binding sites. After a wash step substrate is added, which reacts with the bound conjugate to produce blue color. More blue color means less T-2/HT-2 toxins. 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 T-2/HT-2 toxins.

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. 48 antibody-coated microwells
2. 48 red-marked mixing wells
3. 5 yellow-labeled bottles of 0, 25, 50, 100 and 250 ppb T-2 toxin controls (see precautions for handling of methanol solution)
4. 1 blue-labeled bottle of HT-2 toxin-HRP conjugate solution
5. 1 green-labeled bottle of K-Blue[®] Substrate solution
6. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution
7. Directions for use

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Extraction materials (items c through e are available in kit form, Neogen item 8052):
 - a. 70% methanol (ACS Grade) (Neogen item 8055, 8056)
 - b. 250 mL graduated cylinder (Neogen item 9368)
 - c. Container with 125 mL capacity (Neogen item 9428)
 - d. Neogen filter syringes, Whatman no. 1 filter paper, or equivalent (Neogen items 9420, 9430)
 - e. Sample collection tubes (Neogen item 9421)
2. Agri-Grind grinder or equivalent (Neogen item 9401, 9453)
3. Scale capable of weighing 2–25 grams (Neogen item 9427)
4. Microwell reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
5. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
6. Pipettor, 100 μ L (Neogen item 9272, 9290)
7. Pipette tips for 100 μ L and 12-channel pipettors (Neogen items 9410, 9407, 9417)
8. Paper towels or equivalent absorbent material
9. Plastic bucket for use as waste receptacle
10. Microwell holder (Neogen item 9402)
11. Timer (Neogen item 9426)
12. Waterproof marker
13. Wash bottle (Neogen item 9400)
14. 2 reagent boats for 12-channel pipettor (Neogen item 9450)
15. Distilled or deionized water

PRECAUTIONS

1. Methanol solution is highly flammable. Keep container tightly closed, and keep away from heat, sparks, open flame and those smoking. It is 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 a kit with one serial number with reagents from a kit with a different serial number.
5. Do not run more than 24 wells at one time.
6. Follow proper pipetting techniques, including the proper priming of tips.
7. Incubation times other than those specified may give inaccurate results.
8. Kits should be at room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.
9. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
10. Treat all used liquids, including sample extract, and labware as if contaminated with T-2 or HT-2 toxins. Gloves and other protective apparel should be worn at all times.
11. To avoid cross-contamination, use clean pipette tips and glassware for each sample, and thoroughly detoxify and wash all glassware between samples.
12. Commodity extracts should have a pH of 6–8 before testing. Excessively acidic or alkaline samples should be adjusted. For instructions on adjusting pH contact a Neogen representative or Technical Services.

PROCEDURAL NOTES

1. **Substrate:** K-Blue Substrate is ready for use. The substrate should be clear to a very 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. **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. The sample should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction. Store samples at 2–8°C (35–46°F) until analyzed. **NOTE:** If using Neogen's Mycotoxin Extraction Kit, follow the instructions in that kit for the extraction procedure. If preparing your own extraction solution, continue with the instructions that follow.

1. If not using Neogen's prepared solution, prepare a 70% methanol solution by mixing 7 parts ACS grade methanol with 3 parts deionized or distilled water for each sample to be tested.
2. Obtain a representative sample. Grind the entire sample so at least 75% of the ground material passes through a 20 mesh sieve, the particle size of a fine instant coffee.
3. Extract at a ratio of 1 part sample with 5 parts 70% methanol. **EXAMPLE:** Add 5 g of ground sample to 25 mL of 70% methanol/water and shake vigorously for **3 minutes**, or blend for **2 minutes**.
4. Filter the extract by pouring at least 5 mL through a Whatman no. 1 filter (or Neogen filter syringe) and collecting the filtrate as a sample.
5. Dilute the filtrate 1:1 (e.g., 1 mL in 1 mL) with deionized or distilled water and mix.
6. The sample is now ready for testing without further preparation.

TEST PROCEDURE (FOR QUANTITATION)

Allow reagents to warm to room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.

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 that will not be used immediately to the foil pack with desiccant and reseal the 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.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Place 100 µL of conjugate from the blue-labeled bottle in each red-marked mixing well.
5. Using a new pipette tip for each, transfer 100 µL of controls and samples to the red-marked mixing wells as shown below:

0	25	50	100	250	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Strip 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Strip 2

6. Using a 12-channel pipettor, mix the liquid in the wells by pipetting it up and down 3 times. Transfer 100 µL to the antibody-coated wells. Incubate **5 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F), mixing for the first **10–20 seconds** by sliding back and forth on a flat surface. Discard the red-marked mixing wells.
7. The initial reaction is now complete. Shake out the contents of the antibody wells.
8. Fill each antibody well with deionized or distilled water and dump them out. Repeat this step 5 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until the remaining water has been removed.
9. Pipette the needed volume of substrate from the green-labeled bottle into the green-labeled reagent boat and, with new tips, pipette 100 µL of substrate into the wells. Incubate **5 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F), mixing for the first **10–20 seconds** by sliding back and forth on a flat surface. Discard remaining substrate and rinse the reagent boat with water.
10. Pipette Red Stop solution from the red-labeled bottle (same volume as prepared for substrate) into the red-labeled reagent boat. Using the same pipette tips as were used to dispense substrate, add 100 µL Red Stop to each well and mix by sliding back and forth on a flat surface. Discard the tips.
11. 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.
12. Read and calculate results using Neogen's Stat Fax microwell reader, or equivalent. If using an EL301 reader or other strip/plate reader, calculate results using Neogen's Veratox software for Windows.

TEST PROCEDURE (FOR SCREENING)

Allow reagents to warm to room temperature (18–30°C, 64–86°F), prior to use.

1. Remove 1 red-marked mixing well for each sample to be tested plus 1 red-marked well for the control, and place in the well holder.
2. Remove an equal number of antibody-coated wells. Return antibody wells that will not be used immediately to the foil pack with desiccant and reseal the 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.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Place 100 µL of conjugate from the blue-labeled bottle in each red-marked mixing well.
5. Choose one control level to screen samples against for each test performed. Using a new pipette tip for each, transfer 100 µL of the samples and chosen control to the red-marked mixing wells as shown below. Thoroughly mix the sample and control with the conjugate as you add them to the well by depressing the plunger 5 times. Do not use more than 6 wells at one time.

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

6. Using a new tip for each, transfer 100 µL from each mixing well to the corresponding antibody-coated well. Mix by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface for **10–20 seconds** without splashing the reagents from the wells. Incubate **5 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F), mixing for the first **10–20 seconds** by sliding back and forth on a flat surface.
7. The initial reaction is now complete. Shake out the contents of the antibody wells.
8. Fill each antibody well with distilled or deionized water and dump them out. Repeat this step 5 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until the remaining water has been removed.
9. Pipette 100 µL of substrate into each well. Incubate **5 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F), mixing for the first **10–20 seconds** by sliding back and forth on a flat surface.
10. Pipette 100 µL Red Stop to each well and mix by sliding back and forth on a flat surface. Discard tip.
11. Wipe the bottom of the microwells with a dry cloth or towel.
12. Microwells may be read visually or using a 650 nm filter. If the sample well is blue or more blue than the control well, the sample contains less toxin than the control. If the sample well shows less blue color (more red color) than the control, the sample contains more toxin than the control. For optimum observation of color differences, place the wells on a white surface and read looking down through the solution.

RETESTING

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of detection: < 10 ppb of T-2 or HT-2 or a combination of both (Determined by the mean average of 10 T-2/HT-2 toxin-free samples plus 2 standard deviations.)

Limit of quantitation: 25 ppb (Described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect T-2/HT-2 toxins.)

Range of quantitation: 25–250 ppb (For quantitating samples above 250 ppb contact Neogen Technical Services for dilution instructions.)

Validated matrix: Barley, corn, corn flour, corn gluten*, corn steep, DDGs wet cake, oats, oat hulls (whole)*, rice (brown), rice flour (white), rice gluten, rice hulls, rye, pea fiber, potato (white), soy, soybean meal, tapioca, wheat, wheat bran*, wheat flour, wheat gluten

NOTE: Neogen continues to validate new commodities. Please contact a representative for the latest validated commodity list.

Cross-reactivity: 100% T-2 toxin and 100% HT-2 toxin. No cross-reactivity with any other trichothecene mycotoxins.

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.

MSDS INFORMATION AVAILABLE

Material safety data sheets (MSDS) 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 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 of the 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*

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

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.neogeneurope.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) 5203-1198
Fax: +52 (55) 5531-1647
informacion@neogenlac.com • www.neogenlac.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 T-2/HT-2

Análisis Cuantitativo

REFRIGÉRESE A 2–8°C • NO CONGELAR

LAS TOXINAS

Las toxinas T-2/HT-2 son micotoxinas tricotecenos producidas por una variedad de especies de mohos de *Fusarium*. La toxina T-2 es metabolizada a la toxina HT-2, las toxinas han demostrado producir numerosos efectos adversos en muchos animales, estas dos micotoxinas son evaluadas conjuntamente frecuentemente.

Animales afectados por las toxinas incluyen porcinos, ganado lechero, aves de corral, perros, gatos y caballos. Los efectos de las toxinas incluyen: trastornos digestivos, hemorragias, edemas, lesiones orales, dermatitis y enfermedades sanguíneas. Los daños causados por las toxinas en el tubo digestivo son irreversibles. En los casos más graves, estas toxinas pueden causar muerte. La toxina T-2 es la toxina principal causante de la enfermedad en seres humanos llamada aleukia toxica alimentaria.

Estudios de aves de corral han demostrado que la intoxicación de T-2 ha resultado en una reducción de ganancia de peso y otros problemas tales como lesiones en el pico, plumaje escaso, deficiencia en la función motora y un incremento a la susceptibilidad de *Salmonella* spp.

La mejor protección contra estas micotoxinas es monitorear por su presencia en concentrados y comidas. Eso quiere decir realizar pruebas a lo largo del sendero desde la cosecha inicial de granos hasta el producto terminado.

PROPÓSITO DE USO

El kit de Veratox[®] para T-2/HT-2 es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas directo y competitivo (CD-ELISA) para el análisis cuantitativo de las toxinas T-2/HT-2 en productos tales como maíz, cebada, avena, arroz, centeno, soja y trigo.

USUARIO PREVISTO

El kit de prueba de Veratox ha sido diseñado para ser utilizado por personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con alimentos y concentrados posiblemente contaminados con T-2 y/o HT-2. Debido a la importancia de la técnica, los operadores deben ser capacitados por un representante de Neogen o por una persona que haya completado con éxito dicha capacitación.

FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS

Veratox para T-2/HT-2 permite que el usuario obtenga concentraciones exactas en partes por billón (ppb) de T-2, HT-2 o una combinación de las dos. El analito de T-2 o HT-2 no ligado en las muestras y en los controles puede competir con la enzima conjugada con la toxina HT-2 (conjugado) por los sitios de unión del anticuerpo. Después de un paso de lavado el sustrato es agregado, el cual reacciona con la enzima conjugada ligada desarrollando un color azul. Un azul de alta intensidad quiere decir que hay menos concentración de las toxinas T-2/HT-2 en la muestra. Esta prueba es medida mediante un lector de micropocillos proporcionando las lecturas de las densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles forman una línea estándar y las densidades ópticas de las muestras son trazadas contra esta línea estándar para calcular la concentración exacta de las toxinas T-2/HT-2.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Este kit de prueba puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se conserva refrigerado entre 2–8°C (35–46°F).

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 micropocillos tapizados con anticuerpos
2. 48 micropocillos de mezcla marcados en rojo
3. 5 frascos con etiquetas amarillas con los controles de la toxina T-2 de 0, 25, 50, 100 y 250 ppb (consulte las precauciones para la manipulación de la solución de metanol)
4. 1 frasco con etiqueta azul con la solución de conjugado de toxina HT-2-peroxidasa de rábano (HRP)
5. 1 frasco con etiqueta verde que contiene la solución de sustrato K-Blue®
6. 1 frasco con etiqueta roja de reactivo solución detenedora Red Stop
7. Folleto de instrucciones

MATERIALES REQUERIDOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Materiales para la extracción (los productos “c” a “e” están disponibles en un kit de Neogen, Producto Neogen 8052):
 - a. Solución de Metanol al 70% (Producto Neogen 8055) o metanol de calidad ACS (Producto Neogen 8056)
 - b. Probeta graduada de 250 mL (Producto Neogen 9368)
 - c. Recipiente con capacidad para 125 mL (Producto Neogen 9428)
 - d. Jeringas con filtro de Neogen, papel filtrante Whatman Nº: 1, o equivalente (Producto Neogen 9420, 9430)
 - e. Tubos para la colección de muestras (Producto Neogen 9421)
2. Triturador Agri-Grind o equivalente (Producto Neogen 9401, 9453)
3. Balanza o báscula con capacidad de 2–25 gramos (Producto Neogen 9427)
4. Lector para micropocillos con un filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
5. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
6. Pipeta, 100 µL (Producto Neogen 9272, 9290)
7. Puntas para pipetas de 100 µL y pipetas de 12 canales (Producto Neogen 9410, 9407, 9417)
8. Toallas de papel o un material absorbente equivalente
9. Balde plástico para desechar los desperdicios
10. Soporte para micropocillos (Producto Neogen 9402)
11. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
12. Marcador a prueba de agua
13. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
14. 2 botes de reactivos para las pipetas de 12 canales (Producto Neogen 9450)
15. Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

1. La solución de metanol es muy inflamable. Cierre bien el envase y manténgalo alejado del calor, chispas, llamas abiertas y personas fumadoras. Este producto es tóxico si es ingerido o el vapor es inhalado. Evite el contacto con la piel.
2. Almacene el kit de prueba a 2–8°C (35–46°F) cuando no se utilice. No lo congele.
3. No utilice los componentes de esta prueba después de su fecha de vencimiento.
4. No mezcle los reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
5. No utilice más de 24 micropocillos por prueba.
6. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas, incluyendo el cebado de las puntas
7. El usar tiempos de incubación distintos a los especificados puede generar lecturas erradas y resultados inexactos.
8. Permita que los kits alcancen una temperatura ambiental entre 18–30°C (64–86°F) antes de utilizarlos.
9. Evite el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente de los kits de prueba..
10. Trate todo los líquidos usados, incluyendo el extracto de la muestra y los materiales de laboratorio como si estuvieran contaminados con las toxinas T-2 o HT-2. Siempre utilice guantes y demás prendas protectoras.
11. Para evitar las contaminaciones cruzadas, utilice material de vidrio y puntas de pipeta limpias para cada muestra y lave el material de vidrio escrupulosamente entre un muestra y la siguiente.
12. Los extractos de los productos deben tener un pH de 6–8. Las muestras excesivamente ácidas o alcalinas deben ser ajustadas. Por favor contacte a su representante de Neogen o al Dpto. de Servicios

Técnicos para obtener instrucciones acerca del ajuste del pH.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato:** El sustrato K-Blue está listo para uso. El sustrato debe aparecer transparente—deséchelo si se ha tornado azul. Vierta sólo el volumen necesario de sustrato en el 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. **Micropocillos cubiertos 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 extraer las muestras y cuando el procedimiento de análisis esté listo para empezar.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

La recolección de la muestra debe realizarse siguiendo las técnicas de muestreo aceptadas. La muestra deberá ser triturada y mezclada completamente antes de proceder con la obtención del extracto. Almacene las muestras a 2–8°C (35–46°F) hasta que sean analizadas. **NOTA:** Si está utilizando el Kit de Extracción de Micotoxinas de Neogen, siga las instrucciones proporcionadas con el kit para el procedimiento de extracción. Si está preparando su propia solución de extracción, siga las instrucciones que aparecen continuación.

1. Si Ud. no está utilizando la solución preparada de Neogen, prepare una solución de metanol al 70% mezclando 7 partes de metanol de calidad ACS con 3 partes de agua destilada o desionizada para cada muestra a analizar.
2. Obtenga una muestra representativa. Triture toda la muestra de manera que al menos un 75% del material triturado pase a través de un tamiz de malla 20. Debe asemejarse al tamaño de grano del café instantáneo fino.
3. Obtenga un extracto en una proporción de 1 parte de muestra por 5 partes de metanol al 70%. **EJEMPLO:** Combine 5 g de muestra triturada con 25 mL de solución de metanol al 70%/agua y agítela vigorosamente por **3 minutos** o mezclela por **2 minutos**.
4. Filtre el extracto, vertiendo al menos 5 mL a través de un filtro Whatman N°: 1 (o una jeringa con filtro de Neogen), y recoja el líquido filtrado como muestra.
5. Diluya el líquido filtrado a una proporción de 1:1 (por ejemplo, 1 mL en 1 mL) con agua destilada o desionizada y mézclelo.
6. La muestra está lista para el análisis sin necesidad de más preparativos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA (PARA CUANTIFICACIÓN)

Permita que los reactivos alcancen una temperatura ambiental entre 18–30°C (64–86°F) antes de utilizarlos.

1. Retire un micropocillo de mezcla marcado en rojo por cada muestra a probar, además de 5 micropocillos marcados en rojo para los controles, y colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Retire la misma cantidad de micropocillos cubiertos con anticuerpo. Devuelva inmediatamente al papel metálico con desecante los micropocillos con anticuerpos que no vaya a utilizar. Selle la bolsa de aluminio para proteger los anticuerpos. Marque un extremo de la tira con un “1”, y coloque la tira en el estante para micropocillos con el extremo que está marcado hacia el lado izquierdo. No marque el interior ni el fondo de los micropocillos.
3. Mezcle cada reactivo agitando vigorosamente su frasco de utilizarlo.
4. Vierta 100 µL de conjugado del frasco con la etiqueta azul en cada micropocillo de mezcla marcado en rojo.
5. Utilizando una nueva punta de pipeta para cada uno de los micropocillos, transfiera 100 µL de los controles y muestras a los micropocillos de mezcla marcados en rojo según se indica a continuación.

0	25	50	100	250	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2
6. Mediante el uso de una pipeta de 12 canales, mezcle el líquido pipeteándolo hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Transfiera 100 µL a los micropocillos tapizados con anticuerpo. Incúbelos por **5 minutos** a temperatura ambiental entre 18–30°C (64–86°F), y mezcle el contenido de los micropocillos durante los primeros **10–20 segundos** deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche los micropocillos de mezcla marcados en rojo.
7. Se ha completado la reacción inicial. Sacuda los micropocillos con anticuerpo para expulsar su contenido.
8. Llene cada micropocillo con agua destilada o desionizada y vacíelos. Repita este paso 5 veces.

Elimine el exceso agua invirtiendo los micropocillos y golpeándolos sobre una toalla absorbente hasta eliminar toda el agua.

- Pipetee el volumen necesario de sustrato de la botella con la etiqueta verde en el bote de reactivos con una etiqueta verde. Luego, usando puntas nuevas, pipetee 100 µL de sustrato a los micropocillos. Incúbelos durante **5 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F), y mezcle el contenido de los micropocillos durante los primeros **10–20 segundos** deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche el sustrato restante y enjuague el bote de reactivos con agua.
- Pipetee la solución detenedora Red Stop, de la botella con la etiqueta roja, (el mismo volumen que se preparó para el sustrato) en el bote de reactivos con la etiqueta roja. Las mismas puntas de pipeta pueden ser utilizadas para verter el sustrato, agregue 100 µL de la solución detenedora (Red Stop) a cada micropocillo y mezcle su contenido deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche las puntas.
- Pase una toalla desechable o un paño seco por el exterior de los micropocillos y lea el resultado en un lector de micropocillos utilizando un filtro de 650 nm. Elimine las burbujas de aire pues pueden perjudicar los resultados analíticos. Los resultados deberán leerse dentro de los 20 minutos siguientes a la adición de la solución detenedora Red Stop.
- Lea y calcule los resultados mediante el lector de micropocillos de Neogen o su equivalente. Si utiliza un lector EL301 u otro lector de placas/tiras, calcule los resultados mediante el software Veratox de Neogen para Windows.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Permita que los reactivos alcancen una temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F) antes de utilizarlos.

- Retire un micropocillo de mezcla marcado en rojo por cada muestra a probar, además de un micropocillo marcado en rojo para el control, y colóquelos en el estante para micropocillos.
- Retire la misma cantidad de micropocillos tapizados con anticuerpo. Retorne los micropocillos que no vaya a usar a la bolsa de aluminio con el paquete desecante inmediatamente. Selle la bolsa de aluminio para proteger los anticuerpos. Marque un extremo de la tira con un “1”, y ponga la tira en el soporte para micropocillos con el extremo que está marcado hacia el lado izquierdo. No marque la parte de adentro o la parte inferior de los micropocillos.
- Mezcle cada reactivo agitando su botella vigorosamente antes de utilizarlo.
- Vierta 100 µL de conjugado de la botella con la etiqueta azul en cada micropocillo de mezcla marcado en rojo.
- Elija un nivel de control que sirva como un punto de referencia para cada muestra a probar. Utilizando una nueva punta de pipeta para cada muestra, transfiera (como se describe a continuación) 100 µL de las muestras y el control elegido a los micropocillos de mezcla marcados en rojo. Al agregar la muestra y el control al micropocillo, mézclelos pipeteando de arriba hacia abajo 5 veces. No trabaje con más de 6 micropocillos a la vez.

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

- Utilizando una nueva punta de pipeta para cada una, transfiera 100 µL de cada micropocillo de mezcla al micropocillo correspondiente tapizado con anticuerpo. Mezcle su contenido deslizando el soporte para micropocillos por **10–20 segundos** de atrás hacia adelante sobre una superficie plana, evitando derramar o salpicar los reactivos contenidos en los micropocillos. Incúbelos por **5 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F), y mezcle el contenido de los micropocillos durante los primeros **10–20 segundos** deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
- Se ha completado la reacción inicial. Sacuda los micropocillos con anticuerpos para expulsar su contenido.
- Llene cada micropocillo con agua destilada o desionizada y vacíelos. Repita este proceso 5 veces. Elimine el exceso agua invirtiendo los micropocillos y golpeándolos ligeramente sobre una toalla de papel absorbente hasta eliminar toda el agua.
- Pipetee 100 µL de sustrato en cada micropocillo. Incúbelos por **5 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F), y mezcle el contenido de los micropocillos durante los primeros **10–20 segundos** deslizándolos de atrás hacia adelante sobre una superficie plana.
- Pipetee 100 µL de la solución detenedora Red Stop en cada uno de los micropocillos y mezcle su contenido deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche la punta.
- Pase una toalla de papel absorbente o un paño seco por el exterior de los micropocillos.
- Los micropocillos se pueden leer visualmente o utilizando un filtro de 650 nm. Si la totalidad del micropocillo de la muestra es azul o es más azul que la del micropocillo de control, la muestra

contiene menos toxina que el control. Si la tonalidad del micropocillo de la muestra es menos azul (o muestra más color rojo) que la del micropocillo de control, la muestra contiene más toxina que el control. Para una observación óptima de las diferencias de color, coloque los micropocillos sobre una superficie blanca y lea el resultado mirando hacia abajo a través de la solución.

REPETICIÓN DEL ANÁLISIS

Si Ud. obtiene resultados positivos en productos no analizados previamente, confírmelos mediante otro método aprobado antes de tomar medidas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección: < 10 ppb de T-2 o HT-2 o una combinación de las dos (determinado por la media aritmética de 10 muestras de T-2/HT-2 libres de toxinas más 2 desviaciones estándar.)

Límite de la cuantificación: 25 ppb (descrito como el punto de concentración más bajo de la curva de calibración que esta prueba puede detectar con fiabilidad de las toxinas T-2/HT-2.)

Intervalo de la cuantificación: 25–250 ppb (para cuantificar muestras con más de 250 ppb, solicite las instrucciones de dilución a los Servicios Técnicos de Neogen).

Matrices validadas: Cebada, maíz, harina de maíz, harina de gluten de maíz*, maíz remojado*, grano seco usado en destilería con solubles, avena, cascarillas de avena (enteras)*, arroz integral, harina de arroz (blanca), gluten de arroz, cascarillas de arroz, centeno, fibra de arvejas, papas blancas, soja, harina de granos de soja, tapioca, cassava o mandioca, trigo, salvado de trigo*, harina de trigo, gluten de trigo.

**Es posible que requieran un ajuste del pH.*

NOTA: Neogen continúa realizando validaciones para nuevos productos. Por favor contactar a su Representante de Neogen para obtener la lista actualizada de productos validados.

Reactividad cruzada: 100% toxina T-2 y 100% toxina HT-2. No existe reactividad cruzada con ninguna otra micotoxina tricóteseno.

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE

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

DISPONIBILIDAD DE LAS FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES (MSDS)

Ud. puede obtener las fichas de seguridad de los materiales para esta prueba analítica y para todos los kits de prueba 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 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), ocratoxina, zearalenona, toxinas T-2/HT-2, fumonisina, histamina

Bacterias presentes en los alimentos

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

Saneamiento

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

Alérgenos en alimentos

- Almendras, huevos, gliadina, avellana, lupino, leche, mostaza, maní, ajonjolí, crustáceos, soja, nuez de nogal

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, alimentos 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 Scotland, UK

+ 44 (0) 1292 525 600 • Fax: + 44 (0) 1292 525 601

info_uk@neogeneurope.com • www.neogeneurope.com

México

Neogen Latinoamérica

Prolongación 5 de Mayo #27 • Col. 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.neogenlac.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