

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®] **for Histamine Tuna Pack**

REFRIGERATE at 2–8°C (35–46°F). DO NOT FREEZE



HISTAMINE

High levels of histamine may develop in a variety of fish species as they decompose. These species include tuna, mahi-mahi, marlin, bluefish, sardines, anchovy, bonito, herring and mackerel. Ingestion of histamine may cause scombroid poisoning in humans, which may lead to a variety of symptoms, including rash, nausea, vomiting, diarrhea, hypotension, palpitations and muscle weakness. Paralysis and death have also been reported in cases of scombroid poisoning.

Because of its potential for human illness, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) has ruled that extensive refrigeration records and/or histamine testing must be included in a hazard analysis and critical control point (HACCP) program for relevant fish species. The FDA has set an action level of 50 parts per million (ppm) for histamine in domestic and imported fish.

INTENDED USE

Veratox for Histamine Tuna Pack is intended for the quantitative analysis of histamine in scombroid species of fish, such as tuna, bluefish and mahi-mahi, fish meal, and dry animal protein.

INTENDED USER

The test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with histamine analysis in fish. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has completed Neogen training.

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.

ASSAY PRINCIPLES

Veratox for Histamine is a competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (CD-ELISA) that allows the user to obtain exact concentrations of histamine in parts per million (ppm). Free histamine in the samples and controls is allowed to compete with enzyme-labeled histamine (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 histamine. 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 histamine.

MATERIALS PROVIDED

1. 48 12-well antibody-coated microwell strips
2. 48 12-well red-marked mixing well strips
3. 24 yellow-labeled bottles (4 bottles each of 0, 2.5, 5, 10, 20 and 50 ppm histamine controls)
4. 4 blue-labeled bottles of histamine-HRP conjugate solution
5. 8 foil pouches of sample extract diluent buffer concentrate of 10 mM PBS dry powder
6. 4 foil pouches of wash buffer concentrate of 10 mM PBS-Tween
7. 4 green-labeled bottles of K-Blue[®] Substrate solution
8. 4 red-labeled bottles of Red Stop solution

MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Veratox for Histamine Extraction Kit (Neogen item 9510)—Contains 38 bottles, 38 filter syringes and 38 tubes
2. Disposable bottles with 125 mL capacity (Neogen item 9398)
3. Filter syringes for histamine (Neogen item 9420H), Whatman #1 filter paper (Neogen item 9430), centrifuge or equivalent
4. Sample collection tubes (Neogen item 9421, 9421B)
5. 100 mL graduated cylinder
6. Blender
7. Test tube rack (Neogen item 9440)
8. Tubes, 15 mL, graduated (Neogen item 9474)
9. Scale capable of weighing 10–50 grams (Neogen item 9427)
10. Microwell strip reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
11. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
12. Pipettor, 100 μ L (Neogen item 9272)
13. Tips for 12-channel and 100 μ L pipettors (Neogen item 9410, 9407, 9417)
14. Paper towels or equivalent absorbent material
15. Microwell holder (Neogen item 9402)
16. Timer (Neogen item 9426)
17. Waterproof marker
18. Wash bottle (Neogen item 9400)
19. 1 L bottle with lid (Neogen item 9472)
20. 2 reagent boats for 12-channel pipettor (Neogen item 9435)
21. Distilled or deionized water

PRECAUTIONS

1. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use.
2. Do not use kit components beyond expiration date.
3. Glassware should not be used for extraction purposes. Histamine may adhere to glass, therefore using glassware may affect test results.
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 per test.
6. Follow proper pipetting techniques, including priming tips by filling and dispensing solution once before use.
7. Use of incubation times other than those specified may give inaccurate results.
8. Kits should be brought to 18–30°C (64–86°F) prior to use.
9. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
10. Do not freeze test kits.
11. To avoid cross-contamination, use clean pipette tips for each sample.
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 Neogen.

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. **Controls.** Six controls are provided with this kit. Neogen recommends using a combination of at least 5 controls with each assay. This combination may vary. One possible combination is to eliminate the 5 ppm control, to yield full quantitative test results in the range of 2.5 to 40 ppm. Another possibility is to eliminate the 2.5 ppm control to yield results in the range of 5 to 40 ppm. All 6 controls may be used with a microwell reader for full quantitation of histamine in the range of 2.5 to 40 ppm. If needed, contact Neogen for more information on the use of controls.
3. **Sample extract diluent buffer.** Prepare by adding foil pouch of extract buffer (10 mM PBS) to 1 L of distilled or deionized water. Swirl to mix. Label bottle appropriately. Store remaining buffer covered at room temperature.
4. **Wash buffer.** Prepare by adding one foil pouch of wash buffer concentrate (10 mM PBS-Tween) to 1 L of distilled or deionized water. Swirl to mix. Do not shake. Label bottle appropriately. Store remaining wash buffer at room temperature.
5. **Antibody wells.** Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after the samples are extracted, and the test procedure is set to begin.

SAMPLE PREPARATION

- A. **Canned and pouched tuna: AOAC 937.07b**
Place entire contents of can or pouch (meat and liquid) into a blender. Blend until homogenous. Store samples at 2–8°C (35–46°F) until analyzed.
- B. **Fresh or thawed frozen raw fish: AOAC 937.07a**
Clean and eviscerate three fish. Cut three cross-sectional pieces 2.5 cm (1 inch) thick, from back of the pectoral fin, halfway to vent and one posterior to the vent. Debone slices and blend or grind combined samples until homogenous. Store samples at 2–8°C (35–46°F) until analyzed.
- C. **Dry Samples (example: Fishmeal)**
The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques and be representative of the lot. After homogenization, grind part of the sample (minimum of 200 g) so at least 95% of the ground material passes through a 20 mesh sieve (about the particle size of fine espresso).

SAMPLE EXTRACTION

If using Neogen's Veratox for Histamine Extraction Kit (Neogen item #9510), follow the instructions in that kit. Otherwise, continue with the instructions that follow. **NOTE:** Glassware should not be used for extraction purposes as histamine may adhere to the glass.

Liquid/Wet Samples

1. Add **10 g** of the homogenous mixture to a clean disposable extraction bottle containing **90 mL** of distilled or deionized water.
2. Tightly cap and vigorously shake the bottle for **15-20 seconds** in order to suspend the fish tissue in the water.
3. Wait approximately **5 minutes**, then shake the bottle for **15-20 seconds** in order to re-suspend the fish tissue.
4. Wait an additional **5 minutes**, and again shake the bottle for **15-20 seconds** in order to re-suspend the fish tissue. Allow the tissue to settle to the bottom of the bottle for about **30 seconds**.
5. If necessary, filter the contents through folded filter paper or a histamine filter syringe (Neogen #9420H) into a clean container. The sample is now ready for extract dilution.

ALTERNATIVE: Centrifuge the sample and use the clear supernatant as the sample for extract dilution.

Dry Samples

1. Add **10 g** of the homogenous mixture to a clean disposable extraction bottle containing **100 mL** of distilled or deionized water.
2. Tightly cap and vigorously shake the bottle for **15-20 seconds** in order to suspend the sample in the water.
3. Wait approximately **5 minutes**, then shake the bottle for **15-20 seconds** in order to re-suspend the sample.
4. Wait an additional **5 minutes**, and again shake the bottle for **15-20 seconds** in order to re-suspend the sample. Allow the sample to settle to the bottom of the bottle for about **30 seconds**.
5. If necessary, filter the contents through folded filter paper or a histamine filter syringe (Neogen #9420H) into a clean container. The sample is now ready for extract dilution.

ALTERNATIVE: Centrifuge the sample and use the clear supernatant as the sample for extract dilution.

SAMPLE EXTRACT DILUTION

Because of the sensitivity of the ELISA format, the sample extract must be diluted before performing the test (see **Procedural Note 3** for preparing the sample extract diluent buffer).

1. Add 10 mL of sample extract diluent buffer to a clean test tube or bottle.
2. Using a clean pipette tip, add 100 μ L of the extract to the sample extract diluent buffer. Gently swirl to mix.
3. The sample is now ready to test. Repeat for all samples.

NOTE: For optimal performance with expected results greater than 40 ppm, a further dilution of the sample extract using extract diluent buffer is recommended. Begin with a 1:1 dilution, repeating dilution and retesting if necessary until the new result (prior to application of the dilution factor) is less than 40 ppm. Corrected values require multiplying by 2x for total X repetitions of these additional 1:1 dilutions. Samples should be tested within 4 hours of extraction.

TEST PROCEDURE

Allow all reagents to warm to 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. 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 on the inside or bottom of the wells.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Add 100 μ L of conjugate from the blue-labeled bottle to each red-marked mixing well.
5. The controls (see **Procedural Note 2**) are supplied ready to use—do not dilute. Using a new pipette tip for each, transfer 100 μ L of controls and diluted samples to the red-marked mixing wells as shown:

If concerned about histamine levels between 2.5 and 40 ppm:

0	2.5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Strip 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Strip 2

If concerned about histamine levels between 5 and 40 ppm:

0	5	10	20	50	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 up and down 3 times. Transfer 100 μ L to the antibody-coated wells.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F) mixing for the first **10–20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface without splashing

reagents from the wells. Discard red-marked mixing wells.

8. Shake out the contents of the antibody wells. Fill each antibody well with diluted wash buffer and dump them out. Repeat this step 3 times, then turn the wells upside down and tap out the remaining liquid on an absorbent towel.
9. Pour the needed volume of substrate from the green-labeled bottle into the green-labeled reagent boat, and with new tips on the 12-channel pipettor, pipette 100 μ L of substrate into the wells.
10. Incubate for **10 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.
11. Pour Red Stop solution from the red-labeled bottle (same volume as substrate) into the red-labeled reagent boat. Using the same pipette tips on the 12-channel pipettor as were used to dispense substrate, add 100 μ L Red Stop to each well and mix by sliding back and forth on a flat surface. Discard the tips.
12. Wipe the bottom of the microwells with a dry cloth or towel and read in a microwell reader using a 650 nm filter and Neogen Veratox software comparing the standard curve to calculate results. Air bubbles should be eliminated, as they could affect analytical results. Results should be read within 20 minutes of completion of the test.
13. All materials are safe to be disposed of in the trash.

RETESTING

If positives occur in commodities not previously tested, confirm with an additional approved method prior to taking action. Results between 2.5 and 40 ppm are quantitative. For optimal performance, results of greater than 40 ppm should be diluted 1:1 with extract diluent buffer as described in the **Sample Extract Dilution** section.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of detection: 2 ppm (determined by the mean average of 10 histamine free samples plus 3 standard deviations)

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

Range of quantitation: 2.5–40 ppm (for optimal performance, results greater than 40 ppm require a further dilution; see **Sample Extract Dilution** for further instructions.)

Validated matrices: Fresh, canned and pouched tuna in oil or water*, mahi-mahi, bluefish and fish meal.

*AOAC-R1 validated matrix

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 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*, *Salmonella enteritidis*

Sanitation

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

Food allergens

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

Genetic modification

- CP4 (Roundup Ready®)

Ruminant by-products

- Meat and bone meal, feed

Species identification

- Raw and cooked meat samples



North America

Neogen Headquarters

620 Leshar Place, Lansing, MI 48912 USA

800/234-5333 (USA/Canada) or

517/372-9200

Fax: 517/372-2006

foodsafety@neogen.com

www.neogen.com

Europe, Middle East and Africa

Neogen Europe

The Dairy School, Auchincruive, Ayr

KA6 5HU Scotland, UK

+ 44 (0) 1292 525 600

Fax: + 44 (0) 1292 525 601

info_uk@neogeneurope.com

www.neogen.com

Mexico

Neogen Latinoamérica

Prolongación 5 de Mayo #27

Col. Parque Industrial Naucalpan

Naucalpan, Estado de Mexico C.P. 53489

+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-0111,

+52 (55) 5531-2837

Fax: +52 (55) 5531-1647

informacion@neogenlac.com

www.neogen.com

Brazil

Neogen do Brasil

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João

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

Tel: +55 19 3935.3727

info@neogendobrasil.com.br

www.neogen.com

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox[®] para Histamina Prueba de Atún

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



HISTAMINA

Altos niveles de histamina se pueden desarrollar en una variedad de especies de peces a medida que se descomponen. Estas especies incluyen el atún, dorado, marlin, pez azul, sardinas, anchoas, pez bonito, arenque y caballa. La ingestión de histamina puede causar intoxicación por escombroides en los humanos, que puede conducir a una variedad de síntomas, incluyendo salpullido, náuseas, vómito, diarrea, hipotensión, palpitaciones y debilidad muscular. También se han reportado parálisis y muerte en casos de intoxicación por escombroides.

Debido a su potencial para causar enfermedades humanas, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha determinado que los registros extensivos de refrigeración y/o las pruebas de histamina deben incluirse en un sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (HACCP) para las especies relevantes. La FDA ha establecido un nivel de acción de 50 partes por millón (ppm) de histamina en pescados domésticos e importados.

USO PREVISTO

Veratox[®] para Histamina–Prueba de Atún está indicada para el análisis cualitativo de histamina en especies de peces escombroides como el atún, el pez azul, dorado, en harina de pescado y en proteína animal seca.

USUARIO PREVISTO

El kit de prueba está diseñado para ser utilizado por personal de control de calidad y otros familiarizados con el análisis de histamina en peces. Dado a que la técnica es muy importante, los operadores deben ser entrenados por un representante de Neogen o por alguien que haya completado el entrenamiento de Neogen.

ALMACENAMIENTO

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

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

Veratox para Histamina es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas-directo competitivo (ELISA-CD) que permite al usuario obtener concentraciones exactas de histamina en partes por millón (ppm). La histamina libre en las muestras y los controles compite con la histamina marcada con la enzima (conjugado) para los sitios de unión de los anticuerpos. Después de un paso de lavado se añade sustrato, que reacciona con el conjugado unido para producir color azul. Más color azul significa menos histamina. La prueba se lee en un lector de micropocillos para obtener densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles forman la curva estándar y las densidades ópticas de la muestra se trazan contra la curva para calcular la concentración exacta de histamina.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 tiras de 12 micropocillos recubiertos con anticuerpo
2. 48 tiras de 12 micropocillos para mezcla marcados en rojo
3. 24 botellas con etiquetas amarillas (4 botellas de cada control de histamina de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm)
4. 4 botellas con etiquetas azules con solución de conjugado de histamina-HRP
5. 8 bolsas de aluminio con buffer diluyente de extracto de muestra concentrado de 10 mM de PBS en polvo
6. 4 bolsas de aluminio de buffer de lavado concentrado de 10 mM de PBS-Tween
7. 4 botellas con etiquetas verdes de solución de sustrato K-Blue®
8. 4 botellas con etiquetas rojas de solución detenedora Red Stop

MATERIALES RECOMENDADOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Kit de Extracción de Veratox para Histamina (Producto Neogen 9510) – contiene 38 botellas, 38 jeringuillas con filtro y 38 tubos
2. Botellas desechables con capacidad de 125 mL (Producto Neogen 9398)
3. Jeringuilla con filtro para histamina (Producto Neogen 9420H), filtro de papel Whatman Nº 1 (Producto Neogen 9430), centrifuga o equivalente
4. Tubos para recolección de muestras (Producto Neogen 9421, 9421B)
5. Cilindro graduado de 100 mL
6. Licuadora
7. Gradilla para tubos de ensayo (Producto Neogen 9440)
8. Tubos graduados de 15 mL (Producto Neogen 9474)
9. Balanza capaz de pesar 10–50 gramos (Producto Neogen 9427)
10. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
11. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
12. Pipeta de 100 µL (Producto Neogen 9272)
13. Puntas para pipeta de 12 canales y de 100 µl (Producto Neogen 9410, 9407, 9417)
14. Toallas de papel absorbente o de un material equivalente
15. Gradilla para micropocillos (Producto Neogen 9402)
16. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
17. Marcador a prueba de agua
18. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
19. Botella de 1 L con tapa (Producto Neogen 9472)
20. 2 botes de reactivos para usar con una pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9435)
21. Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

1. Almacene el kit de prueba entre 2–8°C (35–46°F) cuando no lo utilice.
2. No utilice componentes del kit después de la fecha de vencimiento.
3. No deben utilizarse materiales de vidrio para el proceso de extracción. La histamina puede adherirse al vidrio, por lo que el uso de éstos puede afectar los resultados de la prueba.
4. No mezcle reactivos de un kit con los reactivos de otro kit con un número de serie diferente.
5. No ejecute más de 24 micropocillos por prueba.
6. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas, incluyendo la preparación de las puntas llenándolas y dispensando solución antes de usarlas.
7. El uso de tiempos de incubación distintos a los especificados pueden dar resultados inexactos.
8. Permita que el kit alcance una temperatura entre 18–30°C (68–82°F) antes de su uso.
9. Evite el almacenamiento prolongado de los kits a temperatura ambiente.
10. No congele los kits de prueba.
11. Para evitar la contaminación cruzada, utilice puntas de pipeta limpias para cada muestra.
12. Los extractos de productos deben tener un pH de 6–8 antes de la prueba. Las muestras excesivamente ácidas o alcalinas deben ser ajustadas. Por favor contacte a Neogen para obtener instrucciones sobre el ajuste del pH.

NOTAS RELATIVAS AL 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 tornado azul oscuro. Solamente vierta el volumen necesario dentro del bote de reactivos. **No regrese a la botella el sustrato que no fue utilizado.** Cubra el bote de reactivos para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
2. **Controles.** Se incluyen 6 controles con este kit. Neogen recomienda utilizar una combinación de al menos 5 controles con cada prueba. Esta combinación puede variar. Una posible combinación es eliminar el control de 5 ppm, para obtener resultados correspondientes a un análisis cuantitativo completo en el rango de 2.5 a 40 ppm. Otra posibilidad es eliminar el control de 2.5 ppm para obtener resultados en el rango de 5 a 40 ppm. Los 6 controles pueden utilizarse con un lector de micropocillos para una cuantificación completa de la histamina en el rango de 2.5 a 40 ppm. Si es necesario, contacte a Neogen para obtener más información sobre el uso de los controles.
3. **Buffer diluyente de extractos de muestras.** Prepare añadiendo una bolsa de aluminio del buffer de extractos (10 mM PBS) a 1 L de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar. No agite. Etiquete la botella apropiadamente. Almacene el buffer restante cubierto a temperatura ambiente.
4. **Buffer de lavado.** Prepare añadiendo el buffer de lavado concentrado (10 mM PBS-Tween) a 1 L de agua destilada o desionizada. Revuelva para mezclar. No agite. Etiquete la botella apropiadamente. Almacene el buffer de lavado restante cubierto a temperatura ambiente.
5. **Micropocillos recubiertos con anticuerpo.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio después de la extracción de las muestras y cuando esté listo para comenzar la prueba.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A. Atún enlatado y en bolsas: AOAC 937.07b

Coloque todo el contenido de la lata/bolsa (carne y líquido) en una licuadora. Licue hasta obtener una mezcla homogénea. Almacene las muestras a 2–8°C (35–46°F) hasta que sean analizadas.

B. Pescado crudo fresco o descongelado: AOAC 937.07a

Limpie y destripe tres pescados. Corte tres pedazos transversales de 2.5 cm (1 pulgada) de espesor, desde la parte posterior de la aleta pectoral hasta la mitad de la cavidad abdominal y un corte posterior a la cavidad abdominal. Deshuese los filetes y licue o muele las muestras juntas hasta obtener una mezcla homogénea. Almacene las muestras entre 2–8°C (35–46°F) hasta que sean analizadas.

C. Muestras secas (ejemplo: harina de pescado)

La muestra a ser analizada debe ser recolectada de acuerdo con las técnicas de muestreo aceptadas y ser representativa del lote. Después de la homogeneización, muele parte de la muestra (mínimo de 200 g) de modo que al menos el 95% del material molido pase a través de un tamiz de malla 20 (aproximadamente el tamaño de partícula de café fino).

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Si está usando el Kit de Extracción de Veratox para Histamina de Neogen (Producto Neogen 9510), siga las instrucciones de ese kit. De lo contrario, continúe con las instrucciones que siguen. **NOTA:** Los productos de vidrio no se deben utilizar para fines de extracción, ya que la histamina puede adherirse al vidrio.

Muestras líquidas/húmedas

1. Añada **10 g** de la mezcla homogénea a una botella de extracción desechable limpia que contenga **90 mL** de agua destilada o desionizada.
2. Tape bien y agite vigorosamente la botella durante **15-20 segundos** para suspender el tejido del pescado en el agua.
3. Espere aproximadamente **5 minutos**, luego agite la botella durante **15-20 segundos** para volver a suspender el tejido del pescado.
4. Espere **5 minutos** más y agite nuevamente la botella durante **15-20 segundos** para volver a suspender el tejido del pescado. Deje que el tejido se asiente en el fondo de la botella durante unos **30 segundos**.
5. Si es necesario, filtre el contenido a través de papel de filtro plegado o con una jeringuilla con filtro para histamina (Producto Neogen 9420H) en un recipiente limpio. La muestra está lista para la dilución del extracto.

ALTERNATIVA: Centrifugue la muestra y utilice el sobrenadante transparente como muestra para la dilución del extracto.

Muestras secas

1. Añada **10 g** de la mezcla homogénea a una botella de extracción desechable limpia que contenga **100 mL** de agua destilada o desionizada.
2. Tape bien y agite vigorosamente la botella durante **15-20 segundos** para suspender la muestra en el agua.
3. Espere aproximadamente **5 minutos**, luego agite la botella durante **15-20 segundos** para volver a suspender la muestra.
4. Espere **5 minutos** más y agite nuevamente la botella durante **15-20 segundos** para volver a suspender la muestra. Deje que la muestra se asiente en el fondo de la botella durante unos **30 segundos**.
5. Si es necesario, filtre el contenido a través de papel de filtro plegado o con una jeringuilla con filtro para histamina (Producto Neogen 9420H) en un recipiente limpio. La muestra está lista para la dilución del extracto.

ALTERNATIVA: Centrifugue la muestra y utilice el sobrenadante transparente como muestra para la dilución del extracto.

DILUCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS MUESTRAS

Debido a la sensibilidad del formato ELISA, el extracto de la muestra debe diluirse antes de realizar la prueba (vea la **Nota Relativa al Procedimiento N° 3** para preparar la solución diluyente de extractos de muestras).

1. Añada 10 mL del buffer diluyente de extractos de muestras en un tubo de ensayo o una botella limpia.
2. Utilizando una punta de pipeta limpia, añada 100 µL del extracto al buffer diluyente de extractos de muestras. Revuelva suavemente para mezclar.
3. La muestra está lista para ser analizada. Repita estos pasos para todas las muestras.

NOTA: Para un rendimiento óptimo con resultados esperados superiores a 40 ppm, se recomienda una dilución adicional del extracto de muestra usando el buffer diluyente de extracto. Comience con una dilución 1:1, repitiendo la dilución y análisis si es necesario hasta que el nuevo resultado (antes de la aplicación del factor de dilución) sea inferior a 40 ppm. Los valores corregidos deben ser multiplicados por 2x para un total X de repeticiones de diluciones adicionales 1:1. Se deben analizar las muestras dentro de las 4 horas después de la extracción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Permita que todos los reactivos se calienten a una temperatura entre 18–30°C (64–86°F) antes de su uso.

1. Retire 1 micropocillo para mezcla marcado en rojo para cada muestra a ser analizada, más 5 micropocillos marcados en rojo para los controles, y colóquelos en la gradilla para micropocillos.
2. Retire el mismo número de micropocillos recubiertos con anticuerpos. Devuelva inmediatamente a la bolsa de aluminio con desecante los micropocillos que no se vayan a utilizar. 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. Nunca marque los micropocillos en el interior o en la parte inferior.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo cada botella antes de su uso.
4. Pipetee 100 µL de conjugado de la botella con etiqueta azul a cada uno de los micropocillos para mezcla marcados en rojo.
5. Los controles (vea la **Nota Relativa al Procedimiento N° 2**) están listos para ser utilizados; no los diluya. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 100 µL de los controles y de muestras diluidas a los micropocillos para mezcla marcados en rojo de la siguiente manera:

Si le preocupan los niveles de histamina entre 2.5 y 40 ppm:

0	2.5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

Si le preocupan los niveles de histamina entre 5 y 40 ppm:

0	5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

6. Usando una pipeta de 12 canales con pipetas nuevas, mezcle el líquido de los micropocillos pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Transfiera 100 µL a los micropocillos recubiertos con anticuerpo.

7. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F), mezclando durante los primeros **10–20 segundos** deslizando la gradilla de micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana, sin salpicar los reactivos en los micropocillos. Deseche los micropocillos para mezcla marcados en rojo.
8. Sacuda los micropocillos para vaciar su contenido. Llene los micropocillos con buffer de lavado diluido y vacíelos. Repita este paso 3 veces, luego invierta los micropocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel absorbente para eliminar toda el agua restante.
9. Vierta el volumen necesario de sustrato de la botella con etiqueta verde en un bote de reactivos con etiqueta verde. Luego, usando puntas nuevas en la pipeta de 12 canales, pipetee 100 µL de sustrato a los micropocillos.
10. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F), mezclando durante los primeros **10–20 segundos** deslizando la gradilla de micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche el sustrato restante y enjuague el bote de reactivos con agua.
11. Vierta la solución Red Stop de la botella con etiqueta roja (mismo volumen que el sustrato) en el bote de reactivos con etiqueta roja. Usando las mismas puntas en la pipeta de 12 canales utilizadas para verter el sustrato, agregue 100 µL de la solución Red Stop a cada micropocillo y mezcle deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche las puntas.
12. Pase una toalla o paño seco por el exterior de los micropocillos y lea en un lector usando un filtro de 650 nm y el software Veratox de Neogen comparando la curva con la curva estándar para calcular los resultados. Elimine las burbujas de aire, ya que podrían afectar los resultados analíticos. Los resultados deben leerse dentro de los **20 minutos** después de completar la prueba.
13. Todos los materiales son seguros para desechar en la basura.

REPETICIÓN DE LA PRUEBA

Si se obtienen resultados positivos en productos que no se habían analizado previamente, confírmelos con un método aprobado adicional antes de tomar acción. Los resultados entre 2.5 y 40 ppm son cuantitativos. Para un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm deben diluirse 1:1 con la solución diluyente de extracto de muestra, como se describe en la sección **Dilución del Extracto de las Muestras**.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección: 2 ppm (determinado por el promedio de 10 muestras libres de histamina, más 3 desviaciones estándar).

Límite de la cuantificación: 2.5 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo de la curva de calibración que esta prueba puede detectar con fiabilidad la histamina).

Rango de la cuantificación: 2.5–40 ppm (para un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm requieren una dilución adicional; véase “Dilución del extracto de las muestras” para obtener más instrucciones.)

Matrices validadas: Atún fresco, enlatado y en bolsas en aceite o en agua*, dorado, pez azul y harina de pescado.

*Matriz validada por el *AOAC-RI*

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, 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, DON, ocratoxina, zearalenona, toxinaS 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 total de coliformes, residuos proteínicos

Alérgenos alimentario

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

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos de rumiantes

- Harina de carne y huesos, concentrado animal

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.neogen.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.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