

*Read instructions carefully before starting test*



# for Total Milk Allergen

## Quantitative Test

*Refrigerate at 2–8°C (35–46°F) • Do not freeze*

### **MILK ALLERGEN**

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

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

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

### **INTENDED USE**

Veratox for Total Milk Allergen is intended for the quantitative analysis of food products, such as juices, cake mixes, cookies, sauces and sorbets, and clean-in-place rinses for the presence of milk proteins casein and whey.

### **INTENDED USER**

The Veratox for Total Milk Allergen test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with foods possibly contaminated by casein or whey. 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 Total Milk Allergen is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Milk protein residue is extracted from samples with a buffered salt solution (Phosphate Buffered Saline, or PBS) by shaking in a heated water bath. Milk protein residue is extracted from samples and added to antibody-coated wells (capture antibody) where it binds to the antibody during an incubation. Any unbound protein residue is washed away and a second antibody (detector antibody), which is enzyme labeled, is added. The detector antibody binds to the already bound milk protein residue. After a second wash, the substrate is added. Color develops as a result of the presence of bound detector antibody. Red Stop reagent is added and the color of the resulting solution is observed. The test is read in a microwell reader to yield optical densities. The optical densities of the controls form a standard curve, and the sample optical densities are plotted against the curve to calculate the exact concentration of allergen.

### **STORAGE REQUIREMENTS**

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

## MATERIALS PROVIDED

1. 48 antibody-coated microwells (24 per pouch)
2. 48 red-marked transfer wells (24 per pouch)
3. 5 yellow-labeled bottles of 0, 2.5, 5, 10 and 25 ppm nonfat dry milk (NFDM) controls
4. 4 blue-labeled bottles of enzyme-labeled antibody conjugate
5. 1 green-labeled bottle of K-Blue® Substrate
6. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution
7. 5 foil pouches of 10 mM PBS dry powder extraction solvent; each pouch contains enough powder to prepare 1 L of extraction solvent
8. 2 wide-mouth bottles of 40 mL PBS-Tween wash buffer concentrate; each bottle contains enough concentrate to prepare 1 L of wash buffer
9. 50 g of extraction additive in a specimen cup
10. Plastic scoop to measure extraction additive

## MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Allergen Extraction Kit (Neogen item 8429)
  - a. 20 disposable plastic extraction bottles
  - b. 20 disposable transfer pipettes
2. Shaker water bath adjusted to 60°C ± 1° (140°F) with holder for extraction bottles (Neogen items 9298, 9299)
3. Pipettor, adjustable 50–200 µL (Neogen item 9276)
4. Pipette tips (Neogen item 9410, 9407, 9417)
5. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
6. Timer (Neogen item 9452, 9426)
7. Microwell strip reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
8. 1 L bottle to prepare washing solution (Neogen item 9472)
9. 1 L heat safe bottle to prepare extract solution (Neogen item 9472)
10. Paper towels or equivalent absorbent material
11. Microwell holder (Neogen item 9402)
12. Waterproof marker
13. Wash bottle (Neogen item 9400)
14. Graduated cylinder capable of measuring 125 mL (Neogen item 9368)
15. Scale capable of weighing 5 g ± 0.1 g (Neogen item 9427)
16. 3 reagent multichannel pipettor boats (Neogen item 9435)
17. Distilled or deionized water

## PRECAUTIONS

1. Samples intended to be tested for **milk must be extracted separately** from samples intended to be tested for other food allergens, such as peanut and egg residues. The extraction additives for each type of test are designed specifically for the target food allergen.
2. The controls and extraction reagents of the Veratox for Total Milk Allergen test kit may contain one or more of the following potentially allergic materials: milk, egg protein, peanut protein, soy protein, or tree nut protein. If allergic to any of these compounds, please use caution when handling this product.
3. Concentrated food additives, colors and flavors may cause interferences on ELISA test methods. Contact Neogen Technical Services for validation information.
4. Hydrolyzed and fermented proteins may not be detected using ELISA methods for allergen testing. Although the proteins may be undetectable in the assay because of their properties, there still could be active allergenic protein residue present.
5. Infant formula: Contact Neogen for additional information concerning the testing of infant formulas.
6. Sponges should not be used for sample collection and allergen testing. Sample collection swabs other than Neogen swabs should be validated prior to use. General sponges and swabs may contain solutions or materials that may interfere with the test kit.
7. Disposable extraction bottles and tubes must be used to extract milk samples to avoid cross-contamination.
8. The testing area must be totally free of milk products. A minute amount of milk protein in the environment can affect test results.
9. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze test kits.
10. Do not use kit components beyond expiration date.
11. Sample extracts must be cooled to room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.
12. Bring kits to room temperature between 18–30°C (64–86°F) prior to use.
13. Do not mix reagents from kit serial with reagents from a different kit serial.
14. Do not run more than 24 wells per test.
15. Follow proper pipetting techniques (e.g., prime tips and use clean tips).

16. Use only the incubation times specified. Others may give inaccurate results.
17. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.

## 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. **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.
3. **Extraction solution:** Prepare extraction solution by adding a foil pouch of extraction solvent, 10 mM PBS, to 1 L distilled or deionized water at pH 7.4. Cover and store unused portion, refrigerated at 2–8°C (35–46°F).
4. **Wash buffer:** Prepare wash buffer solution by mixing 40 mL of wash buffer concentrate in wide mouth bottle into 960 mL of distilled or deionized water at pH 7.4. Cover and store unused portion refrigerated at 2–8°C (35–46°F).  
**NOTE:** Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when test kit has been used completely.

## SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques (see Neogen's Food Allergen Handbook). The sample should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

**NOTE:** Glassware and material used for other allergen testing cannot be used for milk residue testing due to the potential of cross-contamination. For this reason, it is also highly recommended that any labware, such as wash bottles, graduated cylinders, and 1 L bottles, be solely dedicated for use with the milk allergen kit.

1. Prepare the extraction solution (PBS, pH 7.4) as described in the procedural notes.
2. Preheat extraction solution to 60°C (140°F) by immersing the bottle containing the solution into the water bath and allowing it to reach 60°C.
3. Using your sampling and collection procedure, obtain a representative sample and grind it to a very fine particle size.
4. Transfer 5 g of sample, or 5 mL of liquid sample, into a 250 mL disposable plastic extraction bottle.
5. Add 1 level scoop of the extraction additive into the sample bottle. (Do not use the extraction additive from another allergen test kit.)
6. Pour 125 mL of the 60°C (140°F) extraction solution into the sample bottle.
7. Cap the sample bottle to prevent contents from splashing during the extraction.
8. Extract by shaking (150 rpm) in a 60°C water bath for **15 minutes**. Remove the bottle from the bath.
9. Let the material settle for **5 minutes** before proceeding to the next step.
10. Use the supernatant (the top liquid portion of the extract) as your sample. **Do not filter.** Begin the test procedure once the sample has cooled to room temperature (at least **15 minutes**).

## TEST PROCEDURE FOR QUANTITATION

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

1. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
2. Using a new pipette tip for each, transfer 150 µL of controls and sample extracts to the red-marked transfer wells as shown in the template below. Run only two 12-well strips at a time.

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

3. Place tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of the controls and sample extracts to the antibody-coated wells. Mix for **10 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface without splashing reagents from the wells.
4. Incubate microwells **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F). Discard the red-marked transfer wells.
5. Empty the contents of the wells into a sink. With a wash bottle, fill each antibody well with the wash buffer solution and dump out. Repeat the washing 10 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until the remaining washing solution is removed.
6. Pour the needed volume of conjugate from the blue-labeled bottle into a clean reagent boat.
7. Using the 12-channel pipettor transfer 100 µL of the conjugate into all the wells and mix for **10 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
8. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
9. Wash all wells with the wash buffer solution as described in step 5.
10. Pour the needed volume of substrate solution from the green-labeled bottle into a clean reagent boat.

- Place new tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of substrate into each well and mix for **10 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
- Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
- Pour the needed volume of Red Stop solution from the red-labeled bottle into a clean reagent boat.
- Place new tips on the 12-channel pipettor and transfer 100 µL of Red Stop solution into each well and mix for **10 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
- Wipe the bottom of the microwells with a dry cloth or towel and read in a microwell reader with a 650 nm filter. Air bubbles should be eliminated, as they could affect analytical results. Results should be read within **20 minutes** after the addition of Red Stop Solution.
- Read and calculate the test's results using Neogen's Stat-Fax microwell reader, or an equivalent strip reader. If using a strip reader, calculate the results using Neogen's Veratox software for windows.

### TEST PROCEDURE FOR SCREENING

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

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

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

- Incubate microwells **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
- Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer solution, fill each well and shake out. Repeat 10 times. Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
- Add 100 µL from the blue-labeled conjugate bottle to each well. Mix for 20 seconds by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
- Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
- Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer solution, fill each well and shake out. **Repeat 10 times.** Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
- Add 100 µL from the green-labeled substrate bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
- Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
- Add 100 µL from the red-labeled Red Stop bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface. The results are now ready to be interpreted.
- Visually compare the color of a sample well to the color of the control well. If the sample well has more blue color than the control well, the sample tests positive for milk contamination of more than the control used. If the sample well has less blue color, or more red color, than the control well, the sample contains less than the control used of milk contamination.

**Alternative:** Read wells (wipe the bottom of wells with a dry cloth or towel first) in a microwell reader with a 650 nm filter. If the sample well has an optical density (OD) higher than the control well, the sample is positive for milk contamination of more than the control used. If the sample well has an OD lower than the control well, the sample contains less than the control used of milk contamination.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Limit of detection:** 1 ppm nonfat dried milk (NFDM) (described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect milk protein.)

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

**Allergen detection:** Test detects casein and whey proteins from cow, goat and sheep and the results are expressed as ppm of NFDM.

**Protein Conversion:** Test results are expressed as ppm NFDM. To express results as ppm protein, multiply the NFDM result by 0.36 (e.g., 2.5 ppm NFDM x 0.36 = 0.9 ppm NFDM protein). \*NFDM contains 36% protein.

\*Source: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, #01091 - Milk, dry, nonfat, regular, without added vitamin A and vitamin B.

## 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 Food Safety test kits, at [www.neogen.com](http://www.neogen.com), or by calling Neogen at 800/234-5333 or 517/372-9200.

## TERMS AND CONDITIONS

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

## WARRANTY

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

### TEST KITS AVAILABLE FROM NEOGEN

#### Natural toxins

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

#### Foodborne bacteria

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

#### Sanitation

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

#### Food allergens

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

#### Genetic modification

- CP4 (Roundup Ready®)

#### Ruminant by-products

- Meat and bone meal, feed

#### Species Identification

- Raw and cooked meat samples, feed



#### North America Neogen Headquarters

800/234-5333 (USA/Canada)  
[foodsafety@neogen.com](mailto:foodsafety@neogen.com)  
[foodsafety.neogen.com](http://foodsafety.neogen.com)

#### Europe, Middle East and Africa

**Neogen Europe**  
+ 44 (0) 1292 525 600  
[info\\_uk@neogeneurope.com](mailto:info_uk@neogeneurope.com)  
[www.neogeneurope.com](http://www.neogeneurope.com)

**Mexico  
Neogen Latinoamerica**  
+52 (55) 5254-8235  
[informacion@neogenlac.com](mailto:informacion@neogenlac.com)  
[www.neogenlac.com](http://www.neogenlac.com)

#### Brazil

**Neogen do Brasil**  
+55 19 3935.3727  
[info@neogendobrasil.com.br](mailto:info@neogendobrasil.com.br)  
[www.neogendobrasil.com.br](http://www.neogendobrasil.com.br)

#### China

**Neogen Bio-Scientific Technology**  
+86 21 6271 7013  
[info@neogenchina.com.cn](mailto:info@neogenchina.com.cn)  
[www.neogenchina.com.cn](http://www.neogenchina.com.cn)

#### India

**Neogen Food and Animal Security**  
+91 484 2306598, 2301582  
[info@neogenindia.com](mailto:info@neogenindia.com)  
[www.neogenindia.com](http://www.neogenindia.com)

©Neogen Corporation, 2018. Neogen, Veratox and K-Blue are registered trademarks of Neogen Corporation. All other brand and product names are trademarks or registered trademarks of their respective companies.

16231J

V-TotalMilk\_0418

*Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba*

Veratox<sup>®</sup>

# para alérgeno de leche total

## Prueba cuantitativa

*Refrigar a 2–8°C (35–46°F) • No congelar*

### **ALÉRGENO DE LA LECHE**

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

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

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

### **USO PREVISTO**

La prueba Veratox para alérgeno de leche total está destinada para el análisis cuantitativo de productos alimenticios, tales como jugos, mezclas de pasteles, galletas, salsas y sorbetes, y enjuagues de limpieza-en-sitio para la presencia de proteínas de la leche, caseína y suero.

### **USUARIO PREVISTO**

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

## FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

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

## ALMACENAMIENTO

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

## MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 micropocillos recubiertos con anticuerpos (24 por bolsa)
2. 48 micropocillos de transferencia marcados en rojo (24 por bolsa)
3. 5 botellas con etiqueta amarilla de controles de leche en polvo sin grasa (NFDM) de 0, 2.5, 5, 10 y 25 ppm
4. 4 botellas con etiqueta azul de conjugado de anticuerpo marcado con enzima
5. 1 botella con etiqueta verde de sustrato K-Blue®
6. 1 botella con etiqueta roja de solución Red Stop
7. 5 bolsas de aluminio de solvente de extracción en polvo seco PBS 10 mM; cada bolsa contiene suficiente polvo para preparar 1 L de solvente de extracción
8. 2 botellas con boca ancha de 40 mL de buffer de lavado PBS-Tween 10 mM concentrado; cada botella contiene suficiente concentrado para preparar 1 L de buffer de lavado
9. 50 g de aditivo de extracción en un recipiente de muestras
10. Cuchara plástica para medir el aditivo de extracción

## MATERIALES RECOMENDADOS, PERO NO PROPORCIONADOS

1. Kit de extracción de alérgenos (producto Neogen 8429)
  - a. 20 botellas plásticas de extracción desechables
  - b. 20 pipetas de transferencia desechables
2. Baño de agua con agitación capaz de mantener 60°C ± 1° (140°F) con abrazaderas para aguantar botellas de extracción (productos Neogen 9298, 9299)
3. Pipeteador ajustable de 50–200 µL (producto Neogen 9276)
4. Puntas de pipeta (producto Neogen 9410, 9407, 9417)
5. Pipeteador de 12 canales (producto Neogen 9273)
6. Cronómetro (producto Neogen 9452, 9426)
7. Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm (producto Neogen 9303)
8. Botella de 1 L para preparar solución de lavado (producto Neogen 9472)
9. Botella de 1 L a prueba de calor para preparar la solución de extracción (producto Neogen 9472)
10. Toallas de papel o material absorbente equivalente
11. Gradilla para micropocillos (producto Neogen 9402)
12. Marcador impermeable
13. Piseta de lavado (producto Neogen 9400)
14. Cilindro graduado capaz de medir 125 mL (producto Neogen 9368)
15. Balanza capaz de pesar 5 g ± 0.1 g (producto Neogen 9427)
16. 3 reservorios para reactivos para pipeteador multicanal (producto Neogen 9435)
17. Agua destilada o desionizada

## PRECAUCIONES

1. Las muestras destinadas a ser analizadas para detectar **leche deben extraerse por separado** de las muestras a ser analizadas para otros alérgenos alimentarios, tales como residuos de maní y huevo. Los aditivos de extracción para cada tipo de prueba están diseñados específicamente para el alérgeno alimentario de interés.
2. Los controles y los reactivos de extracción del kit de prueba Veratox para alérgenos de leche total pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alérgicos: leche, proteína de huevo, proteína de maní, proteína de soya o proteína de frutos secos. Si es alérgico a cualquiera de estos compuestos, tenga cuidado al manejar este producto.
3. Los aditivos, colores y sabores concentrados de los alimentos pueden causar interferencia con los métodos de pruebas ELISA. Póngase en contacto con los Servicios Técnicos de Neogen para obtener información de validación.
4. Las proteínas hidrolizadas y fermentadas pueden no detectarse usando los métodos ELISA para pruebas de alérgenos. Aunque las proteínas pueden ser indetectables en el ensayo debido a sus propiedades, todavía podría haber residuos de proteínas alergénicas activas presentes.
5. Fórmula infantil – póngase en contacto con Neogen para obtener información adicional sobre las pruebas para fórmula infantil.
6. No deben usarse esponjas para recolectar muestras ni para las pruebas de alérgenos. La hisopos para recolección de muestras que no sean hisopos de Neogen deben validarse antes de su uso. Las esponjas e hisopos generales pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con el kit.
7. Se deben usar botellas y tubos de extracción desechables para extraer muestras de leche para evitar la contaminación cruzada.
8. El área de prueba debe estar totalmente libre de productos lácteos. Una cantidad mínima de proteína de leche en el ambiente puede afectar los resultados de la prueba.
9. Almacene el kit de prueba entre 2–8°C (35–46°F) cuando no lo utilice. No congele los kits.
10. No utilice los componentes del kit después de la fecha de vencimiento.
11. Los extractos de muestras deben enfriarse a temperatura ambiente de 18–30°C (64–86°F) antes de su uso.
12. Permita que el kit alcance una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F) antes de su uso.
13. No mezcle reactivos de un kit con los reactivos de otro kit con un número de serie diferente.
14. No ejecute más de 24 micropocillos por prueba.
15. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas (p. ej., cebar las puntas y usar puntas limpias).
16. Use los tiempos de incubación especificados; otros tiempos pueden dar resultados inexactos.
17. Evite el almacenamiento prolongado de los kits a temperatura ambiente.

## NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato:** El sustrato K-Blue está listo para su uso. El sustrato debe ser color transparente o azul claro – deséchelo si el líquido se ha vuelto azul oscuro. Solamente vierta el volumen necesario dentro del reservorio para reactivos. **No regrese a la botella el sustrato que no haya utilizado.** Cubra el reservorio para reactivos para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
  2. **Micropocillos recubiertos con anticuerpos:** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio después de la extracción de las muestras y cuando esté listo para comenzar la prueba.
  3. **Solución de extracción:** Prepare la solución de extracción añadiendo una la bolsa de aluminio de solvente de extracción, PBS 10 mM, a 1 L de agua destilada o desionizada a pH 7.4. Cubra y guarde las porciones no utilizadas, refrigeradas entre 2–8°C (35–46°F).
  4. **Buffer de lavado:** Prepare la solución de buffer de lavado mezclando 40 mL de buffer de lavado concentrado en una botella de boca ancha con 960 mL de agua destilada o desionizada a pH 7.4. Cubra y guarde las porciones no utilizadas, refrigeradas entre 2–8°C (35–46°F).
- NOTA:** Deseche las porciones no utilizadas de la solución de extracción y de buffer de lavado cuando el kit se haya utilizado por completo.



## PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

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

**NOTA:** La cristalería y el material utilizado para otras pruebas de alérgenos no pueden utilizarse para las pruebas de residuos de leche, debido a la posibilidad de contaminación cruzada. Por esta razón, también es muy recomendable que cualquier material de laboratorio, tales como botellas de lavado, cilindros graduados y botellas de 1 L, sea exclusivamente para su uso con el kit para alérgenos lácteos.

1. Prepare la solución de extracción (PBS, pH 7.4) como se describe en las notas de procedimiento.
2. Pre-caliente la solución de extracción a 60°C (140°F) sumergiendo la botella con la solución en el baño de agua, permitiendo que alcance 60°C.
3. Utilizando su procedimiento de muestreo y recolección, obtenga una muestra representativa y tritúrela a un tamaño de partícula muy fino.
4. Transfiera 5 g de muestra o 5 mL de muestra líquida a una botella plástica de extracción desechable de 250 mL.
5. Añada una cucharada rasa del aditivo de extracción en la botella de muestra. (No use el aditivo de extracción de otro kit de prueba para alérgenos).
6. Vierta 125 mL de la solución de extracción a 60°C (140°F) en la botella de muestra.
7. Tape la botella de muestra para evitar que el contenido salpique durante la extracción.
8. Extraiga por agitación (150 rpm) en un baño de agua a 60°C durante **15 minutos**. Retire la botella del baño.
9. Permita que el material se asiente durante **5 minutos** antes de continuar con el siguiente paso.
10. Utilice el sobrenadante (la porción líquida superior en el extracto) como muestra. **No filtre**. Comience el procedimiento de prueba una vez que la muestra se haya enfriado a temperatura ambiente (al menos **15 minutos**).

## PROCEDIMIENTO DE PRUEBA PARA LA CUANTIFICACIÓN

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

1. Mezcle cada reactivo revolviendo la botella de reactivo antes de usar.
2. Usando una nueva punta de pipeta para cada uno, transfiera 150 µL de controles y de extractos de muestra a los micropocillos de transferencia marcados con rojo, como se muestra en la tabla a continuación. Ejecute solo dos tiras de 12 micropocillos a la vez.

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

3. Coloque puntas en la pipeta de 12 canales y transfiera 100 µL de los controles y de extractos de muestras a los micropocillos recubiertos con anticuerpos. Mezcle durante 10 segundos deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana, sin salpicar reactivos de los micropocillos.
4. Incube los micropocillos durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F). Deseche los micropocillos de transferencia marcados con rojo.
5. Vacíe el contenido de los micropocillos en un fregadero. Con una piseta de lavado, llene bien cada micropocillo de anticuerpos con la solución buffer de lavado y viértalo. Repita el lavado 10 veces, luego voltee los micropocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel hasta eliminar toda la solución de lavado restante.
6. Vierta el volumen necesario de conjugado de la botella con etiqueta azul en un reservorio para reactivo limpio.
7. Usando la pipeta de 12 canales, transfiera 100 µL del conjugado a todos los micropocillos y mézclelos durante **10 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
8. Incube durante **10 minutos** a una temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
9. Lave todos los micropocillos con la solución buffer de lavado como se describe en el paso 5.
10. Vierta el volumen necesario de solución de sustrato de la botella con etiqueta verde en un reservorio para reactivo limpio.

11. Coloque puntas nuevas en la pipeta de 12 canales y transfiera 100 µL del sustrato en cada micropocillo y mézclelos durante **10 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
12. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
13. Vierta el volumen necesario de la solución Red Stop de la botella con etiqueta roja en un reservorio para reactivo limpio.
14. Coloque puntas nuevas en la pipeta de 12 canales y transfiera 100 µL de la solución Red Stop en micropocillo y mezcle durante **10 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
15. Limpie el fondo de los micropocillos con un paño seco o toalla y léalos en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Deben eliminarse las burbujas de aire, ya que podrían afectar los resultados analíticos. Los resultados deben leerse dentro de los **20 minutos** posteriores a la adición de la solución Red Stop.
16. Lea y calcule los resultados de la prueba utilizando el lector de micropocillos Stat-Fax de Neogen o un lector de tiras equivalente. Si se usa un lector de tiras, calcule los resultados usando el software Veratox de Neogen para Windows.

### PROCEDIMIENTO DE PRUEBA PARA EL CRIBADO

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

1. Retire 1 micropocillo para cada muestra a ser analizada y 1 micropocillo para el control; colóquelos en la gradilla para micropocillos.
2. Escoja una botella de control con etiqueta amarilla para que sirva como nivel de detección para la prueba.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo su botella antes de usar.
4. Añada 100 µL del control en la botella con etiqueta amarilla al primer micropocillo. Añada 100 µL de cada extracto de muestra al micropocillo respectivo como se indica en la tabla que aparece a continuación. Para hisopos ambientales, añada 3 gotas del tubo del hisopo con un gotero. Mézclelos durante **20 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.

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

5. Incube los micropocillos durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
6. Elimine el contenido de los micropocillos. Usando una pisseta de lavado con solución de buffer de lavado, llene cada micropocillo y vacíelos. Repita 10 veces. Elimine el exceso de buffer de lavado volteando los pocillos y golpeándolos vigorosamente en una toalla de papel.
7. Añada 100 µL del conjugado en la botella con etiqueta azul a cada micropocillo. Mezcle durante 20 segundos, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
8. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
9. Elimine el contenido de los micropocillos. Usando una pisseta de lavado con solución de buffer de lavado, llene cada micropocillo y vacíelos. Repita **10 veces**. Elimine el exceso de buffer de lavado volteando los pocillos y golpeándolos vigorosamente en una toalla de papel.
10. Añada 100 µL del sustrato en la botella con etiqueta verde a cada micropocillo. Mezcle durante **20 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
11. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F).
12. Añada 100 µL de Red Stop en la botella con etiqueta rojo. Mezcle durante **20 segundos**, deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Los resultados están listos para ser interpretados.
13. Compare visualmente el color de un micropocillo de muestra con el color del micropocillo de control. Si el micropocillo de muestra tiene más color azul que el micropocillo de control, la muestra contiene más contaminación láctea que el control utilizado. Si el micropocillo de muestra tiene menos color azul, o más color rojo, que el micropocillo de control, la muestra contiene menos contaminación láctea que el control utilizado.

**Alternativa:** Lea los micropocillos (limpie el fondo de los micropocillos con un paño seco o toalla) en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Si el micropocillo de muestra tiene una densidad óptica (DO) más alta que el micropocillo de control, la muestra contiene más contaminación láctea

que el control utilizado. Si el micropocillo de muestra tiene una DO más baja que el micropocillo de control, la muestra contiene menos contaminación láctea que el control utilizado.

## **CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

**Límite de detección:** 1 ppm de leche en polvo sin grasa (NFDM) (descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración en la que esta prueba puede detectar de manera confiable la proteína de leche).

**Rango de cuantificación:** 2.5–25 ppm de NFDM (para cuantificar muestras por debajo de 2.5 ppm o por encima de 25 ppm, comuníquese con un representante de Neogen para obtener instrucciones de dilución).

**Detección de alérgenos:** Esta prueba detecta proteínas de caseína y suero de vaca, cabra y ovejas, y los resultados se expresan en ppm de leche en polvo sin grasa (NFDM).

**Conversión de proteínas:** Los resultados de la prueba son expresados como ppm NFDM. Para expresar los resultados como ppm de proteína, multiplique el resultado NFDM por 0.36 (p. ej., 2.5 ppm NFDM x 0.36 = 0.9 ppm proteína). \*NFDM contiene 36% de proteína.

\*Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, #01091 - Leche, en polvo, sin grasa, regular, sin adición de vitamina A y vitamina B.

## **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) DISPONIBLES**

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

## **GARANTÍA**

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un remplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgos resultantes por el uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comerciabilidad de este producto o de la idoneidad de éste para cualquier propósito. Neogen no será responsable de ningún daño, incluyendo daños especiales o consecuenciales, o de gastos derivados directa o indirectamente del uso del producto.

## KITS DE PRUEBAS DISPONIBLES DE NEOGEN

### Toxinas naturales

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

### Bacterias transmitidas por los alimentos

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

### Saneamiento

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

### Alérgenos alimentarios

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

### Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

### Subproductos de rumiantes

- Harina de carne y huesos, piensos

### Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas, piensos



#### Norteamérica

##### Oficinas Corporativas de Neogen

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

#### Europa, Medio Oriente y África

##### Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600  
info\_uk@neogeneurope.com  
www.neogeneurope.com

#### México

##### Neogen Latinoamérica

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

#### Brasil

##### Neogen do Brasil

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

#### China

##### Neogen Bio-Scientific Technology

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

#### India

##### Neogen Food and Animal Security

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