

*Read instructions carefully before starting test*

# **ALERT<sup>®</sup>**

## **for Total Milk Allergen**

### **Screening 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 residue ensures food manufacturers that an unlabeled — and potentially dangerous — ingredient did not make its way into a food product.

#### **INTENDED USE**

Alert for Total Milk Allergen is intended to be used to screen food, such as juices, sauces and sorbets, or environmental surfaces for the presence of the milk components, casein and whey.

#### **INTENDED USER**

The 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

Alert for Total Milk Allergen is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Milk protein residue is extracted from samples by blending with a hot buffered salt solution (PBS). Extracted milk protein is sampled and added to antibody-coated wells (capture antibody) where it binds to the antibody during an incubation. Any unbound milk protein 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. After a second wash, substrate is added. Color develops as a result of the presence of bound detector antibody. Red Stop reagent is added and the color of the resulting solution is observed.

## 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. 24 antibody-coated microwells
2. 2 yellow-labeled bottles of controls made from nonfat dried milk; 1 bottle at a concentration of 5 ppm and 1 bottle at 10 ppm (see procedural note No. 1)
3. 1 blue-labeled bottle of enzyme-labeled antibody conjugate
4. 1 green-labeled dropper bottle of K-Blue® Substrate solution
5. 1 red-labeled dropper bottle of Red Stop solution
6. 20 unlabeled empty sample dropper bottles with tips
7. 3 foil pouches of 10 mM PBS dry powder extraction solvent; each pouch contains enough powder to prepare 1 L of extraction solution
8. 1 wide-mouth bottle of 40 mL PBS-Tween wash buffer concentrate; a 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 extraction bottles
  - b. 20 disposable transfer pipettes
2. Allergen Environmental Swabbing Kit (Neogen item 8432S)
  - a. 100 sterile swabs
  - b. 100 dropper tips
3. Scale capable of weighing  $5 \pm 0.1$  g (Neogen item 9427)
4. Shaker water bath, hot plate or equivalent heat source capable of maintaining  $60 \pm 1^\circ\text{C}$
5. Thermometer
6. Two 1 L bottles to prepare washing and extraction solutions (Neogen item 9472)
7. Paper towels or equivalent absorbent material
8. Microwell holder (Neogen item 9402)
9. Waterproof marker
10. Wash bottle (Neogen item 9400)
11. Distilled or deionized water
12. Timer (Neogen item 9426)
13. Graduated cylinder capable of measuring 125 mL (Neogen item 9368)
14. Pipettor, 100  $\mu\text{L}$  (Neogen item 9272, 9278, 9276)
15. Pipette tips (Neogen item 9410, 9407, 9417)
16. Vortex (Neogen item 9494)
17. 50 mL sample tubes (Neogen item 9381)

## PRECAUTIONS

1. Samples intended to be tested for **milk must be extracted separately** from samples intended to be tested for other food allergens. The extraction additives for each type of test are designed specifically for the target food allergen.
2. Components of Alert for Total Milk Allergen, such as controls and extraction reagents, may contain one or more of the following potentially allergic materials: milk, egg protein, peanut protein or soy protein. If allergic to any of these compounds, please use caution when using this product.
3. Concentrated food additives, colors and flavors may cause interferences on ELISA test methods. Contact Neogen's technical services for validation information.
4. Hydrolyzed and fermented proteins may not be detected using ELISA methods for allergen testing. Due to the nature of the proteins they may be undetectable in the assay, but there could still 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 transfer pipettes must be used to extract milk samples to avoid cross-contamination.
8. The testing environment should be clean and dust-free.
9. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze.
10. Do not use kit components beyond expiration date.
11. Do not mix reagents from kit serial with those from a different serial.
12. Do not run more than 6 wells per test.
13. Use only the incubation times specified. Others may give inaccurate results.
14. Bring kits to room temperature 18–30°C (64–86°F) prior to use.
15. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.

## PROCEDURAL NOTES

1. **Controls.** To increase the flexibility of this test kit, two test controls are supplied: 5 ppm and 10 ppm. **Choose one control** level to screen samples against for each test performed.
2. **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).
3. **Wash buffer.** Prepare the wash buffer solution by pouring all the wash buffer concentrate into an empty 1 L bottle. Rinse the wash buffer concentrate container with distilled or deionized water and pour into the 1 L bottle to ensure all the concentrate is used. Fill the 1 L bottle with additional distilled or deionized water, and swirl to assure thorough mixing. Cover and store any unused portions refrigerated at 2–8°C (35–46°F).  
**NOTE:** Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when the test kit has been used completely.
4. **Antibody wells.** Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after samples are extracted, and the test procedure is set to begin.

## SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

The sample to be tested should be collected according to accepted sampling techniques (see Neogen's Food Allergen Monitoring Handbook).

**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 highly recommended that any labware, such as wash bottles, graduated cylinders or 1 L bottles, are dedicated solely for use with the milk allergen kit.

1. Prepare the extraction solution as described in the procedural notes.
2. Preheat extraction solution to 60°C (140°F).

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 one level scoop of the milk 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.
9. Remove the bottle from the bath and let the material settle for 5 minutes.
10. Using a disposable pipette, transfer approximately 1 mL of the supernatant (the top liquid portion of the extract) to a sample dropper bottle. Then, label and place a dropper tip on the bottle.
11. Begin the test procedure once the sample has cooled to room temperature (at least 15 minutes).

#### **ALTERNATE EXTRACTION**

1. Prepare the extraction solution as described in the procedural notes.
2. Prepare a working solution by adding 125 mL of extraction solution into container and adding one scoop of extraction additive and mix.
3. Preheat the working solution to 60°C (140°F) by using a hot plate, incubator, microwave, water bath or equivalent. Use a thermometer to assure temperature is correct.
4. Transfer 1 g of sample, or 1 mL of liquid sample, into a 50 mL tube.
5. Pour 25 mL of the 60°C (140°F) working extraction solution into the sample tube and cap.
6. Extract by vortexing for 3 minutes. Use caution, the liquid is hot.
7. Let the material settle for 5 minutes.
8. Using a disposable pipette, transfer approximately 1 mL of the supernatant (the top liquid portion of the extract) to a sample dropper bottle. Then label and place a dropper tip on the bottle.
9. Begin the test procedure once the sample has cooled to room temperature (at least 15 minutes).

#### **ENVIRONMENTAL SWABBING PREPARATION AND EXTRACTION**

1. Prepare the extraction solution as described in the procedural notes.
2. Prepare a working solution by combining 125 mL of the extraction solution to a separate container, and add one level scoop of extraction additive to a container. Prepare a fresh working solution daily.

**NOTE:** Prepare 125 mL of working solution for every 25 environmental swabs to be tested.

3. Preheat the working solution to 60°C (140°F). Shake container to dissolve additive.
4. Gather the sample with a swab, using one of the following methods:

**For dry surfaces:** Open a new swab and wet with extraction solution. Swab a 10 x 10 cm area by using a crosshatch technique. (Do not use working solution to moisten swabs.)

**For wet surfaces:** Open a new swab and swab a 10 x 10 cm area by using a crosshatch technique. Do not moisten swab prior to use.

5. Return the swab to its original tube once sampling is complete. Remember to label each tube.
6. Remove the swab from its tube, and add 5 mL of working solution at 60°C to the tube. Mix by placing the swab back into the tube and shaking for 2 minutes by hand (inverting tube), or for 30 seconds with a vortex mixer.
7. Remove the swab from its tube.
8. Place a new sample dropper tip onto the tube. The solution in the tube now serves as the sample.

**NOTE:** Use caution when inverting the tube, as some liquid may drip.

## TEST PROCEDURE

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

1. Remove 1 well from the foil pouch for each sample to be tested plus 1 well for the control, and place into the well holder.
2. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
3. Pipette 100 µL from a yellow-labeled control bottle (*choose the 5 ppm or 10 ppm control supplied—see procedural note No. 1*) to the first well. Add three drops, or pipette 100 µL from each sample extract to a respective well as indicated in the template below. Mix for 20 seconds by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.

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

4. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
5. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer, fill each well and shake out. **Repeat 10 times.** Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on an absorbent towel.
6. Pipette 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.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
8. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer, fill each well and shake out. **Repeat 10 times.** Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on an absorbent towel.
9. Add 3 drops from the green-labeled substrate dropper bottle to each well. Mix for 20 seconds by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
10. Incubate for **10 minutes** at room temperature 18–30°C (64–86°F).
11. Add 3 drops from the red-labeled Red Stop dropper 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.

## INTERPRETATION OF RESULTS

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 protein contamination of **more than 5 ppm (or 10 ppm, depending on the control used)**. If the sample well has **less blue color, or more red color**, than the control well, the sample contains **less than 5 ppm (10 ppm)** of milk protein contamination.

**Alternative:** Read wells (wipe bottom of wells first) in a microwell reader with a 650 nm filter. If the sample well has an optical density (OD) higher than the control well, the sample is positive for milk contamination of more than 5 ppm (10 ppm). If the sample well has an OD lower than the control well, the sample contains less than 5 ppm (10 ppm) of milk protein contamination.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Allergen detection:** This test detects casein and whey proteins from cow, goat and sheep. The results are expressed in terms of detection of non-fat dried milk (NFDm).

## CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Service can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

## SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's Food Safety test kits, at [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.

### TESTING 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



#### 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

***Lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba***

# **ALERT<sup>®</sup>**

## **para Alérgenos de Leche Total**

### **Prueba de Detección**

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

#### **ALÉRGENOS DE LA LECHE**

Los alérgenos alimentarios son proteínas contenidas en los alimentos que pueden crear una respuesta inmune en individuos sensibles. Una vez ingeridos, los alérgenos presentes en los alimentos pueden provocar muchas reacciones, cuya gravedad va desde urticaria y comezón hasta anafilaxia. La anafilaxia es una reacción alérgica grave, que incluye vómito, diarrea, dificultad para respirar, hinchazón de la boca y la lengua y un rápido descenso 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 cierta medida a los alérgenos presentes en los alimentos. Tan solo en los Estados Unidos se conoce que existen 12 millones de personas que padecen alergias alimentarias.

Los fabricantes de alimentos protegen a las personas con alergias por alimentos al etiquetar sus productos con una lista de ingredientes. El realizar pruebas para detectar la presencia de residuos de leche asegura a los fabricantes de alimentos que un ingrediente no indicado (y potencialmente peligroso) no ingresó en un producto alimenticio.

#### **USO PREVISTO**

La prueba Alert para Alérgenos de Leche Total está previsto para utilizarse como detección de componentes de leche, caseína y suero de leche en alimentos como jugos, salsas y sorbetes o superficies ambientales.

#### **USUARIO PREVISTO**

El kit de prueba está diseñado para ser usado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con los alimentos posiblemente contaminados por caseína o suero de leche. Dado que la técnica es muy importante, los operadores deben ser capacitados por un representante de Neogen o alguna persona que haya terminado con éxito su capacitación de Neogen.

#### **FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS**

Alert de Alérgenos para Leche Total es un ensayo inmunoenzimático (S-ELISA) de captura. El residuo de la proteína de la leche se extrae de muestras al mezclarse con una solución salina neutralizada en caliente (PBS, Phosphate Buffered Saline). La proteína de leche es extraída de la muestra y se agrega a micropocillos recubiertos con anticuerpo (anticuerpo de captura) donde se adhiere al anticuerpo durante una incubación. Cualquier proteína de leche que no se haya adherido se retira por medio de lavados y se agrega un segundo anticuerpo (anticuerpo detector), el cual es la enzima etiquetada. El anticuerpo detector se une a la proteína de leche ya unida. Después de un segundo lavado, se agrega el sustrato. Como resultado de la presencia del anticuerpo detector ligado se produce color. Se agrega reactivo solución detenedora Red Stop y se observa el color de la solución resultante.

## REQUERIMIENTOS DE ALMACENAMIENTO

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

## MATERIALES PROPORCIONADOS

1. 24 micropocillos recubiertos con anticuerpo
2. 2 frascos de control con etiqueta amarilla conteniendo leche en polvo desgrasada; 1 frasco a una concentración de 5 ppm y 1 frasco a 10 ppm (ver la nota de procedimiento N° 1)
3. 1 frasco con etiqueta azul de conjugado de anticuerpos con etiqueta de enzima
4. 1 frasco gotero con etiqueta verde de solución de Sustrato K-Blue®
5. 1 frasco gotero con etiqueta roja de solución detenedora Red Stop
6. 20 frascos goteros vacíos no etiquetados para muestras con puntas
7. 3 bolsas de aluminio con disolvente de extracción de polvo seco PBS de 10 mM; cada bolsa contiene suficiente polvo para preparar 1 L de solución de extracción
8. 1 frasco de boca ancha de concentrado de solución buffer de lavado PBS-Tween de 40 mL; un frasco contiene suficiente concentrado para preparar 1 L de solución buffer de lavado
9. 50 g de aditivo de extracción en un matraz de muestras
10. Cuchara plástica de para medir el aditivo de extracción

## MATERIALES RECOMENDADOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Kit para Extracción de Alérgenos (Producto Neogen 8429)
  - a. 20 frascos desechables para extracción
  - b. 20 pipetas desechables para transferencia
2. Kit de Hisopos Ambientales para Alérgenos (Producto Neogen 8432S)
  - a. 100 hisopos estériles
  - b. 100 puntas de gotero desechables
3. Báscula con capacidad de pesar  $5 \pm 0.1$  g (Producto Neogen 9427)
4. Baño agitado de agua, placa caliente o fuente de calor equivalente capaz de mantener  $60 \pm 1^\circ\text{C}$
5. Termómetro
6. Dos frascos de 1 L para preparar soluciones de lavado y de extracción (Producto Neogen 9472)
7. Toallas de papel o de un material absorbente equivalente
8. Estante para micropocillos (Producto Neogen 9402)
9. Marcador a prueba de agua
10. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
11. Agua destilada o desionizada
12. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
13. Probeta graduada con capacidad de medir 125 mL (Producto Neogen 9368)
14. Pipeta, 100  $\mu\text{L}$  (Producto Neogen 9272, 9278, 9276)
15. Puntas de pipeta (Producto Neogen 9410- 9407, 9417)
16. Vortex o mezclador (Producto Neogen 9494)
17. Tubos de muestra de 50 mL (Producto Neogen 9381)

## PRECAUCIONES

1. Las muestras previstas para probar **contenido de leche se deberán extraer por separado** de las muestras previstas para probar alérgenos de otros alimentos. Los aditivos de extracción para cada tipo de prueba están diseñados específicamente para el alérgeno del alimento objetivo.
2. Los componentes de Alert para Alérgenos de Leche Total, como son controles y reactivos de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales potencialmente alérgicos: leche, proteína de huevo, proteína de maní o proteína de soja. Si usted es alérgico a cualquiera de estos compuestos, tenga precaución al manejar o manipular este producto.
3. Los aditivos, colores y sabores de alimentos concentrados pueden provocar interferencia con los métodos de pruebas ELISA. Comuníquese con el Departamento de Servicios Técnicos de Neogen para obtener información actualizada de validación.
4. Es posible que no se detecten las proteínas hidrolizadas y fermentadas utilizando los métodos ELISA para pruebas de alérgenos. Debido a la naturaleza de las proteínas es posible que éstas no sean detectadas por esta prueba, pero seguir siendo alérgicas y provocar una reacción alérgica.



5. Fórmula para bebés – Comuníquese con Neogen para obtener información adicional acerca de las pruebas en leche infantil.
6. Las esponjas no deben ser utilizadas para la recolección de muestras para detectar alérgenos. En el caso que usted utilice hisopos para la recolección de muestras que NO sean de Neogen, éstos deben ser validados antes de su uso. Las esponjas en general y los hisopos pueden contener soluciones o materiales que pueden interferir con el kit de prueba.
7. Se deben utilizar frascos desechables para extracción y pipetas de transferencia para extraer las muestras de leche y evitar la contaminación cruzada.
8. El medioambiente de la prueba debe estar limpio y libre de polvo.
9. Guarde el kit de pruebas entre 2–8°C (35–46°F) cuando no esté en uso. No lo congele.
10. No utilice los componentes del kit después de la fecha de vencimiento.
11. No mezcle los reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
12. No utilice más de 6 micropocillos por prueba.
13. Utilice los tiempos de incubación especificados. El uso de otros tiempos pueden generar resultados inexactos.
14. Permita que los kits de prueba alcancen la temperatura ambiente entre 18–30°C (64–86°F), antes de utilizarlos.
15. Evite el almacenamiento prolongado de los kits a temperatura ambiente.

## NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Controles.** A fin de aumentar la flexibilidad de este kit de pruebas, se suministran dos controles de prueba: 5 ppm y 10 ppm. Elija un nivel de control frente al cual analizar las muestras para cada prueba realizada.
2. **Solución de extracción.** Prepare la solución de extracción agregando una bolsa de aluminio con disolvente de extracción, 10 mM PBS, a 1 L de agua destilada o desionizada a pH 7.4. Cubra y refrigere las porciones no utilizadas a 2–8°C (35–46°F).
3. **Solución buffer de lavado.** Prepare la solución buffer de lavado vertiendo todo el concentrado de tamponado de lavado en un frasco vacío de 1 L. Enjuague el recipiente del concentrado de tamponado de lavado con agua destilada o desionizada y vierta en el frasco de 1 L para asegurar que se utilice todo el concentrado. Llene el frasco de 1 L con agua destilada o desionizada adicional y revuelva para asegurar que quede bien mezclado. Cubra y refrigere las porciones no utilizadas a 2–8°C (35–46°F).  
**NOTA:** Deseche las porciones no utilizadas de la solución de extracción y buffer de lavado cuando se haya usado completamente el kit de pruebas.
4. **Micropocillos recubiertos de anticuerpo.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio sólo después de obtener los extractos de las muestras y cuando esté listo para empezar el procedimiento de la prueba.

## PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

La recolección de la muestra a analizar deberá efectuarse según las técnicas de muestreo aceptadas (consulte el Manual de Monitoreo de Alérgenos de Alimentos de Neogen).

**NOTA:** Los recipientes de vidrio y el material utilizado para otras pruebas de alérgenos no se pueden utilizar para pruebas de residuos de leche debido a la posibilidad de contaminación cruzada. Por esta razón, se recomienda ampliamente que cualquier utensilio del laboratorio, como son pisetos de lavado, cilindros graduados o frascos de 1 L se dediquen exclusivamente para usarse con el kit de pruebas para alérgenos de leche.

1. Prepare la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Caliente la solución de extracción a 60°C (140°F).
3. Utilice su procedimiento de muestreo y recopilación para obtener una muestra representativa y tritúrela a un tamaño de partícula muy fina.
4. Transfiera 5 g de muestra o 5 mL de muestra líquida, a un frasco de plástico desechable de extracción de 250 mL.
5. Agregue una cucharada rasa de aditivo de extracción al frasco de la muestra. No utilice el aditivo de extracción de otro kit de muestras de alérgenos.
6. Vierta 125 mL de la solución de extracción a 60°C (140°F) dentro del frasco de muestra.
7. Tape el frasco de muestra para evitar que el contenido salpique durante la extracción.
8. Extraiga agitando (150 rpm) en un baño de agua a 60°C durante 15 minutos.

9. Retire el frasco del baño y permita que el material repose durante 5 minutos.
10. Use una pipeta desechable para transferir aproximadamente 1 mL del sobrenadante (la porción superior de líquido del extracto) a un frasco de muestras con gotero. Coloque inmediatamente una etiqueta y la punta del gotero en el frasco.
11. Empiece el procedimiento de la prueba una vez que la muestra se haya enfriado a temperatura ambiente (por lo menos por 15 minutos).

### MÉTODO ALTERNO DE EXTRACCIÓN

1. Prepare la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Prepare una solución de trabajo añadiendo 125 mL de solución para extracción dentro del recipiente y agregando una cucharada de aditivo para extracción y mezcla.
3. Caliente la solución de trabajo a 60°C (140°F) utilizando una placa caliente, incubadora, horno microondas, baño de agua o equivalente. Utilice un termómetro para verificar que la temperatura esté correcta.
4. Transfiera 1 g de muestra o 1 mL de muestra líquida, a un tubo de 50 mL.
5. Vierta 25 mL de la solución de extracción de trabajo a 60°C (140°F) dentro del tubo de muestra y tápelos.
6. Extraiga agitando con el vortex durante 3 minutos. Tenga precaución, pues el líquido está caliente.
7. Permita que el material repose por 5 minutos.
8. Use una pipeta desechable para transferir aproximadamente 1 mL del sobrenadante (la porción superior de líquido del extracto) a un frasco de muestras con gotero. Coloque inmediatamente una etiqueta y la punta del gotero en el frasco.
9. Empiece el procedimiento de la prueba una vez que la muestra se haya enfriado a temperatura ambiente (por lo menos por 15 minutos).

### PREPARACION Y EXTRACCION PARA HISOPOS AMBIENTALES

1. Preparar la solución de extracción como se describe en las notas de procedimiento.
2. Prepare la solución de trabajo combinando 125 mL de la solución de extracción en un contenedor separado y agregue una cucharada del aditivo para el alérgeno. Prepare una solución de trabajo fresca diariamente. **NOTA:** Prepare 125 mL de solución de trabajo por cada 25 hisopos ambientales.
3. Precaliente la solución de trabajo a 60°C (140°F). Agite el recipiente para disolver el aditivo.
4. Colecte la muestra con un hisopo, usando uno de los siguientes métodos:

**Para superficies secas:** Abra un nuevo hisopo y remójelo con la solución de extracción. Frote en un área de 10 cm X 10 cm usando una técnica de cuadrícula. (No humedezca los hisopos con la solución de trabajo).

**Para superficies húmedas:** Abra un nuevo hisopo y frótelo en un área de 10cm x 10cm usando una técnica de cuadrícula. No humedezca el hisopo antes de su uso.

5. Regrese el hisopo a su tubo original una vez efectuada la muestra. Recuerde marcar cada tubo.
6. Retire el hisopo del tubo, y adicione 5 mL de solución de trabajo a 60°C al tubo. Mezcle colocando el hisopo en el tubo y agite durante 2 minutos en la mano (invirtiendo el tubo), o por 30 segundos con un mezclador.
7. Retire el hisopo del tubo.
8. Coloque un nuevo punto de gotero en el tubo. La solución en el tubo ahora sirve como una muestra. **NOTA:** Tenga cuidado al invertir el tubo, un poco de líquido puede gotear.

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Permita que el kit de pruebas y todos los reactivos alcancen una temperatura ambiental entre 18–30°C (64–86°F) antes de usarlos.

1. Retire de la bolsa metálica 1 micropocillo para cada muestra que se va a analizar más 1 micropocillo para el control y colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Mezcle cada reactivo revolviendo su frasco de reactivo antes de usarlo.
3. Transfiera con pipeta de 100 µL de un frasco de control con etiqueta amarilla (*elija el control de 5 ppm o 10 ppm suministrado—consulte la nota de procedimientos No. 1*) al primer micropocillo. Añada tres gotas, o la pipeta de 100 µL, de cada extracto de muestras a un micropocillo respectivo como se indica en la plantilla siguiente. Mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.

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

4. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
5. Sacuda para sacar el contenido de los micropocillos. Con una piseta de lavado conteniendo solución buffer de lavado, llene cada micropocillo y sacuda para sacar el contenido. **Repita este procedimiento por 10 veces.** Retire el excedente buffer de lavado invirtiendo los micropocillos y golpeándolos vigorosamente sobre una toalla absorbente.
6. Transfiera con pipeta de 100 µL del frasco de conjugado con etiqueta azul a cada micropocillo. Mezcle durante 20 segundos deslizando estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
7. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
8. Sacuda para sacar el contenido de los micropocillos. Con un frasco de lavado lleno con solución buffer de lavado, llene cada micropocillo y agite para sacar el contenido. **Repita este procedimiento por 10 veces.** Retire el excedente de buffer de lavado invirtiendo los micropocillos y golpeándolos vigorosamente sobre una toalla absorbente.
9. Añada a cada micropocillo 3 gotas del frasco gotero de sustrato con etiqueta verde. Mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
10. Incube durante **10 minutos** a temperatura ambiente 18–30°C (64–86°F).
11. Añada a cada micropocillo 3 gotas del frasco gotero de solución detenedora Red Stop con etiqueta roja. Mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Los resultados están listos ahora para ser interpretados.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Compare visualmente el color de un micropocillo de muestras con el color del micropocillo de control. Si el micropocillo de muestras tiene **más color azul** que el micropocillo de control, la muestra resulta positiva para contaminación con proteína de leche de **más de 5 ppm (o 10 ppm, dependiendo del control utilizado)**. Si el micropocillo de muestras tiene **menos color azul o más color rojo** que el micropocillo de control, la muestra contiene **menos de 5 ppm (10 ppm)** de contaminación con proteína de leche.

**Alternativa:** Primero seque los fondos de los micropocillos con una toalla o paño seco y lea el resultado en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Si el micropocillo de muestras tiene una densidad óptica (DO) superior al micropocillo de control, la muestra resulta positiva para contaminación de leche de más de 5 ppm (10 ppm). Si el micropocillo de muestras tiene una DO inferior que el micropocillo de control, la muestra contiene menos de 5 ppm (10 ppm) de contaminación con proteína de leche.

## CARACTERÍSTICAS DEL DESEMPEÑO

**Detección de alérgenos:** Esta prueba detecta las proteínas de caseína y suero de leche de vaca, cabra y oveja. Los resultados se expresan en términos de detección de leche en polvo deshidratada sin grasa (NDFM, por sus siglas en inglés).

## SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE

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

## DISPONIBILIDAD DE LAS FICHAS DE SEGURIDAD (SDS)

Usted puede obtener la ficha de seguridad para este kit y para todos los kits analíticos de Neogen en [www.neogen.com](http://www.neogen.com), o llamando a los números +1 800/234-5333 ó +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 replazo 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.

## EQUIPOS ANALÍTICOS DISPONIBLES DE NEOGEN

### Toxinas naturales

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

### Bacterias presentes en alimentos

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *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 de proteína

### Alérgenos en alimentos

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

### Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

### Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, concentrados para animales

### Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas



Distributed by:



800-826-8302 nelsonjameson.com

### Norteamérica

#### Oficinas Corporativas de Neogen

620 Leshar Place, Lansing, MI 48912, EE.UU.

+1 800-234-5333 (EE.UU./Canadá) ó

+1 517-372-9200

Fax: +1 517-372-2006

foodsafety@neogen.com

www.neogen.com

### Europa, Medio Oriente y África

#### Neogen Europe

The Dairy School, Auchincruive, Ayr

KA6 5HU Escocia, Reino Unido

+ 44 (0) 1292 525 600

Fax: + 44 (0) 1292 525 601

info\_uk@neogeneurope.com

www.neogen.com

### México

#### Neogen Latinoamérica

Prolongación 5 de Mayo #27

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