

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox® para Fumonisina

Prueba Cuantitativa Método Oficial de la AOAC 2001.06

REFRIGÉRESE A 2–8°C • NO CONGELAR

LA TOXINA

Las fumonisinas fueron descubiertas en 1989 y son parte de la familia de micotoxinas producidas por diferentes especies del moho de *Fusarium*. Estos mohos infectan comúnmente el maíz (en realidad, se consideran siempre presentes en el maíz) y el arroz, por lo tanto, el potencial de que la fumonisina se encuentre en los alimentos concentrados para animales y los productos alimentarios es alto. Las fumonisinas afectan a varios animales de maneras diferentes y se han relacionado con el cáncer de esófago en los seres humanos. La Agencia de Protección Ambiental clasifica a las fumonisinas como cancerígenos de categoría II-B.

Los caballos son extremadamente sensibles a bajas cantidades de fumonisina, lo cual puede causar leucoencefalomalacia (licuefacción del cerebro). Investigaciones llevadas a cabo en porcinos demuestran que las fumonisinas atacan el sistema cardiopulmonar causando edema pulmonar, así como lesiones en el hígado y páncreas.

La Dirección General de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha emitido una guía definitiva para la totalidad de fumonisinas ($FB_1 + FB_2 + FB_3$) en alimentos para consumo humano y alimentos concentrados para animales:

ALIMENTOS PARA HUMANOS (fumonisinas totales)

Productos de maíz seco degerminados, deshidratados y molidos	2 ppm
Productos de maíz completamente/parcialmente molidos secos degerminados, salvado de maíz molido y seco, maíz limpio para producción en gran escala.....	4 ppm
Maíz limpio para palomitas de maíz	3 ppm

ALIMENTOS/CONCENTRADOS PARA ANIMALES (maíz/subproductos del maíz, fumonisinas totales)

Équidos y conejos	5 ppm en $\leq 20\%$ de la dieta
Porcinos y bagres	20 ppm en $\leq 50\%$ de la dieta
Rumiantes de cría, aves de corral de cría	
visones de cría	30 ppm en $\leq 50\%$ de la dieta
Rumiantes ≥ 3 meses de edad criados para la matanza y	
visón criado para la producción de pieles.....	60 ppm en $\leq 50\%$ de la dieta
Aves de corral criadas para la matanza.....	100 ppm en $\leq 50\%$ de la dieta
Todas las demás especies o clases de ganado y animales domésticos.....	10 ppm en $\leq 50\%$ de la dieta

PROPÓSITO DE USO

El kit de Veratox® para Fumonisinina es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas directo y competitivo (CD-ELISA) en un formato de micropocillos para el análisis cuantitativo de fumonisina en productos tales como el maíz, la harina de maíz y el arroz.

USUARIO PREVISTO

La prueba de Veratox para Fumonisinina ha sido diseñada para el uso por el personal responsable del control de la calidad y demás personas familiarizadas con alimentos para consumo humano y/o alimentos para animales que posiblemente estén contaminados con fumonisina. Debido a que la técnica es muy importante, los operadores deben contar con capacitación realizada por un representante de Neogen o por una persona que haya completado dicha capacitación.

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

La prueba de Veratox para Fumonisina permite al usuario obtener concentraciones exactas en partes por millón (ppm). Se permite que la fumonisina libre de las muestras y controles compita con la fumonisina enzimomarcada (el conjugado) por los sitios de absorción de los anticuerpos. Tras un lavado, se agrega un sustrato que reacciona con el conjugado absorbido para producir el color azul. Más color azul significa menos fumonisina. El análisis se lee en un lector para micropocillos para obtener densidades ópticas. Cuando las densidades ópticas de los controles han formado la curva típica, se traza un gráfico de las densidades ópticas de la muestra contra dicha curva para calcular la concentración exacta de fumonisina.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Este kit de prueba puede ser utilizado hasta la fecha de expiración mostrada en la etiqueta, si se conserva refrigerado a 2–8°C (35–46°F).

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 micropocillos tapizados con anticuerpos
2. 48 micropocillos para mezclar marcados en rojo
3. 5 botellas con etiqueta amarilla de 0, 1, 2, 4 y 6 ppm (consulte la sección de **Precauciones** para el manejo de la solución de metanol)
4. 1 botella con etiqueta azul de solución de conjugado de fumonisina-y peroxidasa de rábano (HRP)
5. 1 botella con etiqueta verde de solución de sustrato K-Blue®
6. 1 botella con etiqueta roja de solución detenedora Red Stop
7. 1 kit de dilución, conteniendo 40 botellas de dilución pre llenadas con 7.9 mL de una solución de metanol/agua al 10% (botellas de dilución no vienen incluidas con el Producto Neogen 8831)

MATERIALES RECOMENDADOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Materiales de extracción (productos de la letra “d” a la letra “f” están disponibles en forma de kits de Neogen, Producto Neogen 8052):
 - a. Solución de metanol al 70% (Producto Neogen 8055, 8056) o metanol de grado ACS
 - b. Agua destilada o desionizada
 - c. Probeta graduada de 250 mL (Producto Neogen 9368)
 - d. Recipiente de 125 mL de capacidad (Producto Neogen 9428, 9428B)
 - e. Jeringas con filtro Neogen, papel de filtro Whatman n.º 1 o equivalente (Producto Neogen 9420/9430)
 - f. Tubos para la colección de muestras (Producto Neogen 9421, 9421B)
2. Mezcladora o licuadora de alta velocidad (Producto Neogen 9493, 9477)
3. Trituradora Agri-Grind o equivalente (Producto Neogen 9401/9453)
4. Balanza o báscula con capacidad de 2–25 g $\pm$ 0.1 g (Producto Neogen 9427)
5. Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
6. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
7. Pipeta, 100 μ L (Producto Neogen 9272, 9290)
8. Puntas de pipeta para pipetas de 100 μ L y pipetas de 12 canales (Producto Neogen 9410, 9407, 9417)
9. Toallas de papel o material absorbente equivalente
10. Balde plástico de medio galón para desechar los desperdicios
11. Soporte para micropocillos (Producto Neogen 9402)
12. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
13. Marcador a prueba de agua
14. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
15. 2 botes de reactivos para pipetas de 12 canales (Producto Neogen 9450)
16. Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

1. La solución de metanol es muy inflamable. Cierre bien el recipiente y manténgalo alejado del calor, chispas, llamas abiertas y personas fumadoras. Este producto es tóxico si es ingerido o el vapor es inhalado. Evite el contacto con la piel.
2. Almacene el kit de prueba a 2–8°C (35–46°F) cuando no lo utilice. No congele.
3. Permita que el kit alcance una temperatura ambiental de 18–30°C (64–86°F) antes de su uso.
4. Evite el almacenamiento prolongado de los kits a temperatura ambiental.
5. No utilice los componentes de esta prueba después de su fecha de vencimiento.
6. No mezcle los reactivos de una serie de kits con reactivos de una serie diferente.
7. No utilice más de 24 micropocillos por prueba.
8. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas, incluyendo el cebado de las puntas.
9. El uso de períodos de incubación distintos a los especificados puede dar lugar a lecturas erradas y resultados inexactos.

10. Trate todos los líquidos utilizados (incluso el extracto de muestra) y los objetos del laboratorio como si estuvieran contaminados con fumonisina. Utilice siempre guantes y demás prendas protectoras al manejar los productos.
11. Para evitar contaminaciones cruzadas, además de utilizar puntas de pipeta y recipientes de vidrio limpios para cada muestra, lave escrupulosamente todos los recipientes de vidrio entre una muestra y la siguiente.
12. Los productos analizados deben tener un pH de 6–8. Las muestras excesivamente ácidas o alcalinas deben ajustarse. Por favor contacte a su representante de Neogen o al Dpto. de Servicios Técnicos para obtener instrucciones acerca del ajuste de pH.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato:** El sustrato K-Blue está listo para uso. El sustrato debe ser transparente— deséchelo si se ha tornado azul. Vierta sólo el volumen necesario de sustrato en el bote de reactivo. **No devuelva al frasco el sustrato que no haya utilizado.** Cubra el bote de reactivos para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
2. **Micropocillos 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 extraer las muestras y cuando el procedimiento de análisis esté listo para empezar.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

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

1. Si Ud. no está utilizando la solución preparada de Neogen, prepare una solución de metanol al 70% mezclando 7 partes de metanol de grado ACS con 3 partes de agua destilada o desionizada para cada muestra que vaya a ser analizada.
2. Obtenga una muestra representativa. Triture la muestra de modo que al menos el 75% del material pase a través de un tamiz de malla 20. Las partículas deben un tamaño de grano muy fino como las de café instantáneo.
3. Extraiga una ración de 1 parte de muestra con 5 partes de metanol al 70%. Mezcle 25 g de muestra molida con 125 mL de metanol al 70% por **2 minutos** en una mezcladora de alta velocidad.

ALTERNATIVA: Agregue 5 gramos de la muestra molida a 25 mL de metanol al 70% y agite vigorosamente durante **3 minutos**.

4. Filtre el extracto vertiendo por lo menos 5 mL a través de un filtro Whatman n.º1 (o una jeringa con filtro de Neogen) y recolectando el líquido filtrado como muestra.
5. Diluya la muestra agregando 100 µL de extracto a una botella de dilución precargada con la muestra y mezcle bien agitándola en forma circular. La muestra ya está lista para ser analizada sin necesidad de realizar otra preparación. Repita este procedimiento para cada muestra, asegurándose de marcar cada botella.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

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

0	1	2	4	6	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

6. Mediante el uso de una pipeta de 12 canales, mezcle el líquido pipeteando de arriba y hacia abajo 3 veces. Transfiera 100 µL a los micropocillos tapizados con anticuerpos. Mezcle por **10–20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos hacia atrás y hacia adelante cuidando de no derramar o salpicar los reactivos contenidos en los micropocillos. Incube los micropocillos por **10 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F). Deseche los micropocillos de mezcla marcados en rojo.

7. Extraiga el contenido de los micropocillos sacudiéndolos. Llénelos con agua destilada o desionizada y deseche dicha agua sacudiéndolos. Repita esta operación cinco veces, luego invierta los pocillos y golpéeelos ligeramente sobre una toalla de papel, hasta que salga el agua restante.
8. Vierta el volumen necesario de sustrato del frasco con etiqueta verde dentro del bote de reactivos con una etiqueta del mismo color.
9. Utilizando una pipeta de 12 canales con puntas nuevas, cebe las puntas y pipetee 100 µl de sustrato en los micropocillos, mezcle por **10–20 segundos** deslizando el soporte para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
10. Incube por **10 minutos**. Deseche el sustrato restante y enjuague el bote de reactivos con agua.
11. Vierta la solución detenidora Red Stop del frasco con etiqueta roja dentro del bote de reactivos con una etiqueta del mismo color.
12. Expulse el exceso de sustrato de la pipeta de 12 canales, prepare las puntas y pipetee 100 µL de la solución detenidora Red Stop a cada micropocillo. Mezcle deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana. Deseche las puntas.
13. Pase un paño seco o toalla absorbente por el exterior de los micropocillos y lea en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Elimine las burbujas de aire, pues podrían perjudicar los resultados analíticos. Los resultados deberán leerse dentro de los 20 minutos siguientes a la adición de la solución detenidora Red Stop.
14. Lea y calcule los resultados mediante el lector de micropocillos de Neogen o su equivalente. Si utiliza un lector EL301 u otro lector de placa/tiras, calcule los resultados mediante el software Veratox de Neogen para Windows.

REPETICIÓN DE LA PRUEBA

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección: 0,2 ppm (determinado por el promedio de 10 muestras de fumonisina libre más 2 desviaciones estándar).

Límite de cuantificación: 1 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo sobre la curva de calibración en el que esta prueba puede detectar fumonisina en una forma fiable).

Rango de cuantificación: 1–6 ppm (para cuantificar las muestras con más de 6 ppm, solicite las instrucciones para las diluciones al Dpto. de Servicios Técnicos de Neogen).

Matrices validadas: Cebada, pulpa de remolacha*, maíz, harina de maíz, harina de germen de maíz*, harina de gluten de maíz*, mezcla de maíz y soja, granos secos de destilería*, maíz remojado*, grano seco usado en destilería con solubles, grano compactado húmedo usado en destilería, mijo, milo, sorgo, avena, cascarillas de avena, avena negra, fibra de arvejas, alimento para mascotas, palomitas de maíz, papas blancas, gluten de arroz, cascarillas de arroz, arroz con cáscara, centeno, soja hidrolizada, granos de soja, harina de granos de soja, harina de girasol, trigo y salvado de trigo.

**Puede requerir un ajuste de pH.*

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

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE

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

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

Ud. puede obtener las fichas de seguridad de los materiales para esta prueba analítica y para todos los kits de prueba de Neogen en www.neogen.com, o llamando a los números +1 800-234-5333 o +1 517-372-9200

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html para los términos y condiciones completos de Neogen.

GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un remplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgo resultante del uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comercialización de este producto o del rendimiento del mismo para ningún propósito. Neogen no se hará responsable por daños y perjuicios, incluyendo daños especiales o consecuentes, o gastos derivados directa o indirectamente por el uso de este producto.