

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox®

para Histamina

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



HISTAMINA

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

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

USO PREVISTO

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

USUARIO PREVISTO

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

ALMACENAMIENTO

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

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

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

MATERIALES PROPORCIONADOS

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

MATERIALES RECOMENDADOS, PERO NO PROPORCIONADOS

1. Kit de extracción de Veratox para Histamina (producto Neogen 9510) – contiene 38 botellas, 38 jeringuillas con filtro y 38 tubos
2. Botellas desechables con capacidad de 125 mL (producto Neogen 9398)
3. Jeringuilla con filtro para histamina (producto Neogen 9420H), filtro de papel Whatman N° 1 (producto Neogen 9430), centrifuga o equivalente
4. Tubos para recolección de muestras (producto Neogen 9421, 9421B)
5. Cilindro graduado de 100 mL
6. Licuadora
7. Gradilla para tubos de ensayo (producto Neogen 9440)
8. Tubos graduados de 15 mL (producto Neogen 9474)
9. Balanza capaz de pesar 10–50 gramos (producto Neogen 9427)
10. Lector de micropocillos con filtro de 650 nm (producto Neogen 9303)
11. Pipeta de 12 canales (producto Neogen 9273)
12. Pipeta de 100 µL (producto Neogen 9272)
13. Puntas para pipeta de 12 canales y de 100 µL (producto Neogen 9410, 9407, 9417)
14. Toallas de papel absorbente o de un material equivalente
15. Gradilla para micropocillos (producto Neogen 9402)
16. Cronómetro (producto Neogen 9426)
17. Marcador a prueba de agua
18. Piseta de lavado (producto Neogen 9400)
19. Botella de 1 L con tapa (producto Neogen 9472)
20. 2 botes de reactivos para usar con una pipeta de 12 canales (producto Neogen 9435)
21. Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

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

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

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A. Atún enlatado y en bolsas: AOAC 937.07b

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

B. Pescado crudo fresco o descongelado: AOAC 937.07a

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

C. Muestras secas (ejemplo: harina de pescado)

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

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Si está usando el Kit de Extracción de Veratox para Histamina de Neogen (Producto Neogen 9510), siga las instrucciones de ese kit. De lo contrario, continúe con las instrucciones que siguen.

NOTA: Los productos de vidrio no se deben utilizar para fines de extracción, ya que la histamina puede adherirse al vidrio.

Muestras líquidas/húmedas

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

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

Muestras secas

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

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

DILUCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS MUESTRAS

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

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

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

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

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

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

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

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

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

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

REPETICIÓN DE LA PRUEBA

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

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

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

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

*Matriz validada por el AOAC-RI

SERVICIO AL CLIENTE

Puede contactar los Servicios Técnicos y Asistencia al Cliente de Neogen usando la información de contacto en la parte posterior de este folleto. Entrenamiento para este producto, y para todos los kits de Neogen, está disponible.

INFORMACIÓN DE HOJAS DE SEGURIDAD (SDS) DISPONIBLE

Las Hojas de Seguridad (SDS) para este kit, y para todos los kits de Neogen, están disponibles en la página electrónica de Neogen foodsafety.neogen.com/sp, o llamando a Neogen al +1 800/234-5333 o +1 517/372-9200.

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite www.neogen.com/sp/terms-and-conditions 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 reemplazo 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.