

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®]

for Clenbuterol

CLENBUTEROL

Clenbuterol is a beta agonist with some structural and pharmacological similarities to ractopamine and zilpaterol, but its effects are more potent and longer lasting. Clenbuterol increases the rate at which body fat is metabolized while increasing the body's basal metabolic rate (BMR). It is commonly used for smooth muscle-relaxant properties as a bronchodilator and tocolytic.

Clenbuterol is not approved for use in food producing animals in many countries like the U.S., Canada and Mexico. FDA lists clenbuterol as a prescription only, restricted-use drug for the treatment of horses. In addition, clenbuterol is a therapeutic drug for asthma, approved for human use in some countries in Europe (Bulgaria and Russia) and Asia (China).

INTENDED USE

Veratox[®] for Clenbuterol is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol in urine, muscle, liver, kidney and serum. Veratox for Clenbuterol enables international and government regulatory agencies, food manufacturers and processors, as well as quality assurance organizations, to detect clenbuterol in urine, muscle, liver, kidney and serum in response to customer concerns about food safety. Veratox for Clenbuterol is an accurate, rapid, cost-effective and easy-to-use diagnostic tool compared to instrument based diagnostics like LC-MS-MS. The unique features of the kit are:

- Rapid sample prep without a column
- High sensitivity and specificity
- A quick ELISA assay (just over 1.5 hours)

ASSAY PRINCIPLES

The method is based on a competitive colorimetric ELISA assay. The clenbuterol antibody has been coated in the plate wells. During the analysis, sample is added along with the clenbuterol-horseradish peroxidase (Clenbuterol-HRP) conjugate. If the clenbuterol residue is present in the sample, it will compete for the clenbuterol antibody, thereby preventing the Clenbuterol-HRP from binding to the antibody attached to the well. The resulting color intensity, after addition of the HRP substrate (TMB), has an inverse relationship with the clenbuterol residue concentration in the sample.

Veratox for Clenbuterol has the capacity for 96 determinations or testing of 36 samples in duplicate (assuming 24 wells for standards). Return any unused microwells to the foil bag and reseal them with the desiccant provided in the original package.

STORAGE REQUIREMENTS

Store kit at 2–8°C (35–46°F). Some components should be stored at frozen temperatures if not used within 1 month. The shelf life of the kit is 12 months when properly stored.

MATERIALS PROVIDED

Kit Contents	Amount	Storage
Clenbuterol Ab-coated Microtiter Plate	1 x 96-well plate (8 wells x 12 strips)	2–8°C
Clenbuterol Standards: Negative control (white cap tube) 0.04 ng/mL (yellow cap tube) 0.08 ng/mL (orange cap tube) 0.16 ng/mL (pink cap tube) 0.32 ng/mL (purple cap tube) 0.64 ng/mL (blue cap tube) 10 ng/mL (spiking, red cap tube)	1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL	2–8°C
100X Clenbuterol-HRP Conjugate	175 µL	2–8°C*
Clenbuterol-HRP Diluent	20 mL	2–8°C
20X Wash Solution**	28 mL	2–8°C
Stop Buffer**	14 mL	2–8°C
TMB Substrate**	12 mL	2–8°C
Balance Buffer	12 mL	2–8°C
20X Sample Extraction Buffer	10 mL	2–8°C
Sample Balance Buffer I	10 mL	2–8°C
Sample Balance Buffer II (powdered)	62 g	2–8°C
10X PBS	25 mL	2–8°C
Liver Extraction Buffer	10 mL	2–8°C
Serum Extraction Buffer A	12 mL	2–8°C
Serum Balance Buffer B	25 mL	2–8°C

*If the kit will be unused for over 1 month, store 100X Clenbuterol-HRP Conjugate at -20°C or in a freezer.

**These components (within their expiry) can be used interchangeably with other Veratox for Clenbuterol kits.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Microtiter plate reader with a 450 nm filter (Neogen item 9303)
2. 20–200 µL pipettes (Neogen item 9276)
3. Multichannel pipette: 50–300 µL (optional) (Neogen item 9385)
4. Centrifuge 4,000 x g
5. Timer (Neogen item 9426)
6. Wash bottle (Neogen item 9400)
7. Paper towels or equivalent absorbent material
8. Veratox software (Neogen item 9305)
9. Lab station (Neogen item 9481)
10. Distilled or deionized water
11. Blender or food processor to homogenize sample
12. Rotary evaporator or other means to evaporate down a sample
13. Acetonitrile
14. HPLC grade hexane

PRECAUTIONS

Neogen strongly recommends that you read the following warnings and precautions to ensure your full awareness of ELISA techniques and other details you should pay close attention to when running the assays. Periodically, optimizations and revisions are made to the kit and insert. Therefore, it is important to follow the protocol included with the kit. If you need further assistance, you may contact your local distributor or Neogen at foodsafety@neogen.com.

1. The standards contain clenbuterol. Handle with particular care.
2. Do not use the kit past the expiration date.
3. Do not intermix reagents from different kits or lots except for components with the same lot numbers within their expiration dates. CLENBUTEROL-HRP CONJUGATES AND PLATES ARE KIT AND LOT SPECIFIC.
4. Make sure HRP-Conjugate and diluent are mixed in correct volumes.
5. Try to maintain a laboratory temperature of 20–25°C (68–77°F). Avoid running assays under or near air vents, as this may cause excessive cooling, heating and/or evaporation. Also, do not run assays in direct sunlight, as this may cause excessive heat and evaporation. Cold bench tops should be avoided by placing several layers of paper towel or some other insulation material under the assay plates during incubation.
6. Make sure you are using only distilled or deionized water since water quality is very important.
7. Follow proper pipetting techniques, including priming tips by filling and dispensing solution once before use.
8. Incubations of assay plates should be timed as precisely as possible. Be consistent when adding standards to the assay plate. Add your standards first and then your samples.
9. Add standards to plate only in the order from low concentration to high concentration as this will minimize the risk of compromising the standard curve.
10. Always refrigerate plates in sealed bags with a desiccant to maintain stability. Prevent condensation from forming on plates by allowing them to equilibrate to room temperature 20–25°C (68–77°F) while in the sealed bag.

SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

Be sure samples are properly stored. In general, samples should be refrigerated at 2–4°C for no more than 1–2 days. Freeze samples to a minimum of -20°C if they need to be stored for a longer period. Frozen samples can be thawed at room temperature 20–25°C (68–77°F) or in a refrigerator before use. Preparation protocols for samples other than below can be made available upon request. Please contact your local distributor or Neogen at foodsafety@neogen.com.

1. Preparation of 1X Sample Extraction Buffer

Mix 1 volume of 20X Sample Extraction Buffer with 19 volumes of distilled water.

2. Preparation of 1X PBS

Mix 1 volume of 10X PBS Buffer with 9 volumes of distilled water.

3. Preparation of 1X Sample Balance Buffer

Add 10 mL of the Sample Balance Buffer I and 62 g of Sample Balance Buffer II (powdered) to a 250 mL plastic bottle. Add 190 mL of distilled water to the bottle. Mix well to obtain a homogeneous solution.

Urine

1. Centrifuge urine at 4000 x *g* for 5 minutes.
2. Follow step 1 of Procedure A in the ELISA Testing Protocol.

NOTE: The total in each well is 200 µL for the assay.

Dilution factor: 2.

Muscle/Liver/Kidney

1. Remove fat from muscle/liver/kidney. Homogenized the sample with a suitable mixer.
2. Add 2 mL of 1X Sample Extraction Buffer to 1 g of the homogenized sample, vortex for 5 minutes at maximum speed.
3. Add 3 mL of acetonitrile and 2.5 mL of 1X Sample Balance Buffer, 100 µL of Liver Extraction Buffer to the sample. Vortex for 1 minute at maximum speed.
4. Centrifuge for 5 minutes at 4,000 x *g* at room temperature 20–25°C (68–77°F), transfer 900 µL of the supernatant to a new tube.
5. Use a rotary evaporator to dry the sample in a 60°C water bath under reduced pressure. Alternatively, the sample can be dried by blowing nitrogen gas in a 60°C water bath.
6. Add 1 mL of hexane to dissolve the sample and then add 0.6 mL of 1X PBS, vortex for 1 minute at maximum speed.
7. Centrifuge the sample for 5 minutes at 4,000 x *g*, aspirate off the upper hexane layer.
8. Use 100 µL of the lower aqueous layer for the assay.
9. Follow step 1 in Procedure A of the ELISA Testing Protocol.
NOTE: The total in each well is 200 µL for the assay.
Final Dilution factor: 4 (when accounting for ELISA dilution).

Serum

1. To 500 µL of serum in a 1.5-mL micro-centrifuge tube, add 125.0 µL of Serum Extraction Buffer A.
2. Vortex samples for 3 minutes.
3. Centrifuge sample for 5 minutes at maximum speed.
4. Transfer 150 µL of supernatant to a new 1.5-mL micro-centrifuge tube containing 450 µL of Serum Balance Buffer B.
5. Vortex sample for 2 minutes.
6. Centrifuge sample for 5 minutes at maximum speed.
7. Use 200 µL of supernatant per well in the assay.
8. Follow step 1 in Procedure B of the ELISA testing protocol.
NOTE: Dilution factor: 5.25

TEST PROCEDURE

Reagent Preparation

IMPORTANT: All reagents should be brought up to room temperature before use (1–2 hours at 20–25°C / 68–77°F); Make sure you read “Precautions” section on page 3. Solutions should be prepared just prior to ELISA test. All reagents should be mixed by gently inverting or swirling prior to use. Prepare volumes that are needed for the number of wells being run. Do not return the reagents to the original stock tubes/bottles. Using disposable reservoirs when handling reagents can minimize the risk of contamination and is recommended.

1. **Preparation of 1X Wash Solution**
Mix 1 volume of the 20X Wash Solution with 19 volumes of distilled water.
2. **Preparation of 1X Clenbuterol-HRP**
Mix 1 volume of the 100X Clenbuterol-HRP with 99 volumes of the Clenbuterol-HRP Diluent. Prepare just prior to use on the ELISA.
NOTE: The 1X Clenbuterol-HRP should be used within 5 minutes after preparation.

ELISA TESTING PROTOCOL

Label the individual strips that will be used and aliquot reagents as the following example:

Component	Volume per Reaction	24 Reactions
1X Clenbuterol-HRP Conjugate	100 µL	2.4 mL
1X Wash Solution	2.0 mL	48 mL
Stop Buffer	100 µL	2.4 mL
TMB Substrate	100 µL	2.4 mL

PROCEDURE A FOR URINE, MUSCLE, LIVER AND KIDNEY SAMPLES

1. Add 200 µL of each Clenbuterol Standards in duplicate into different sample wells.
NOTE: Add standards to plate only in the order from low concentration to high concentration.
2. Add 100 µL of Balance Buffer to each well corresponding with a sample. Add 100 µL of the sample to the well. Mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute**.
NOTE: The total volume in each well is 200 µL.
3. Incubate the plate for **60 minutes** at room temperature 20–25°C (68–77°F).
4. Aspirate all fluid from each well after the incubation, invert the plate and repeatedly tap the plate on paper towels to dry. Dry the plate with paper towels only.
NOTE: Perform the next step immediately after drying the plate. Do not allow the plate to air dry between working steps.
5. Add 100 µL of fresh prepared 1X Clenbuterol-HRP Conjugate to each well and mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute**.
6. Incubate the plate for **15 minutes** at room temperature 20–25°C (68–77°F).
7. Wash the wells 3 times with 250 µL of 1X Wash Solution per well. After the last wash, invert the plate and gently tap the plate dry on paper towels.
NOTE: Perform the next step immediately after drying the plate. Do not allow the plate to air dry between working steps.
8. Add 100 µL of the TMB Substrate to each well. Start the 15 minute incubation immediately after adding the substrate. Mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute** while incubating. Total incubation time for TMB Substrate is 15 minutes.
NOTE: Do not put any substrate back into the original container to avoid any potential contamination. Any substrate solution exhibiting coloration is indicative of deterioration and should be discarded. Covering the microtiter plate while incubating is recommended.
9. Add 100 µL of Stop Buffer to each well to stop the enzyme reaction.
10. Read the plate as soon as possible following the addition of Stop Buffer on a plate reader with a 450 nm wavelength.
NOTE: Before reading, use a lint-free wipe on the bottom of the plate to ensure no moisture or fingerprints interfere with the readings.

PROCEDURE B FOR SERUM SAMPLES

1. Add 200 μL of each Clenbuterol Standard in duplicate into different sample wells.
NOTE: Add standards to plate only in the order from low concentration to high concentration.
2. Add 200 μL of the sample to the corresponding sample well. Mix by sliding back and forth on a flat surface for 1 minute.
NOTE: The total volume in each well is 200 μL .
3. Incubate the plate for **60 minutes** at room temperature 20–25°C (68–77°F).
4. Wash the wells 2 times with 250 μL of 1X Wash Solution per well after incubation. Invert the plate and repeatedly tap the plate on paper towels to dry. Dry the plate with paper towels only.
NOTE: Perform the next step immediately after drying the plate. Do not allow the plate to air dry between working steps.
5. Add 100 μL of fresh prepared 1X Clenbuterol-HRP Conjugate to each well and mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute**.
6. Incubate the plate for **25 minutes** at room temperature 20–25°C (68–77°F).
7. Wash the wells 3 times with 250 μL of 1X Wash Solution per well. After the last wash, invert the plate and gently tap the plate dry on paper towels.
NOTE: Perform the next step immediately after drying the plate. Do not allow the plate to air dry between working steps.
8. Add 100 μL of the TMB Substrate to each well. Start the 15 minute incubation immediately after adding the substrate. Mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute** while incubating. Total incubation time for TMB Substrate is 15 minutes.
NOTE: Do not put any substrate back into the original container to avoid any potential contamination. Any substrate solution exhibiting coloration is indicative of deterioration and should be discarded. Covering the microtiter plate while incubating is recommended.
9. Add 100 μL of Stop Buffer to each well to stop the enzyme reaction.
10. Read the plate as soon as possible following the addition of Stop Buffer on a plate reader with a 450 nm wavelength.
NOTE: Before reading, use a lint-free wipe on the bottom of the plate to ensure no moisture or fingerprints interfere with the readings.

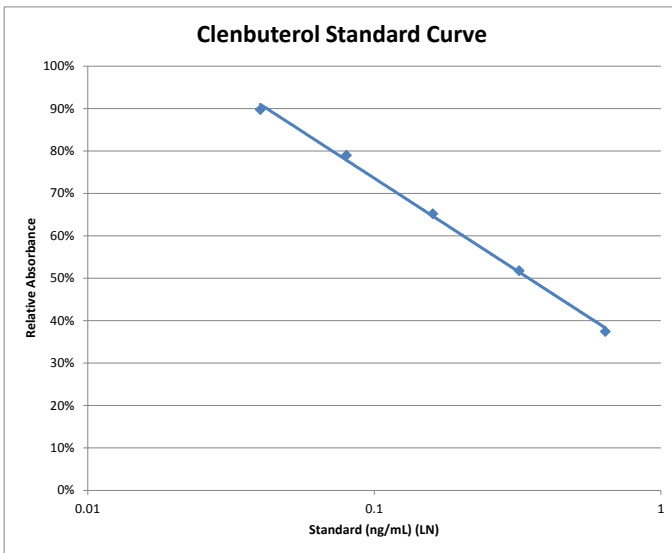
CLENBUTEROL CONCENTRATION CALCULATIONS

A standard curve can be constructed by plotting the mean relative absorbance (%) obtained from each reference standard against its concentration in ng/mL on a logarithmic curve.

$$\text{Relative absorbance (\%)} = \frac{\text{absorbance standard (or sample)} \times 100}{\text{absorbance zero standard}}$$

Use the mean relative absorbance values for each sample to determine the corresponding concentration of the tested drug in ng/mL from the standard curve. Neogen's Veratox Software for Windows is available to calculate test results. Please contact your local distributor or foodsafety@neogen.com for further information.

The following figure is a typical clenbuterol standard curve.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity (Detection Limit)

Sample Type	Detection Limit (ng/g or ppb)
Urine	0.2
Liver/Kidney	0.3
Muscle	0.15
Serum	0.5

Specificity (Cross-Reactivity)

Analytes	Cross-Reactivity (%)
Clenbuterol	100
Mabuterol	36
Brombuterol	33
Clenpenterol	28
Cimbuterol	28
Mapenterol	23
Salbutamol	6
Carbuterol	5
Terbutaline	4
Cimaterol	3
Fenoterol	< 1%
Ractopamine	< 1%
Zilpaterol	< 1%

CUSTOMER SERVICE

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

SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's website at foodsafety.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/en/terms-and-conditions.

WARRANTY

Neogen makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. 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.

OTHER RESIDUE DIAGNOSTICS KITS

RT-96-TT-AMS	Alert for Ractopamine — qualitative microwell assay, 96 wells
9551	Veratox for Chloramphenicol — range 10–1,000 ppt, 96 wells
8416	Veratox for Malachite Green — range 1–4 ppb, 48 wells
DR073	Veratox for Avermectins — range 6.4–300 ppb, 96 wells
DR107	Veratox for Florfenicol — range 0.15–100 ppm, 96 wells
DR081	Veratox for Oxytetracycline — range 3.6–324 ppb, 96 wells



North America
Neogen Headquarters
800/234-5333 (USA/Canada)
foodsafety@neogen.com
foodsafety.neogen.com

Europe, Middle East and Africa
Neogen Europe
+ 44 (0) 1292 525 600
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

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

Brazil
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

© Neogen Corporation, 2018. Neogen, Veratox and K-Blue are registered trademarks of Neogen Corporation, Lansing, MI. All other brand and product names are trademarks or registered trademarks of their respective companies. Patent: <http://www.neogen.com/en/patents>

DR021F

V-Clenbuterol_ES_0318

Por favor lea cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la prueba

Veratox® para Clenbuterol

CLENBUTEROL

El clenbuterol es un beta agonista con algunas semejanzas estructurales y farmacológicas con la ractopamina y el zilpaterol, pero sus efectos son más potentes y duraderos. El clenbuterol incrementa la tasa a la cual se metaboliza la grasa corporal mientras aumenta la tasa metabólica basal del cuerpo (BMR). El clenbuterol se utiliza comúnmente como broncodilatador y tocolítico debido a sus propiedades relajantes del músculo liso.

El Clenbuterol no está aprobado para uso en animales productores de alimentos en muchos países como Estados Unidos, Canadá y México. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) clasifica al clenbuterol como un medicamento de uso restringido, disponible solo con receta, para el tratamiento de los caballos. Además, el clenbuterol es considerado como un medicamento terapéutico para el asma, aprobado para el uso en humanos en algunos países en Europa (Bulgaria y Rusia) y en Asia (China).

USO PREVISTO

La prueba de Veratox® para Clenbuterol es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de clenbuterol en orina, músculos, hígado, riñón y suero. Veratox para Clenbuterol permite a las agencias reguladoras internacionales y gubernamentales, productores de alimentos y procesadores, así como a las organizaciones de garantía de calidad, detectar clenbuterol en orina, músculos, hígado, riñón y suero en respuesta a las preocupaciones del cliente sobre la inocuidad alimentaria. Veratox para Clenbuterol es una herramienta de diagnóstico rápida, precisa, económica y fácil de usar al compararla con instrumentos de diagnóstico como el LC-MS-MS. Las características únicas de este kit son las siguientes:

- Rápida preparación de la muestra sin necesidad de usar una columna
- Alta sensibilidad y especificidad
- Ensayo rápido de ELISA (un poco más de 1.5 horas)

FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS

El método del análisis está basado en un ensayo ELISA colorimétrico competitivo. Los micropocillos han sido recubiertos con un anticuerpo de clenbuterol. Durante el análisis, la muestra se añade junto con el conjugado de peroxidasa de rábano picante con clenbuterol (Clenbuterol-HRP). Si hay residuos de clenbuterol en la muestra, este competirá con el anticuerpo de clenbuterol, previniendo de este modo la unión del Clenbuterol-HRP con el anticuerpo que recubre el interior de los micropocillos. La intensidad de color resultante luego de adicionar el sustrato HRP (TMB), tiene una relación inversa con la concentración residual de clenbuterol presente en la muestra.

La prueba Veratox para Clenbuterol tiene capacidad para trabajar con 96 pruebas o analizar 36 muestras en duplicado (asumiendo 24 micropocillos para los estándares). Regrese a su empaque original los micropocillos sin usar, selle la bolsa y asegúrese de colocar dentro el desecante suministrado.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Almacene este kit de prueba entre 2–8°C (35–46°F). Algunos de los componentes de este kit de prueba pueden ser almacenados en el congelador si no van a ser utilizados por un mes. La vida útil de este kit es de 12 meses si es almacenado adecuadamente.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Contenido del kit	Cantidad	Almacenamiento
Placa de microtitulación recubierta con anticuerpo de Clenbuterol Ab	1 placa con 96 micropocillos (8 micropocillos x 12 tiras)	2–8°C
Estándares del Clenbuterol: Control negativo (tubo con tapa blanca) 0.04 ng/mL (tubo con tapa amarilla) 0.08 ng/mL (tubo con tapa anaranjada) 0.16 ng/mL (tubo con tapa rosa) 0.32 ng/mL (tubo con tapa morada) 0.64 ng/mL (tubo con tapa azul) 10 ng/mL (fortificador en tubo con tapa roja)	1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL 1.8 mL	2–8°C
Conjugado de Clenbuterol-HRP a 100X	175 µL	2–8°C*
Diluyente Clenbuterol-HRP	20 mL	2–8°C
Solución de lavado a 20X**	28 mL	2–8°C
Buffer detenedor**	14 mL	2–8°C
Sustrato TMB**	12 mL	2–8°C
Buffer de equilibrio	12 mL	2–8°C
Buffer para extracción de muestras a 20X	10 mL	2–8°C
Buffer I de equilibrio de muestras	10 mL	2–8°C
Buffer II de equilibrio de muestras (en polvo)	62 g	2–8°C
PBS a 10X	25 mL	2–8°C
Buffer para extracción de riñón	10 mL	2–8°C
Buffer A para extracción de suero	12 mL	2–8°C
Buffer B para equilibrio de suero	25 mL	2–8°C

*Si el kit de prueba no va a ser utilizado por más de un mes, almacene el conjugado Clenbuterol-HRP al 100X a una temperatura de -20°C o en un congelador.

**Estos componentes pueden ser usados alternativamente con otros kits de Veratox para Clenbuterol (dentro de su fecha de vencimiento).

MATERIALES REQUERIDOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Lector de micropocillos con filtro de 450 nm (Producto Neogen 9303)
2. Pipetas de 20–200 µL (Producto Neogen 9276)
3. Pipeta multicanal: 50–300 µL (opcional) (Producto Neogen 9385)
4. Centrífuga 4,000 x g
5. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
6. Piseta de lavado (Producto Neogen 9400)
7. Toallas de papel desechables o de un material absorbente equivalente
8. Software Veratox (Producto Neogen 9305)
9. Estación de laboratorio (Producto Neogen 9481)
10. Agua destilada o desionizada
11. Licuadora o procesador de alimentos para homogeneizar la muestra
12. Evaporador rotatorio u otros medios para evaporar la muestra
13. Acetonitrilo
14. Hexano de grado de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

PRECAUCIONES

Neogen le recomienda encarecidamente que por favor lea las precauciones que aparecen a continuación para garantizar el entendimiento completo de las técnicas del ensayo ELISA y de otros detalles a los que usted debe prestar especial atención al trabajar con esta prueba. Periódicamente se realizan optimizaciones y revisiones del kit y del manual, por lo tanto, es importante siempre seguir el protocolo incluido con el kit. Para obtener mayor información y asistencia, comuníquese con su distribuidor de Neogen o al correo electrónico foodsafety@neogen.com.

1. Los estándares contienen clenbuterol. Maneje con cuidado.
2. No utilice el kit después de su fecha de expiración.
3. No mezcle los reactivos de otros kits o lotes, excepto por componentes con el mismo número de lote dentro de las mismas fechas de expiración. EL CONJUGADO DE CLENBUTEROL-HRP Y LAS PLACAS SON ESPECÍFICOS PARA LOS KITS Y LOTES.
4. Asegúrese de que el conjugado HRP y diluyente sean mezclados en los volúmenes correctos.
5. Trate de mantener la temperatura del laboratorio a 20–25°C (68–77°F). Evite llevar a cabo ensayos debajo o cerca de salidas de aire, ya que pueden causar enfriamiento, calentamiento y/o evaporación excesiva. Además, no lleve a cabo los ensayos bajo luz solar directa, ya que puede causar calor y evaporación excesiva. Se deben evitar las mesas de trabajo frías colocando varias capas de papel toalla u otro material de aislamiento debajo de los platos de ensayo durante la incubación.
6. Asegúrese de solamente usar agua destilada o desionizada, ya que la calidad del agua es muy importante.
7. Siga las técnicas de pipeteo apropiadas, incluyendo la preparación de las puntas de las pipetas llenándolas y dispensando solución antes de usarlas.
8. Las incubaciones de las placas de prueba deben ser cronometradas lo más precisamente posible. Sea consistente al añadir los estándares al plato de ensayo. Añada los estándares primero y luego las muestras.
9. Añada los estándares a las placas en orden de menor a mayor concentración para minimizar el riesgo de afectar la curva estándar.
10. Siempre refrigere los platos en bolsas selladas con desecante para mantener estabilidad. Evite que se forme condensación en los platos permitiéndoles equilibrarse a temperatura ambiente (20–25°C/ 68–77°F) mientras están en la bolsa sellada.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Asegúrese de que las muestras sean almacenadas apropiadamente. En general, las muestras deben ser refrigeradas a 2–4°C por no más de 1–2 días. Congele las muestras a un mínimo de -20°C si necesitan ser almacenadas por un periodo más largo. Las muestras congeladas pueden ser descongeladas a temperatura ambiente 20–25°C (68–77°F) o en un refrigerador antes de usarse. Los protocolos de preparación para las muestras que no aparezcan abajo, están disponibles bajo pedido. Por favor contacte a su distribuidor local o a Neogen mediante foodsafety@neogen.com.

1. **Preparación del buffer de extracción de muestra a 1X**
Mezcle 1 volumen del buffer de extracción de muestras a 20X con 19 volúmenes de agua destilada.
2. **Preparación de PBS a 1X**
Mezcle 1 volumen del buffer PBS a 10X con 9 volúmenes de agua destilada.
3. **Preparación del buffer de equilibrio de muestra a 1X**
Añada 10 mL del buffer de equilibrio de muestras I y 62 g del buffer de equilibrio II de muestras (en polvo) en una botella de plástico de 250 mL. Adicione 190 mL de agua destilada. Mezcle hasta obtener una solución homogénea.

ORINA

1. Centrifugue la orina a 4000 x g por 5 minutos.
2. Siga el paso 1 del Procedimiento A del Protocolo de prueba ELISA.
NOTA: Para el ensayo, el total en cada micropocillo es de 200 µL.
Factor de dilución: 2

MÚSCULO/HÍGADO/RIÑÓN

1. Elimine la grasa del músculo/hígado/riñón. Homogenice la muestra con un mezclador adecuado.
2. Añada 2 mL del buffer de extracción de muestras a 1X a 1 g de la muestra homogeneizada, mezcle con vortex por 5 minutos a máxima velocidad.
3. Añada 3 mL de acetonitrilo, 2.5 mL del buffer de equilibrio de muestra a 1X y 100 µL del buffer de extracción de hígado a la muestra. Mezcle con vortex por 1 minuto a máxima velocidad.
4. Centrifugue por 5 minutos a 4,000 x g a una temperatura ambiente entre 20–25°C (68–77°F), transfiera 900 µL del sobrenadante a un nuevo tubo.
5. Use un evaporador rotatorio para secar la muestra en un baño de maría a 60°C bajo presión reducida. Como alternativa, la muestra puede secarse soplando gas nitrógeno en un baño de agua a 60°C.
6. Añada 1 mL de hexano para disolver la muestra y luego añada 0.6 mL de PBS 1X, mezcle con vortex por 1 minuto a máxima velocidad.
7. Centrifugue la muestra durante 5 minutos a 4,000 x g, aspire toda la capa superior de hexano.
8. Use 100 µL de la capa acuosa inferior para el ensayo.
9. Siga con el paso 1 del protocolo de prueba ELISA.

NOTA: En la prueba, el total en cada micropocillo es de 200 µL.

Factor de dilución final: 4 (cuando se toma en consideración la dilución ELISA).

SUERO

1. Añada 125.0 µL del buffer A de extracción de suero a 500 µL de suero en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Mezcle las muestras con vortex por 3 minutos.
3. Centrifugue la muestra por 5 minutos a máxima velocidad.
4. Transfiera 150 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo que contenga 450 µL del buffer B de equilibrio de suero.
5. Mezcle la muestra con Vortex por 2 minutos.
6. Centrifugue la muestra por 5 minutos a máxima velocidad.
7. Use 200 µL de sobrenadante por micropocillo en el ensayo.
8. Siga el paso 1 del Procedimiento B del Protocolo de prueba ELISA.

NOTA: Factor de dilución: 5.25

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Preparación del reactivo

IMPORTANTE: Todos los reactivos deben alcanzar una temperatura ambiente antes de su uso (1–2 horas a 20–25°C/68–77°F); Asegúrese de leer la sección “Precauciones” de la página 11. Las soluciones deben ser preparadas justo antes del ensayo ELISA. Todos los reactivos deben ser mezclados invirtiéndolos o revolviéndolos suavemente antes de su uso. Prepare los volúmenes que sean necesarios para el número de pozos que vayan a ser analizados. No regrese los reactivos a sus tubos/botellas de reserva original. Se recomienda usar reservorios desechables al manejar reactivos, ya que puede minimizar el riesgo de contaminación.

1. **Preparación de solución de lavado a 1X**
Mezcle 1 volumen de solución de lavado a 20X con 19 volúmenes de agua destilada.
2. **Preparación de Clenbuterol-HRP a 1X**
Mezcle 1 volumen de Clenbuterol-HRP a 100X con 99 volúmenes del diluyente de Clenbuterol-HRP. Prepárelo justo antes de usarse en la prueba ELISA.

NOTA: El Clenbuterol-HRP a 1X debe ser usado dentro de 5 minutos luego de ser preparado.

PROTOCOLO DE LA PRUEBA ELISA

Etiquete las tiras individuales que serán utilizadas y realice la alícuota de los reactivos como se describe a continuación:

Componente	Volumen por reacción	24 Reacciones
Conjugado de Clenbuterol-HRP a 1X	100 µL	2.4 mL
Solución de lavado a 1X	2.0 mL	48 mL
Buffer detenedor	100 µL	2.4 mL
Sustrato TMB	100 µL	2.4 mL

PROCEDIMIENTO A PARA MUESTRAS DE ORINA, MÚSCULO, HÍGADO Y RIÑÓN

- Añada 200 µL de cada estándar de Clenbuterol en duplicado a diferentes micropocillos de muestra.
NOTA: Añada los estándares a la placa solamente en orden de menor a mayor concentración.
- Añada 100 µL del buffer de equilibrio a cada micropocillo correspondiente con una muestra. Añada 100 µL de la muestra al micropocillo. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante en una superficie plana por **1 minuto**
NOTA: El volumen total de cada micropocillo es de 200 µL.
- Incuba la placa durante **60 minutos** a temperatura ambiente entre 20–25°C (68–77°F).
- Luego de la incubación, aspire todo el fluido de cada micropocillo, invierta la placa y golpéela gentilmente sobre toallas de papel para secarlas. Seque la placa solamente con toallas de papel.
NOTA: Realice el siguiente paso inmediatamente después de secar la placa. No permita que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
- Añada 100 µL del conjugado Clenbuterol-HRP a 1X recién preparado a cada pocillo y mezcle deslizando hacia adelante y hacia atrás en una superficie plana por **1 minuto**.
- Incuba la placa por **15 minutos** a temperatura ambiente entre 20–25°C (68–77°F).
- Lave los pocillos 3 veces con 250 µL de solución de lavado a 1X por pocillo. Luego del último lavado, invierta la placa y sacúdala ligeramente sobre toallas de papel para secarla.
NOTA: Realice el siguiente paso inmediatamente después de secar la placa. No permita que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
- Añada 100 µL del sustrato TMB a cada pocillo. Comience la incubación de 15 minutos inmediatamente después de añadir el sustrato. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana durante **1 minuto** mientras está incubando. El tiempo de incubación total para el sustrato TMB es de 15 minutos.
NOTA: Para evitar contaminación, no regrese el sustrato restante a su envase original. Cualquier solución de sustrato que presente color, indica deterioro o contaminación y debe ser descartado. Se recomienda cubrir el plato de microtitulación mientras se incuba.
- Añada 100 µL del buffer detenedor a cada pocillo para detener la reacción enzimática.
- Lea la placa lo antes posible luego de la adición del buffer detenedor usando un lector de placas de microtitulación con una longitud de onda de 450 nm.
NOTA: Antes de leer, use una toalla sin pelusa para eliminar la humedad o huellas que hayan en el plato que puedan interferir con las lecturas.

PROCEDIMIENTO B PARA MUESTRAS DE SUERO

1. Añada 200 µL de cada estándar de Clenbuterol en duplicado a diferentes micropocillos de muestra.
NOTA: Añada los estándares a la placa solamente en orden de menor a mayor concentración.
2. Añada 200 µL de la muestra al pocillo de muestra correspondiente. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante en una superficie plana por **1 minuto**
NOTA: El volumen total de cada micropocillo es de 200 µL.
3. Incube la placa durante **60 minutos** a temperatura ambiente entre 20–25°C (68–77°F).
4. Lave los pocillos 2 veces con 250 µL de solución de lavado a 1X luego de la incubación. Invierta la placa y golpéela gentilmente sobre toallas de papel para secarlas. Seque la placa solamente con toallas de papel.
NOTA: Realice el siguiente paso inmediatamente después de secar la placa. No permita que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
5. Añada 100 µL del conjugado Clenbuterol-HRP a 1X recién preparado a cada pocillo y mezcle deslizando hacia adelante y hacia atrás en una superficie plana por **1 minuto**.
6. Incube la placa por **25 minutos** a temperatura ambiente entre 20–25°C (68–77°F).
7. Lave los pocillos 3 veces con 250 µL de solución de lavado a 1X por pocillo. Luego del último lavado, invierta la placa y sacúdala ligeramente sobre toallas de papel para secarla.
NOTA: Realice el siguiente paso inmediatamente después de secar la placa. No permita que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
8. Añada 100 µL del sustrato TMB a cada pocillo. Comience la incubación de 15 minutos inmediatamente después de añadir el sustrato. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana durante **1 minuto** mientras está incubando. El tiempo de incubación total para el sustrato TMB es de 15 minutos.
NOTA: Para evitar contaminación, no regrese el sustrato restante a su envase original. Cualquier solución de sustrato que presente color, indica deterioro o contaminación y debe ser descartado. Se recomienda cubrir el plato de microtitulación mientras se incuba.
9. Añada 100 µL del buffer detenedor a cada pocillo para detener la reacción enzimática.
10. Lea la placa lo antes posible luego de la adición del buffer detenedor usando un lector de placas de microtitulación con una longitud de onda de 450 nm.
NOTA: Antes de leer, use una toalla sin pelusa para eliminar la humedad o huellas que hayan en el plato que puedan interferir con las lecturas.

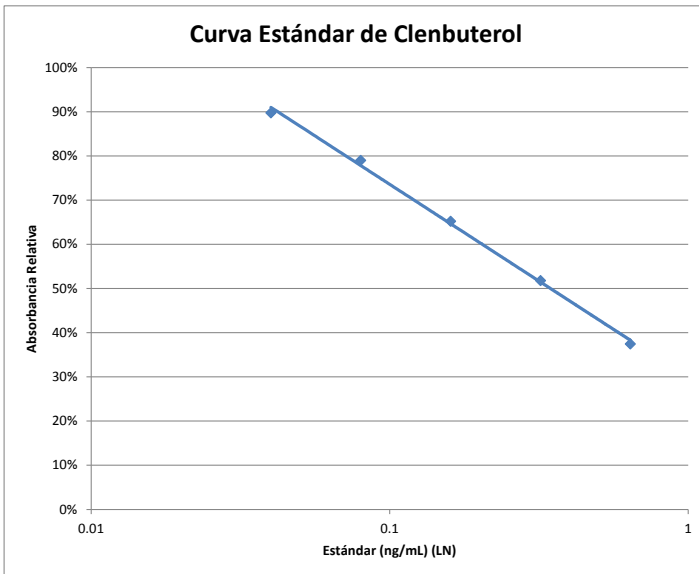
CÁLCULOS DE LA CONCENTRACIÓN DE CLENBUTEROL

Una curva estándar es construida graficando la absorbancia relativa media (%) obtenida a partir de cada estándar de referencia contra su concentración en ng/mL en una escala logarítmica.

$$\text{Absorbancia relativa (\%)} = \frac{\text{absorbancia estándar (o muestra)} \times 100}{\text{absorbancia del estándar cero}}$$

Use los valores de la absorbancia relativa media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente del medicamento analizado en ng/mL (ppb) de la curva estándar. El software Veratox para Windows está disponible bajo pedido para calcular los resultados de prueba. Por favor contacte a su distribuidor local o a Neogen a través de foodsafety@neogen.com.

La siguiente figura es una curva estándar típica de clenbuterol:



CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad (Límite de detección)

Tipo de muestra	Límite de detección (ng/g o ppb)
Orina	0.2
Hígado/Riñón	0.3
Músculo	0.15
Suero	0.5

Especificidad (Reactividad cruzada)

Analitos	Reactividad cruzada (%)
Clenbuterol	100
Mabuterol	36
Brombuterol	33
Clenpenterol	28
Cimbuterol	28
Mapenterol	23
Salbutamol	6
Carbuterol	5
Terbutalina	4
Cimaterol	3
Fenoterol	< 1%
Ractopamina	< 1%
Zilpaterol	< 1%

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. No hay garantía de comerciabilidad para 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.

OTROS KITS DIAGNÓSTICOS DE RESIDUOS

RT-96-TT-AMS	Alert para Ractopamina — ensayo de micropocillos cualitativo, 96 micropocillos
9551	Veratox para Cloranfenicol — rango de 10–1,000 ppt, 96 micropocillos
8416	Veratox para Verde Malaquita — rango de 1–4 ppb, 48 micropocillos
DR073	Veratox para Avermectinas — rango de 6.4–300 ppb, 96 micropocillos
DR107	Veratox para Florfenicol — rango de 0.15–100 ppm, 96 micropocillos
DR081	Veratox para Oxitetraciclina — rango de 3.6–324 ppb, 96 micropocillos



Norteamérica
Oficinas Corporativas de Neogen
+1 800/234-5333 (EEUU/Canadá)
foodsafety@neogen.com
foodsafety.neogen.com

Europa, Medio Oriente y Africa
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