

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®] for Sulfonamide

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

SULFONAMIDE

Sulfonamides are a class of antibiotics used in both feed and water for the treatment of intestinal infections and other diseases in food producing animals. Sulfonamide residues can occur in food of animal origin. A maximum residue limit (MRL) for all substances of the sulfonamide class is 100 ppb in muscle, fat, liver and kidney.

INTENDED USE

Veratox[®] for Sulfonamide is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sulfonamide in kidney or muscle.

Veratox for Sulfonamide enables international and government regulatory agencies, food manufacturers and processors, as well as quality assurance organizations, to detect sulfonamide in kidney or muscle in response to customer concerns about food safety. Veratox for Sulfonamide is an accurate, rapid, cost-effective and easy-to-use diagnostic tool compared to instrument based diagnostics like LC-MS-MS.

ASSAY PRINCIPLES

The method is based on a competitive colorimetric ELISA assay. The sulfonamide antibody has been coated in the plate wells. During the analysis, sample is added along with the primary antibody specific for the target drug. If sulfonamide residue is present in the sample, it will compete for the sulfonamide antibody, thereby preventing the antibody from binding to the antibody attached to the well. The secondary antibody, tagged with a peroxidase enzyme, targets the primary antibody that is complexed to the drug coated on the plate wells. The resulting color intensity, after addition of the HRP substrate (TMB), has an inverse relationship with the sulfonamide residue concentration in the sample.

Veratox for Sulfonamide 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
Sulfonamide Ab-coated Microtiter Plate	1 x 96-well plate (8 wells x 12 strips)	2–8°C
SMX Standards: 0 ng/mL (white cap tube) 0.50 ng/mL (yellow cap tube) 1.5 ng/mL (orange cap tube) 5.0 ng/mL (pink cap tube) 15.0 ng/mL (purple cap tube) 50.0 ng/mL (blue cap tube) 1000 ng/mL (spiking, red cap tube)	0.8 mL 0.8 mL 0.8 mL 0.8 mL 0.8 mL 0.8 mL 0.8 mL	2–8°C
Sulfonamide Antibody #1	12 mL	2–8°C*
100X HRP-Conjugated Antibody #2	250 µL	2–8°C*
Sulfonamide Antibody #2 Diluent	20 mL	2–8°C
10X Sulfonamide Extraction Buffer A	25 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
3X Kidney Extraction Buffer	20 mL	2–8°C
10X Sample Extraction Buffer E	25 mL	2–8°C
Concentrate of Tissue Extraction Buffer	62 g	2–8°C
Tissue Clean Up Mix	12 g	2–8°C

*If the kit will be unused for over 1 month, store Sulfonamide Antibody #1 and 100X HRP-Conjugated Antibody #2 at -20°C or in a freezer.

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

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 coming with the kit. If you need further assistance, you may contact your local distributor or Neogen at foodsafety@neogen.com.

1. The standards contain sulfonamide. 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. SULFONAMIDE-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 48 hours. 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 Kidney Extraction Buffer**
Mix 1 part of 3X Kidney Extraction Buffer with 2 parts of deionized water. Vortex very well.
2. **Preparation of 1X Sulfonamide Extraction Buffer A**
Mix 1 volume of 10X Sulfonamide Extraction Buffer A with 9 volumes of deionized water. Vortex very well.
3. **Preparation of 1X Sample Extraction Buffer E**
Mix 1 volume of 10X Sample Extraction Buffer E with 9 volumes of deionized water. Vortex very well.
4. **Preparation of 1X Tissue Extraction Buffer**
Add the entire bag of powder from the Concentrate of Tissue Extraction Buffer bag to a 250 mL plastic bottle. Dissolve the powder by adding 180 mL of deionized water and shaking well for 5 minutes. Let the solution sit for 10 minutes, and then shake again to dissolve the remaining powder. It is normal for a small amount of particles to remain at the bottom of the bottle. Add increments of 1 mL of deionized water and shake until there are no particles remaining.

Kidney/Muscle

1. Homogenize 10 g of tissue with a suitable mixer
2. Weigh 1 g (\pm 0.05 g) of sample into a 15 mL plastic conical tube. Force the entire sample to the bottom of the tube.
3. Incubate each sample for **15 minutes** at 37°C.
NOTE: If performing an analyte-recovery experiment, add the target spiking concentration to each tube, and then incubate the sample.
4. Add exactly 2.5 mL of acetonitrile and 0.5 mL of deionized water to each sample.
NOTE: Tightly close each cap so as to not allow any solvents to escape during vortexing.
5. Vortex each sample thoroughly for **30 seconds** to ensure all the solvent is able to fully penetrate the tissue. During vortexing, tilt the tube at an angle to forcibly agitate the mixture. Allow the mixture to settle to the bottom of the tube.
6. Slowly open each cap to allow any built-up gas to escape. Tightly close each cap. Centrifuge each sample for **10 minutes** at 4,000 x *g* at room temperature (20–25°C / 68–77°F).
7. Slowly transfer 1 mL of the supernatant to a new 15 mL tube containing 0.5 mL of 1X Kidney Extraction Buffer.
8. Add 2.5 mL of ethyl acetate with a glass pipette. Vortex each sample manually or using a multi-tube vortexer for **5 minutes**.
9. Slowly open each cap to allow any built-up gas to escape. Tightly close each cap. Centrifuge each sample for **10 minutes** at 4,000 x *g* at room temperature (20–25°C / 68–77°F).
10. Slowly transfer 0.5 mL of the upper layer to a new 15 mL plastic conical tube.
11. Use a nitrogen-blowing apparatus in a 60°C water bath to evaporate the solvent and concentrate the sample to a dried residue.
12. To this residue, slowly add exactly 1.0 mL of 1X Sulfonamide Extraction Buffer A.
NOTE: Use a new pipette tip for each sample.
13. Tightly close each tube's cap. Scrape each tube's bottom back-and-forth vigorously against a micro-centrifuge rack at least 10 times to disrupt the pellet and aid in its dissolution.
NOTE: The solution should become white and foamy depending on the force used during this step.
14. Vortex each sample for **1 minute**.
15. Sonicate each sample for **1 minute** in a 37°C water bath.
NOTE: Tap the tube against the edge or bottom of the sonicator while sonicating. Make sure that any solid particles are off of the side of the wall of the tube.
16. Vortex for an additional **1 minute**, then incubate at room temperature (20–25°C / 68–77°F) for 10 minutes before continuing to the next step.
NOTE: If any solid particles are still apparent in the solution after incubation, repeat from Step 13 above. Due to the nature of certain samples along with how well each sample was extracted, it may take more or less time to dissolve the dried residue in the final resuspension. If the residue is not fully dissolved, it will give inaccurate and inconsistent results during the ELISA.
17. Vortex each sample for **15 seconds** before using 50 μ L per well for the ELISA.
NOTE: Dilution factor: 20.

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 HRP-Conjugated Antibody #2**
Mix 1 volume of the 100X HRP-Conjugated Antibody #2 with 99 volumes of the Sulfonamide Antibody #2 Diluent.

ELISA Testing Protocol

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

Component	Volume per Reaction	24 Reactions
Sulfonamide Antibody #1	100 µL	2.4 mL
1X HRP-Conjugated Antibody #2	150 µL	3.6 mL
1X Wash Solution	2.0 mL	48 mL
Stop Buffer	100 µL	2.4 mL
TMB Substrate	100 µL	2.4 mL

1. Add 50 µL of each SMX Standard in duplicate into different wells.
NOTE: Add standards to plate only in the order from low concentration to high concentration (white, yellow, orange, pink, purple, blue).
2. Add 50 µL of each sample in duplicate into different sample wells.
3. Add 100 µL of Sulfonamide Antibody # 1 to each well. Mix by sliding back and forth on a flat surface tapping against a hard force point for **1 minute**.
NOTE: A hard force point can be created by placing finger tips firmly against the flat surface.
4. Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (20–25°C / 68–77°F).
NOTE: Keep plate covered and in the dark.
5. Shake out the contents of the wells into a waste container. Wash each well with 250 µL of 1X Wash Solution and dump out, repeat the wash step 3 times. After the last wash, invert the plate and tap the plate dry on paper towels.
NOTE: After the addition of wash buffer to each well, let the plate incubate at room temperature (20–25°C / 68–77°F) for 20 seconds to allow equilibration of the buffer.
6. Add 150 µL of freshly prepared 1X HRP-Conjugated Antibody # 2 to each well. Mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute**. Incubate the plate for **30 minutes** at room temperature (20–25°C / 68–77°F) in the dark.
7. Shake out the contents of the wells into a waste container. Wash each well with 250 µL of 1X Wash Solution and dump out, repeat the wash step 3 times. After the last wash, invert the plate and tap the plate dry on paper towels.
8. Add 100 µL of TMB substrate to each well. Incubate the plate for **15 minutes** at room temperature (20–25°C / 68–77°F) in the dark. Mix by sliding back and forth on a flat surface for **1 minute** while incubating. Start the 15 minute incubation immediately after adding the substrate. 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. After incubation, 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.

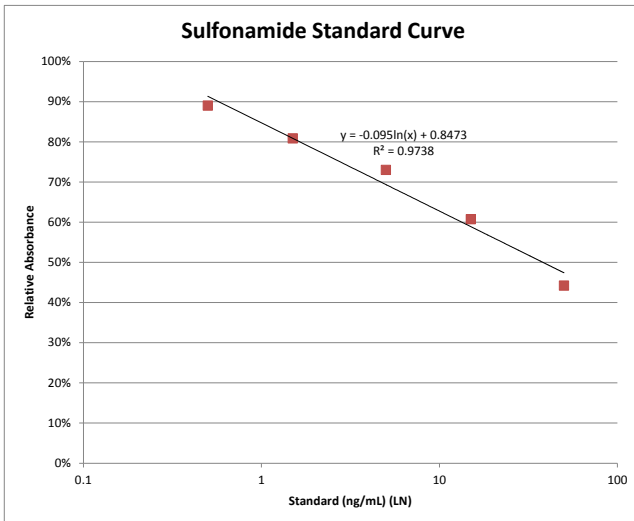
SULFONAMIDE CONCENTRATION CALCULATIONS

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 sulfonamide standard curve.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Sensitivity (Assay Range)**

Sample Type	Assay Range (ng/g or ppb)
Kidney/muscle	10 – 1,000

Specificity (Cross-Reactivity)

Analytes	Cross-Reactivity (%)
Sulfadimethoxine	100
Sulfapyridine	>100
Sulfamerazine	>100
Sulfamethazine	>100
Sulfamethoxyipyridazine	>100
Sulfamethizole	>100
Sulfadiazine	100
Sulfamethoxazole	>100
Sulfachlorpyridazine	>100
Sulfaquinoxaline	71
Sulfathiazole	71

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/Corporate/termsconditions.html.

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
DR021	Veratox for Clenbuterol — range 0.08 – 1.28 ppb, 96 wells
DR107	Veratox for Florfenicol — range 0.15 – 100 ppm, 96 wells
DR024	Veratox for Fluoroquinolone — range 0.5 – 8 ppb, 96 wells
DR026	Veratox for Tylosin — range 10 – 250 ppb, 96 wells
DR081	Veratox for Oxytetracycline — range 3.6–324 ppb, 96 wells
DR073	Veratox for Avermectins — range 6.4 – 300 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

Lea las instrucciones cuidadosamente antes de comenzar la prueba

Veratox® para Sulfonamida

Refrigere a 2–8°C (35–46°F) • No congele

SULFONAMIDA

Las sulfonamidas son una clase de antibióticos usados en pienso y agua para el tratamiento de infecciones intestinales y otras enfermedades en animales productores de alimentos. Los residuos de sulfonamida pueden presentarse en alimentos de origen animal. El Límite Máximo de Residuos (MRL) para todas las sustancias de la clase de sulfonamidas es 100 ppb en músculo, grasa, hígado y riñón.

USO PREVISTO

Veratox® para Sulfonamida es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de sulfonamida en riñón y músculo.

Veratox para Sulfonamida permite a agencias reguladoras internacionales y gubernamentales, productores y procesadores de alimento, al igual que a organizaciones de control de calidad, detectar sulfonamidas en riñón y músculo en respuesta a las preocupaciones de sus clientes sobre la seguridad alimentaria. Veratox para Sulfonamida es una herramienta de diagnóstico costo efectiva y fácil de usar en comparación a métodos basados en instrumentos como el LC-MS-MS.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El método se basa en un ensayo colorimétrico competitivo ELISA. El anticuerpo de sulfonamida ha sido recubierto en los pozos del plato. Durante el análisis, la muestra es añadida junto con el anticuerpo primario específico al medicamento objetivo. Si hay residuos de sulfonamida presentes en la muestra, competirán por el anticuerpo de sulfonamida, previniendo que este se una al anticuerpo que está pegado al pozo. El anticuerpo secundario, marcado con una enzima peroxidasa, ataca al anticuerpo primario que está unido al medicamento que cubre el pozo. La intensidad de color resultante, luego de añadir el sustrato HRP (TMB), tiene una relación inversa con la concentración de residuos de sulfonamida en la muestra.

Veratox para Sulfonamida tiene la capacidad para 96 determinaciones o de analizar 36 muestras en duplicado (asumiendo 24 pozos para estándares). Devuelva cualquier micropozo sin usarse a la bolsa de aluminio y séllela con el desecante proporcionado en el empaque original.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Almacene el kit a 2–8°C (35–46°F). Si el kit no es usado dentro de un mes, algunos de los componentes deberán ser almacenados a temperaturas de congelación. La vida útil del kit es de 12 meses si es almacenado apropiadamente.

MATERIALES PROPORCIONADOS

Contenidos del kit	Cantidad	Almacenamiento
Plato de microtitulación cubierto con Sulfonamida en acabado iridiscente	1 plato de 96 pozos (8 pozos x 12 tiras)	2–8°C
Estándares SMX:		
0 ng/mL (tubo con tapa blanca)	0.8 mL	2–8°C
0.50 ng/mL (tubo con tapa amarilla)	0.8 mL	
1.5 ng/mL (tubo con tapa naranja)	0.8 mL	
5.0 ng/mL (tubo con tapa rosa)	0.8 mL	
15.0 ng/mL (tubo con tapa púrpura)	0.8 mL	
50.0 ng/mL (tubo con tapa azul)	0.8 mL	
1000 ng/mL (contaminador, tubo con tapa roja)	0.8 mL	
Anticuerpo de Sulfonamida #1*	12 mL	2–8°C*
Anticuerpo #2 conjugado con HRP 100X*	250 µL	2–8°C*
Diluyente del Anticuerpo de Sulfonamida #2	20 mL	2–8°C
Buffer de Extracción de Sulfonamida A 10X	25 mL	2–8°C
Solución de Lavado 20X**	28 mL	2–8°C
Buffer de Parada**	14 mL	2–8°C
Sustrato TMB**	12 mL	2–8°C
Buffer de Extracción de Riñón 3X	20 mL	2–8°C
Buffer de Extracción de Muestra E 10X	25 mL	2–8°C
Concentrado de Buffer de Extracción de Tejido	62 g	2–8°C
Mezcla de Limpieza de Tejido	12 g	2–8°C

*Si el kit no fuera utilizado por más de un mes, almacene el Anticuerpo de Sulfonamida #1 y el Anticuerpo #2 conjugado con HRP 100X a -20°C o en un congelador.

**Estos componentes (dentro de su caducidad) pueden ser intercambiados con otros kits Vetarox para Sulfonamida.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

1. Lector de platos de microtitulación con un filtro de 450 nm (Artículo Neogen 9303)
2. Incubadora
3. Mezclador de tejido
4. Acetonitrilo
5. Acetato de etilo
6. Pipetas de 20–200 µL (Artículo Neogen 9276)
7. Pipeta multicanal: 50–300 µL (opcional) (Artículo Neogen 9385)
8. Centrífuga 4,000 x g
9. Cronómetro (Artículo Neogen 9426)
10. Botella de lavado (Artículo Neogen 9400)
11. Toallas de papel o material absorbente equivalente
12. Software Veratox (Artículo Neogen 9305)
13. Estación de laboratorio (Artículo Neogen 9481)
14. Agua destilada o desionizada
15. Licuadora o procesador de alimentos para homogenizar la muestra
16. Evaporador giratorio u otro medio para evaporar la muestra con nitrógeno

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 de 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. Si necesita ayuda, puede comunicarse con su distribuidor local o con Neogen a través de foodsafety@neogen.com.

1. Los estándares contienen sulfonamida. Maneje con cuidado.
2. No use el kit luego de su fecha de expiración.
3. No mezcle reactivos de otros kits o lotes, excepto por componentes que tengan el mismo número de lote dentro de sus fechas de expiración. LOS CONJUGADOS SULFONAMIDA-HRP Y LOS PLATOS SON ESPECÍFICOS PARA LOS KITS Y LOTES.
4. Asegúrese de que el conjugado HRP y el diluyente son mezclados en 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 la luz solar directa, ya que puede causar calor y evaporación excesiva. Se deben evitar las mesas de trabajo frías colocando varias capas de toallas de papel debajo de los platos de ensayo durante la incubación.
6. Asegúrese de solo 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 pipetas llenándolas y dispensando solución antes de usarlas.
8. La incubación de los platos de ensayo debe ser cronometrada 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 al plato 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 de 2–4°C por no más de 48 horas. 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 Riñón 1X**
Mezcle 1 parte del Buffer de Extracción de Riñón 3X con 2 partes de agua desionizada. Mezcle completamente.
2. **Preparación del Buffer de Extracción de Sulfonamida A 1X**
Mezcle 1 volumen del Buffer de Extracción de Sulfonamida A 10X con 9 volúmenes de agua desionizada. Mezcle completamente.
3. **Preparación del Buffer de Extracción de Muestra E 1X**
Mezcle 1 volumen del Buffer de Extracción de Muestra E 10X con 9 volúmenes de agua desionizada. Mezcle completamente.
4. **Preparación del Buffer de Extracción de Tejido 1X**
Añada la bolsa de polvo completa del Concentrado de Buffer de Extracción de Tejido a una botella plástica de 250 mL. Disuelva el polvo añadiendo 180 mL de agua desionizada y agite bien por 5 minutos. Deje la solución reposar por 10 minutos, y luego agite para disolver el polvo restante. Es normal que se quede una pequeña cantidad de partículas en el fondo de la botella. Añada agua desionizada en incrementos de 1 mL y agite hasta que no queden más partículas.

Riñón/Músculo

1. Homogenice 10 g de tejido con un mezclador adecuado.
2. Pese 1 g (± 0.05 g) de la muestra a un tubo de plástico cónico de 15 mL. Fuerce la muestra completa al fondo del tubo.
3. Incube cada muestra por **15 minutos** a 37°C.
NOTA: Si está realizando un experimento de recuperación de analito, añada el material contaminador de interés a cada tubo, y luego incube la muestra.
4. Añada exactamente 2.5 mL de acetonitrilo y 0.5 mL de agua desionizada a cada muestra.
NOTA: Cierre bien las tapas para no permitir que los solventes se escapen durante el mezclado.
5. Mezcle completamente por **30 segundos** para asegurar que todo el solvente penetró el tejido. Durante el mezclado, incline el tubo a un ángulo para agitar la mezcla a la fuerza. Permita que la muestra se asiente en el fondo del tubo.
6. Abra las tapas suavemente para permitir que escape cualquier gas acumulado. Cierre la tapa fuertemente. Centrifugue cada muestra por **10 minutos** a 4,000 x *g* a temperatura ambiente (20–25°C/68–77°F).
7. Transfiera suavemente 1 mL del sobrenadante a un tubo nuevo de 15 mL que contenga 0.5 mL del Tampón de Extracción de Riñón 1X.
8. Añada 2.5 mL de acetato de etilo con una pipeta de vidrio. Mezcle cada muestra manualmente o use un vortex de múltiples tubos por **5 minutos**.
9. Abra cada tapa suavemente para permitir que escape cualquier gas acumulado. Cierre bien las tapas. Centrifugue cada muestra por **10 minutos** a 4,000 x *g* a temperatura ambiente (20–25°C/68–77°F).
10. Transfiera suavemente 0.5 mL de la capa superior a un tubo nuevo cónico plástico de 15 mL.
11. Use un aparato soplador de nitrógeno en un baño de agua de 60°C para evaporar el solvente y concentre la muestra a un residuo seco.
12. Añada con cuidado 1.0 mL del Tampón de Extracción de Sulfonamida A1X al residuo.
NOTA: Use una nueva punta de pipeta para cada muestra.
13. Cierre bien las tapas de cada tubo. Raspe vigorosamente el fondo del tubo contra una rejilla de microcentrífuga al menos 10 veces para alterar el gránulo y ayudar en su disolución.
NOTA: La solución debe volverse blanca y espumosa, dependiendo de la fuerza utilizada durante este paso.
14. Mezcle con vortex cada muestra por **1 minuto**.
15. Sonique cada muestra por **1 minuto** en un baño de agua a 37°C.
NOTA: Golpee el tubo contra la esquina o fondo del sonicador mientras sonica. Asegúrese de que las partículas sólidas estén fuera del lado de la pared del tubo.
16. Mezcle con vortex por **1 minuto** adicional, luego incube a temperatura ambiente (20–25°C / 68–77°F) por 10 minutos antes de continuar con el próximo paso.
NOTA: Si hay partículas sólidas todavía evidentes en la solución luego de la incubación, repita comenzando con el paso 13. Debido a la naturaleza de algunas muestras y que tan bien fueron extraídas, puede tomar más o menos tiempo para disolver el residuo seco en la resuspensión final. Si el residuo no está completamente disuelto, dará resultados imprecisos e inconsistentes durante la prueba ELISA.
17. Mezcle la muestra por **15 segundos** antes de usar 50 µL por pozo para ELISA.
NOTA: Factor de dilución es 20.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Preparación del Reactivo

IMPORTANTE: Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente antes de usarse (1–2 horas a 20–25°C / 68–77°F); Asegúrese de leer la sección de “Precauciones” en la página 11. Las soluciones deben ser preparadas justo antes de realizar la prueba ELISA. Todos los reactivos deben ser mezclados invirtiéndolos o revolviéndolos suavemente antes de usarse. 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 la Solución de Lavado 1X**
Mezcle 1 volumen de la Solución de Lavado 20X con 19 volúmenes de agua destilada.
2. **Preparación del Anticuerpo #2 conjugado con HRP 1X**
Mezcle 1 volumen del Anticuerpo #2 conjugado con HRP 100X con 99 volúmenes del Diluyente del Anticuerpo de Sulfonamida #2.

Protocolo de la Prueba ELISA

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

Componente	Volumen por Reacción	24 Reacciones
Anticuerpo de sulfonamida #1	100 µL	2.4 mL
Anticuerpo #2 conjugado con HRP 1X	150 µL	3.6 mL
Solución de Lavado 1X	2.0 mL	48 mL
Buffer de Parada	100 µL	2.4 mL
Sustrato TMB	100 µL	2.4 mL

- Añada 50 µL de cada Estándar SMX por duplicado a diferentes pozos.
NOTA: Añada los estándares al plato solamente en orden de menor a mayor concentración (blanco, amarillo, naranja, rosa, púrpura, azul).
- Añada 50 µL de cada muestra por duplicado a diferentes pozos.
- Añada 100 µL del Anticuerpo de Sulfonamida # 1 a cada pozo. Mezcle deslizando hacia adelante y hacia atrás en una superficie plana contra un punto fuerte por **1 minuto**.
NOTA: Se puede crear un punto fuerte colocando las puntas de los dedos firmemente contra la superficie plana.
- Incube el plato por 30 minutos a temperatura ambiente (20–25°C / 68–77°F).
NOTA: Mantenga el plato cubierto y en la oscuridad.
- Sacuda los contenidos de los pozos en un contenedor de basura. Lave cada pozo con 250 µL de la Solución de Lavado 1X y descarte; repita el paso de lavado 3 veces. Luego del último lavado, invierta el plato y golpéelo suavemente en toallas de papel para secarlo.
NOTA: Luego de añadir el buffer de lavado a cada pozo, deje incubar el plato a temperatura ambiente (20–25°C / 68–77°F) por 20 segundos para permitir que el buffer se equilibre.
- Añada 150 µL del Anticuerpo #2 conjugado con HRP 1X fresco a cada pozo. Mezcle deslizando hacia adelante y hacia atrás en una superficie plana por **1 minuto**. Incube el plato por **30 minutos** a temperatura ambiente (20–25°C / 68–77°F) en la oscuridad.
- Sacuda los contenidos de los pozos en un contenedor de basura. Lave cada pozo con 250 µL de la Solución de Lavado 1X y descarte; repita el paso de lavado 3 veces. Luego del último lavado, invierta el plato y golpéelo suavemente en toallas de papel para secarlo.
- Añada 100 µL del sustrato TMB a cada pozo. Incube el plato por **15 minutos** a temperatura ambiente (20–25°C / 68–77°F) en la oscuridad. Mezcle deslizando hacia adelante y hacia atrás en una superficie plana por **1 minuto** mientras incubaba. Comience la incubación de 15 minutos inmediatamente después de añadir el sustrato. El tiempo total de incubación para el sustrato TMB es 15 minutos.
NOTA: Para evitar contaminación, no ponga el sustrato restante en 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 incubaba.
- Luego de incubar, añada 100 µL del Buffer de Parada a cada pozo para detener la reacción enzimática.
- Lea el plato lo antes posible siguiendo la adición del buffer de parada usando un lector de platos de microtitulación con un filtro de largo 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.

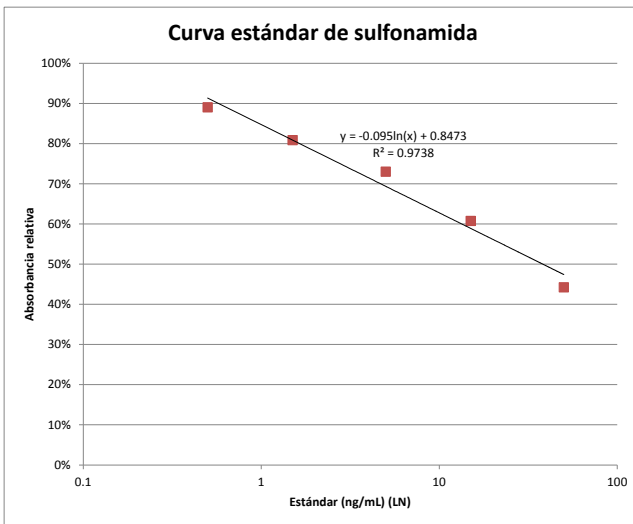
CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN DE SULFONAMIDA

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.

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

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

La siguiente figura es una curva estándar típica de sulfonamida.



CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**Sensibilidad (Intervalo de concentración)**

Tipo de muestra	Intervalo de concentración (ng/g o ppb)
Riñón/músculo	10 – 1,000

Especificidad (Reactividad cruzada)

Analitos	Reactividad cruzada (%)
Sulfadimetoxina	100
Sulfapiridina	>100
Sulfameracina	>100
Sulfametacina	>100
Sulfametoxipiridacina	>100
Sulfametizole	>100
Sulfadiacina	100
Sulfametoxazole	>100
Sulfaclopiridacina	>100
Sulfaquinoxalina	71
Sulfatiazole	71

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. Formación sobre este producto, y para todos los kits de Neogen, está disponible.

INFORMACIÓN DISPONIBLE DE SDS

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

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Para los términos y condiciones de Neogen, por favor visite www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html.

GARANTÍA

Neogen no da ninguna garantía, sea de forma explícita o implícita, excepto que los materiales de fabricación de sus productos cuentan con 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 micropozos cualitativo, 96 pozos
DR021	Veratox para Clenbuterol — rango de 0.08–1.28 ppb, 96 pozos
DR107	Veratox para Florfenicol — rango de 0.15–100 ppm, 96 pozos
DR024	Veratox for Fluoroquinolona — range 0.5 – 8 ppm, 96 wells
DR026	Veratox para Tilosina — rango de 10 – 250 ppb, 96 pozos
DR081	Veratox para Oxitetraciclina — rango de 3.6–324 ppb, 96 pozos
DR073	Veratox para Avermectinas — rango de 6.4–300 ppb, 96 pozos



Norteamérica

Oficinas Corporativas de Neogen

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

Europa, Medio Oriente y África

Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

México

Neogen Latinoamérica

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

Brasil

Neogen do Brasil

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

China

Neogen Bio-Scientific Technology

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

India

Neogen Food and Animal Security

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