



RIDASCREEN[®] β -Agonists

Art. Nr. R1704

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa
dei β -agonisti

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Per informazioni:

Centralino:
Telefono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Ufficio ordini:

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Sales

Telefono: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA[®] e RIDASCREEN[®]
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN® β -Agonists

Introduzione

RIDASCREEN® β -Agonists (Cod. R1704) è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dei β -agonisti in campioni di urina, siero, carne, fegato, latte e mangimi.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio immunoenzimatico – inclusi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è necessario un lettore per micropiastre.

Preparazione campioni: urina, siero (uso diretto): centrifugazione, diluizione
urina (SPE): idrolisi, estrazione in fase solida (SPE), evaporazione, ricostituzione
carne: omogeneizzazione, centrifugazione, estrazione in fase solida (SPE), evaporazione, ricostituzione
fegato: omogeneizzazione, estrazione, centrifugazione, evaporazione, ricostituzione
latte: estrazione, centrifugazione, evaporazione, ricostituzione
mangimi: omogeneizzazione, centrifugazione, estrazione

Tempo richiesto: preparazione campioni (per 10 campioni)
urina, siero (uso diretto) ca. 30 min
urina (SPE) ca. 4 h
carne..... ca. 2 h
fegato..... ca. 1h
latte..... ca 45 min
mangimi ca. 1.5 h
esecuzione del test (tempo di incubazione)1 h

Limite di rilevabilità: urina (uso diretto)..... ca. 200 ng/l (ppt)
(corrispondente alla sostanza urina (SPE) ca. 150 ng/l (ppt)
standard) siero..... ca. 900 ng/l (ppt)
carne..... ca. 100 ng/kg (ppt)
fegato..... ca. 130 ng/kg (ppt)
latte..... ca. 45 ng/l (ppt)
mangimi ca. 1000 ng/kg (ppt)

Valori di recupero:	urina (uso diretto).....	ca. 94 %
(corrispondente alla sostanza standard)	urina (SPE)	ca. 113 %
	siero.....	ca. 102 %
	carne.....	ca. 76%
	fegato.....	ca. 89%
	latte.....	ca. 80%
	mangimi.....	ca. 93 %

La specificità di RIDASCREEN® β -Agonists è stata determinata analizzando i valori di cross-reattività delle sostanze corrispondenti in un sistema tampone. Nei campioni la specificità può differire da quella determinata in un sistema tampone a causa dell'effetto matrice. Prima dell'analisi delle sostanze cross-reattive, è necessario determinare il limite di rilevabilità ed i valori di recupero delle sostanze nel rispettivo campione. Il test non è in grado di discriminare tra analita e sostanza cross-reattiva.

Specificità:	Clenbuterolo (sostanza standard)	ca. 100%
	Salbutamolo.....	ca. 90%
	Cimbuterolo	ca. 90%
	Brombuterolo	ca. 80%
	Mabuterolo.....	ca. 60%
	Terbutalina.....	ca. 45%
	Carbuterolo	ca. 40%
	Mapenterolo	ca. 35%
	Cimaterolo	ca. 20%

Al fine di aumentare la qualità delle prestazioni durante l'esecuzione di procedure ELISA, si prega di far riferimento al nostro Good ELISA Practice (GEP) – Manual, nella versione aggiornata. Qui si elencano gli standard minimi riguardanti le condizioni di lavoro quando si utilizzano i kit di R-Biopharm AG e si eseguono test ELISA. Il manuale può essere visionato, stampato e scaricato direttamente dal nostro sito www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis

Prodotti correlati:

RIDA® β -Agonists Clenbuterol Spiking Solution	(R1799)
RIDASCREEN® Clenbuterol	(R1711)
Clenbuterol test control (positive)	(R1707)
Clenbuterol test control (negative)	(R1708)
RIDASCREEN® Ractopamin	(R9901)
RIDA® Ractopamin Spiking Solution	(R9999)

1. Scopo

RIDASCREEN® β -Agonists è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dei β -agonisti in campioni di urina, siero, carne, fegato, latte e mangimi.

2. Generale

I β -Agonisti, come il clenbuterolo o il salbutamolo, sono derivati sintetici delle catecolamine esistenti in natura.

È noto che queste sostanze possono migliorare le performance nel settore della produzione del bestiame; in particolare si ottengono miglioramenti nel rapporto carne/grasso in animali ingrassati e un'accelerazione della loro crescita. Tuttavia, l'impiego dei β -agonisti come coadiuvanti nell'ingrassamento del bestiame non è mai stato autorizzato in ambito UE. Oltre a un'azione lipolitica e anabolizzante, i β -agonisti hanno un effetto rilassante sulla muscolatura liscia e per questa loro caratteristica possono essere impiegati in agenti antiasmatici e tocolitici. Residui di β -agonisti, se questi vengono utilizzati illegalmente, possono creare rischi per i consumatori. Per questo è vietato l'impiego dei β -agonisti nella produzione degli alimenti.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi di cattura diretti contro i β -agonisti. Vengono aggiunte le soluzioni con gli standard, il campione ed i β -agonisti coniugati all'enzima. I β -agonisti liberi e i β -agonisti coniugati all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (saggio immunoenzimatico competitivo). Il coniugato non legato viene poi eliminato con un lavaggio. Nei pozzetti viene quindi aggiunta la soluzione substrato/cromogeno e l'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione viene eseguita a 450 nm. L'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di β -agonisti nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 misurazioni (comprese le analisi degli standard).

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		96 pozzetti
Standard 1	Bianco	Pronto all'uso	0 ng/l	2 ml
Standard 2	Bianco	Pronto all'uso	62.5 ng/l	1 ml
Standard 3	Bianco	Pronto all'uso	125 ng/l	1 ml
Standard 4	Bianco	Pronto all'uso	250 ng/l	1 ml
Standard 5	Bianco	Pronto all'uso	500 ng/l	1 ml
Standard 6	Bianco	Pronto all'uso	1000 ng/l	1 ml
Standard 7	Bianco	Pronto all'uso	2000 ng/l	1 ml
Wash buffer	Bianco	Concentrato	20 x	30 ml
Conjugate	Rosso	Concentrato	100 x	0.15 ml
Conjugate/sample buffer	Bianco	Concentrato	4 x	20 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		12 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		15 ml

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore per micropiastre (450 nm)
- miscelatore
- agitatore
- vortex
- evaporatore
- rack per colonne
- centrifuga
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20 µl - 200 µl e 200 - 1000 µl

5.2. Reagenti:

Urine (SPE) e carne

- solo per le urine: β -Glucuronidase/Arylsulfatase da *Helix pomatia* (Merck-Chemicals, Art. No.: 104114); diluire 1:10 (1+9) in acqua demineralizzata
- HCl 0.1M
- Tris Base 1M (Sigma-Aldrich, Trizma base, Art. No.: T1503)
- metanolo p.a 100%
- acido acetico 0.1M
- idrossido di ammonio 2%: aggiungere 6.25 ml di soluzione di ammoniaca al 32% (Merck-Chemicals, Art. No.: 105426) a 93.75 ml di metanolo p.a. al 100%.
- Carta da filtro (esempio Macherey-Nagel, Art. No.: MN 615 A)
- RIDA[®] C18 column (R-Biopharm, Art. No.: R2002)

Fegato e latte

- acetonitrile

Mangimi

- NaOH 1M
- HCl 1 M

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test dovrebbe essere effettuato solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere rispettate rigorosamente.

Il kit può contenere sostanze pericolose. Per ulteriori informazioni sulla sostanze contenute, far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) scaricabile direttamente online al sito www.r-biopharm.com

7. Conservazione

Conservare il kit a 2-8 °C (35-46 °F). Non congelare alcun componente del kit.

Riporre i pozzetti non utilizzati nella loro custodia originale insieme al dissecante in dotazione e conservare a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità non è valida oltre la data di scadenza riportata in etichetta.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con numero di lotto differente.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno di colore rosso prima dell'esecuzione del test
- valori inferiori a 0.8 unità di assorbanza ($A_{450nm} < 0.8$) per lo standard 1

9. Preparazione campioni

Conservare i campioni in un luogo fresco.

9.1. Urine (uso diretto)

- centrifugare per 5 minuti / 3000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- diluire il surnatante 1:5 (1+4) con il tampone del campione utilizzando una provetta in vetro. Es. 50 µl di surnatante + 200 µl di tampone e mescolare attentamente
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

9.2. Urine (SPE)

Se le urine sono torbide oppure contengono precipitati, è necessario centrifugare (5 min / 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) oppure filtrare (carta da filtro, ad esempio Macherey-Nagel, Art. No.: MN 615 A)

- trasferire 2 ml di urina in una provetta in vetro pulita
- aggiungere 20 µl di *Helix pomatia* β-Glucuronidase/ Arylsulfatase diluita 1:10
- aggiungere 7 ml di HCl 0.1 M e miscelare tramite vortex
- incubare per 2 ore a 50°C (122 °F)
- aggiungere 1 ml di Tris Base 1M
- procedere con l'estrazione in fase solida, come riportato al punto 9.4

9.3. Carne

- omogeneizzare completamente il campione
- trasferire 2 g di carne omogeneizzata in una provetta in vetro pulita
- aggiungere 7 ml di HCl 0.1 M e miscelare tramite vortex
- aggiungere 1 ml di Tris Base 1M
- centrifugare: 10 min/ 2000 g/ temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F)
- trasferire il surnatante senza l'interferenza del pellet in una nuova provetta in vetro pulita
- procedere con l'estrazione in fase solida, come riportato al punto 9.4

9.4. Estrazione in fase solida (SPE)

Il surnatante deve essere purificato con RIDA[®] C18 column (Art. No. R2002):

- lavare la colonna con 1.2 ml di metanolo p.a. al 100%.
- applicare 1.2 ml di acido acetico 0.1 M alla colonna
- applicare 3 ml di filtrato alla colonna (flusso 1 ml/min)
- eluire il campione con 1 ml della soluzione di idrossido di ammonio al 2 %
- raccogliere tutto il campione mediante pressione positiva o a vuoto per 30s ed asciugare la colonna per 2 min mediante un flusso d'aria o nitrogeno
- evaporare il campione a secco sotto azoto o tramite flusso d'aria a 50°C(122°F)
- disciogliere il residuo secco in 0.6 ml di tampone del campione e mescolare
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

9.5. Fegato

- omogeneizzare completamente il fegato
- trasferire 2 g di fegato omogeneizzato in una provetta in vetro pulita
- aggiungere 8 ml di acetonitrile e miscelare tramite vortex
- miscelare per 10 min (mediante shaker)
- centrifugare per 10 minuti / 2000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- trasferire 1 ml di surnatante in una provetta in vetro pulita
- evaporare il campione a secco sotto azoto o tramite flusso d'aria a 50°C(122°F)
- disciogliere il residuo secco in 400 µl di tampone del campione e mescolare
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

9.6. Siero

- centrifugare per 5 minuti / 3000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- diluire il surnatante 1:5 (1+4) con il tampone del campione e mescolare
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

9.7. Latte

- trasferire 2 ml di latte in una provetta in vetro pulita
- aggiungere 8 ml di acetonitrile e miscelare tramite vortex
- miscelare per 10 min (mediante shaker)
- centrifugare per 10 minuti / 2000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- trasferire 2 ml di surnatante in una provetta in vetro pulita
- evaporare il campione a secco sotto azoto o tramite flusso d'aria a 50°C(122°F)
- disciogliere il residuo secco in 250 µl di tampone del campione e mescolare tramite vortex
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

9.8. Mangimi

- macinare il campione (ca. 50-100 g) fino ad ottenere una polvere fine
- aggiungere 2 ml di HCl 1M e 18 ml di acqua distillata a 2 g di campione finemente macinato
- miscelare tramite vortex per 3 minuti
- miscelare tramite shaker per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)

- centrifugare per 20 minuti / 2000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- trasferire il surnatante in una nuova provetta ed aggiungere 1 ml di NaOH 1 M
- regolare il pH a 7.0-7.8 con NaCl 1 M e miscelare tramite vortex per 1 minuto
- centrifugare per 20 minuti / 2000 g / temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- utilizzare 25 µl per ogni pozzetto

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) prima dell'uso.

Eventuali precipitati presenti nelle soluzioni concentrate devono essere disciolti mediante miscelazione con shaker a temperatura ambiente prima della diluizione.

Si prega di utilizzare il tampone concentrato come tampone **per il coniugato e per il campione**. Diluire il tampone 1:4 (1+3) con acqua demineralizzata (es. 20 ml di soluzione concentrata + 60 ml di acqua demineralizzata). Il tampone diluito può essere conservato a 2-8°C (35-46°F) fino alla data di scadenza della soluzione concentrata.

Diluire il **tampone di lavaggio** concentrato 1:20 (1+19) con acqua demineralizzata (es. 2 ml di concentrato + 38 ml di acqua demineralizzata, sufficiente per 4 strip). Il tampone di lavaggio diluito può essere conservato a 2-8°C (35-46°F) fino alla data di scadenza della soluzione concentrata.

L'**enzima coniugato ai β-agonisti** (flacone con tappo rosso) è fornito concentrato. Poiché una volta diluito ha una stabilità limitata, è opportuno ricostituire solo il quantitativo effettivamente necessario per l'analisi. Centrifugare il coniugato concentrato prima di pipettarlo. (1 min / 1000g / temperature ambiente (20-25°C/68-77°F)). Per la ricostituzione diluire il concentrato 1:100 (1+99) con il tampone del coniugato pronto all'uso (es. 30 µl di concentrato + 2970 µl di tampone, pronto all'uso, sufficiente per 4 strip).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard e ai campioni.
2. Aggiungere 25 µl di standard o del campione precedentemente preparato in pozzetti separati in doppio + 75 µl di enzima coniugato diluito per ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente ed incubare per 30 min a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) al buio.
3. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente per tre volte la piastra capovolgendola su carta assorbente in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Riempire i pozzetti con 300 µl di soluzione di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido ottenuto. Ripetere altre 2 volte.
4. In ogni pozzetto aggiungere 100 µl di soluzione substrato/cromogeno. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
5. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per i test immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software denominato RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996).

Il profilo della curva standard è rappresentato nel Certificato di Assicurazione della Qualità allegato al kit.

Nota per il calcolo senza software:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o campione)}}{\text{Assorbanza standard zero}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Lo standard zero risulta pertanto essere il 100% e i valori di assorbanza sono quotati in percentuali. I valori calcolati per gli standard vanno inseriti in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro la concentrazione equivalente di β -agonisti in ng/kg.

Per ottenere la concentrazione di β -agonisti in ng/kg (ppt) effettivamente contenuta nel campione, la concentrazione calcolata dalla curva standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione corrispondente. Operando secondo le procedure descritte, i fattori di diluizione da applicare sono i seguenti:

urina (uso diretto)	5
urina (SPE).....	1
siero	5
carne	1
fegato	2
latte	0.625
mangimi.....	11

Per ulteriori informazioni o note applicative contattare il proprio di distributore locale.

R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.