



Neogen do Brasil
Rua Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João Narezzi
Indaiatuba-SP, Brasil CEP: 13.374-402
Telefone: 19.3935-3727 | E-mail: info@neogendobrasil.com.br | Web: www.neogen.com/Toxicology

ANFETAMINA ESPECÍFICA-2

INSTRUÇÕES DO KIT ELISA PARA OS PRODUTOS Nº 132319-2, 132315-2 E 132313-2
SOMENTE PARA O USO FORENSE

USO PREVISTO: para a determinação de quantidades vestigiais de Anfetamina e/ou outros metabólitos em urina, sangue ou fluido oral humano.

DESCRIÇÃO

O kit do teste ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) para Anfetamina Específica-2 da Neogen Corporation é um kit de único passo, qualitativo, desenvolvido para o uso como um dispositivo de triagem na detecção de drogas e/ou seus metabólitos. O kit foi desenvolvido para fins de triagem e destina-se somente ao uso forense. Recomenda-se que amostras presuntivas positivas sejam confirmadas por um método quantitativo, tal como cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

PRINCÍPIOS DO TESTE

O kit do teste da Neogen Corporation opera com base na competição entre a droga ou o seu metabólito na amostra e o conjugado da droga-enzima por um número limitado de sítios de ligação dos anticorpos. Primeiramente a amostra ou o controle é adicionado ao micropoço. Em seguida, o conjugado droga-enzima é adicionado e a mistura é incubada à temperatura ambiente. Durante a incubação, a droga na amostra ou o conjugado droga-enzima é ligada ao anticorpo imobilizado no micropoço. Após a incubação, os micropoços são lavados para remover qualquer amostra ou conjugado droga-enzima que não se tenha ligado ao anticorpo. A presença do conjugado droga-enzima ligado é reconhecida pelo Substrato K-Blue® (TMB). Após uma incubação do substrato de 30 minutos, a reação é interrompida com a adição da solução ácida de parada (Stop). O teste pode ser lido visualmente ou com um leitor de micropoços equipado com um filtro de 450 nm. A extensão do desenvolvimento da cor é inversamente proporcional à quantidade de droga na amostra ou controle. Ou seja, a ausência da droga na amostra resultará em uma cor amarelo escuro e a presença da droga resultará em uma cor amarelo claro a nenhum desenvolvimento da cor.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Este kit pode ser utilizado até a data de validade no rótulo, quando refrigerado a 2-8°C.

MATERIAIS FORNECIDOS – KIT ÚNICO (96 MICROPOÇOS)

1. **Tampão EIA:** 30 mL (pronto para o uso). Solução tampão fosfato-salino com soro bovino e um conservante. Fornecido para a diluir as amostras.
2. **Concentrado de tampão de lavagem (10X):** 20 mL. Solução tampão fosfato-salino com um surfactante. Faça uma diluição 1:10 (1 parte do concentrado para 9 partes de água deionizada ou água ultrapura) antes da utilização. A solução diluída é utilizada para remover todo o conjugado e amostras não ligados nos micropoços após a incubação do conjugado.
3. **Substrato K-Blue:** 20 mL (pronto para o uso). 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina estabilizada (TMB) com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em um único frasco. É utilizado para o desenvolvimento da cor nos micropoços após a etapa de lavagem. Sensível à luz.
4. **Conjugado droga-enzima:** 14 mL (pronto para o uso). Conjugado da droga-peroxidase de rábano. Não dilua.
5. **Micropoços revestidos com anticorpo:** placa Costar com 96 micropoços, em fileiras separáveis de 8 micropoços revestidos com anticorpos. A placa está pronta para ser utilizada. Não lave a placa.
6. **Solução ácida Stop:** 14 mL (pronto para o uso). 1 N H₂SO₄ utilizado para cessar a reação enzimática.
7. **Materiais de referência de Limite para Sangue Total: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Sangue Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa vermelha).

- b. Material de referência de Limite para Sangue - (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 50 ng/mL (tampa vermelha).
- 8. **Materiais de referência de Limite para Urina: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Urina Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa amarela).
 - b. Material de referência de Limite para Urina - (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 500 ng/mL (tampa amarela).
- 9. **Materiais de referência de Limite para Fluido Oral: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Fluido Oral Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa transparente).
 - b. Material de referência de Limite para Fluido Oral - (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 50 ng/mL (tampa transparente).

MATERIAIS FORNECIDOS – KIT A GRANEL (480 MICROPOÇOS)

1. **Tampão EIA:** 200 mL (pronto para o uso). Solução tampão fosfato-salino com soro bovino e um preservante. Fornecido para diluir as amostras.
2. **Concentrado tampão de lavagem (10X):** 100 mL. Solução tampão fosfato-salino com um surfactante. Faça uma diluição 1:10 com água deionizada ou água ultrapura antes da utilização. A solução diluída é utilizada para remover todo o conjugado e amostras não ligados nos micropoços após a incubação do conjugado.
3. **Substrato K-Blue:** 100 mL (pronto para o uso). 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina estabilizada (TMB) com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em um único frasco. É utilizado para o desenvolvimento da cor nos micropoços após a etapa de lavagem. Sensível à luz.
4. **Conjugado droga-enzima:** 5 X 14 mL (pronto para o uso). Conjugado da droga-peroxidase de rábano. Não dilua.
5. **Micropoços revestidos com anticorpo:** 5 placas Costar, cada uma com 96 micropoços, em fileiras separáveis de 8 micropoços revestidos com anticorpos. As placas estão prontas para serem utilizadas. Não lave as placas.
6. **Solução ácida Stop:** 90 mL (pronta para o uso). 1 N H₂SO₄ utilizado para cessar a reação enzimática.
7. **Materiais de referência de Limite para Sangue Total: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Sangue Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa vermelha).
 - b. Material de referência de Limite para Sangue- (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 50 ng/mL (tampa vermelha).
8. **Materiais de referência de Limite para Urina: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Urina Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa amarela).
 - b. Material de referência de Limite para Urina- (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 500 ng/mL (tampa amarela).
9. **Materiais de referência de Limite para Fluido Oral: NÃO DILUA.**
 - a. Material de referência para Fluido Oral Negativo: 1 mL fornecido em uma matriz sintética (tampa transparente).
 - b. Material de referência de Limite para Fluido Oral- (Anfetamina): 1 mL fornecido em uma matriz sintética, 50 ng/mL (tampa transparente).

MATERIAIS FORNECIDOS – 50 PACOTES (4800 MICROPOÇOS)

1. **Concentrado de Tampão de Lavagem (10X):** 1 L. Solução tampão fosfato-salino com um surfactante. Faça uma diluição 1:10 com água deionizada ou água ultrapura antes da utilização. A solução diluída é utilizada para remover todo o conjugado e amostras não ligados nos micropoços após a incubação do conjugado.
2. **Substrato K-Blue:** 500 mL (pronto para o uso). 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina estabilizada (TMB) com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em um único frasco. É utilizado para o desenvolvimento da cor nos micropoços após a etapa de lavagem. Sensível à luz.
3. **Conjugado droga-enzima:** 2 X 425 mL (pronto para o uso). Conjugado da droga-peroxidase de rábano. Não dilua.
4. **Micropoços revestidos com anticorpo:** 50 placas Costar, cada uma com 96 micropoços, em fileiras separáveis de 8 micropoços revestidos com anticorpos. As placas estão prontas para serem utilizadas. Não lave as placas.
5. **Solução ácida Stop:** 500 mL (pronto para o uso). 1 N H₂SO₄ utilizado para cessar a reação enzimática.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

1. Água deionizada.
2. Pipetas de precisão na faixa de 10 µL–1000 µL e ponteiros descartáveis.
3. Proveta para diluir e misturar o tampão de lavagem.
4. Cobertura para a placa ou filme plástico para cobrir a placa durante a incubação.
5. Vidraria limpa (ex., tubos de ensaio) para diluir amostras.

6. Leitor de micropoços com filtro de 450 nm.

MATERIAIS OPCIONAIS

1. Agitador para a placa.
2. **Kit de 50 Pacotes (4800 micropoços) NÃO inclui o Tampão EIA.** Produto nº 301276 (500 mL) e nº 301277 (1 L).
3. **Kit de 50 Pacotes (4800 micropoços) NÃO inclui Materiais de Referência para Matriz Específicos,** esses podem ser comprados separadamente para o uso pelo laboratório.

PRECAUÇÕES E NOTAS

1. **NÃO** utilize os kits ou seus componentes após a data de validade.
2. **NÃO** misture conjugados e placas provenientes de lotes de kits diferentes.
3. **NÃO** pipete os reagentes com a boca.
4. Coloque o Substrato K-Blue em um recipiente limpo. Para prevenir a contaminação do substrato, **NÃO** pipete diretamente do frasco.
5. Todos os espécimes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Manuseie com a devida precaução.
6. Mantenha os micropoços cobertos, exceto quando estiver adicionando os reagentes, durante a lavagem e a leitura.
7. Os componentes do kit devem permanecer refrigerados quando não estiverem sendo utilizados.
8. Mantenha os calibradores de limite armazenados a 2-8°C.
9. Utilize técnica asséptica para abrir e remover os reagentes dos frascos.
10. **NÃO** fume, coma ou beba em áreas onde os espécimes ou reagentes estão sendo manipulados.
11. Não substitua o tampão de lavagem por água deionizada para a etapa de lavagem deste protocolo. Use somente o tampão de lavagem da Neogen.
12. A concentração da azida de sódio a 0,01% ou menos não deve interferir no teste, desde que se siga as recomendações para diluições.
13. Não reutilize os micropoços, esses devem ser utilizados somente uma vez.

NOTAS DO PROCEDIMENTO

1. O saco de dessecante deve permanecer na embalagem de alumínio com as tiras de micropoços não utilizadas. Mantenha a embalagem fechada quando não estiver em uso para manter um ambiente seco.
2. Utilize ponteiras limpas para o tampão, conjugado droga-enzima, controles e amostras.
3. Antes de pipetar um reagente, enxague a ponteira pipetando três vezes com o reagente.
4. Quando pipetar nos micropoços, **NÃO** deixe que a ponteira entre em contato com a parte interna do micropoço ou qualquer reagente que esteja dentro do micropoço. Isto pode resultar em contaminação cruzada.
5. Controles e amostras devem ser analisados em duplicatas.
6. Antes da adição do substrato, limpe a parte exterior inferior dos micropoços com material sem fiapos para remover a poeira e impressões digitais.
7. Misture delicadamente os espécimes e reagentes antes da utilização. Evite uma agitação rigorosa.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As diluições mínimas de amostras estão descritas abaixo. Essas diluições podem mudar com base na determinação do seu laboratório. Todas as diluições de amostras devem ser feitas com o Tampão EIA da Neogen.

- a. **Urina:** uma diluição 1:50 (ex., 1 parte de amostra para 49 partes do Tampão EIA fornecido) é necessária para um ótimo desempenho do teste contra os materiais de referência para urina fornecidos (tampas amarelas). Contate o seu representante da Neogen para assistência.
- b. **Sangue Total:** uma diluição 1:5 (ex., 1 parte de amostra para 4 partes do Tampão EIA fornecido) é necessária para um ótimo desempenho do teste contra os materiais de referência para sangue fornecidos (tampas vermelhas). Contate o seu representante da Neogen para assistência.
- c. **Fluido Oral:** uma diluição 1:5 (ex., 1 parte de amostra para 4 partes do Tampão EIA fornecido) é necessária para um ótimo desempenho do teste contra os materiais de referência para fluido oral fornecidos (tampas transparentes). Uma etapa de centrifugação pode ser utilizada para a separação de partículas antes da diluição. Contate o seu representante da Neogen para assistência.
- d. **Outros tipos de amostras forenses:** Contate o seu representante da Neogen para assistência.

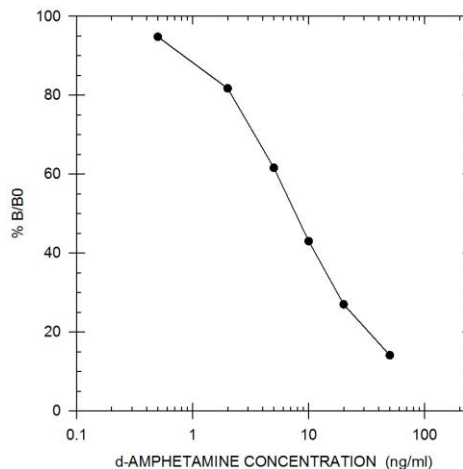
PROCEDIMENTOS DO TESTE

Os procedimentos do teste a seguir podem ser realizados manualmente ou por um instrumento automatizado. Contate o seu representante da Neogen para assistência com protocolos para instrumentos automatizados.

1. Determine o número de micropoços a serem utilizados.

2. Misture delicadamente a solução do conjugado pronta para o uso, por inversão. Não agite com um vortex. Armazene o restante da solução não utilizada a 2-8°C.
3. Escolha os materiais de referência apropriados da Neogen para serem utilizados com o tipo da sua amostra. Não dilua os materiais de referência fornecidos pela Neogen.
4. Adicione 10 μL da amostra, materiais de referência da Neogen ou do laboratório em duplicatas, aos micropoços apropriados.
5. Adicione 100 μL do conjugado droga-enzima pronto para o uso em cada micropoço. Para a análise manual, utilize pipetas de 8 ou 12 canais para maior produtividade.
6. Para análises manuais, misture os componentes, agitando a placa delicadamente. Pode-se utilizar um agitador de placas (shaker).
7. Cubra a placa com um filme plástico ou cobertura para placas e incube à temperatura ambiente por 45 minutos.
8. Durante a incubação do conjugado, dilua o concentrado de tampão de lavagem a uma diluição 1:10 com água deionizada (ex., 20 mL do concentrado de tampão de lavagem com 180 mL de água deionizada). Misture para completa homogeneização. A solução diluída permanece estável por 5 dias à temperatura ambiente ou 7 dias a 2-8°C.
9. Uma vez completa a incubação, descarte ou aspire o líquido dos micropoços. Bata a placa contra um papel toalha livre de fibras para remover o líquido remanescente.
10. Lave cada micropoço com 300 μL da solução diluída de tampão de lavagem. Lavagem manual: para procedimentos de lavagem manual, repita a lavagem num total de 3 lavagens, inverta a placa e bata a mesma para descartar qualquer líquido remanescente após cada lavagem. Após o término da última lavagem, limpe a parte exterior inferior dos micropoços com um papel toalha livre de fibras, para remover qualquer líquido que tenha permanecido na parte externa dos micropoços. Lavagem automatizada: se uma lavadora de micropoços automatizada for utilizada, lave a placa por um total de 5 lavagens com 300 μL da solução diluída de tampão de lavagem. É importante que a lavadora realize um ciclo final de aspiração para eliminar qualquer resíduo da solução de tampão de lavagem. Resíduos da solução de tampão de lavagem nos micropoços afetarão o desempenho do teste. Nota: água deionizada nunca deve ser utilizada para a etapa de lavagem dos micropoços.
11. Adicione 100 μL do substrato K-Blue em cada micropoço. Para análises manuais, utilize uma pipeta multicanal para melhores resultados.
12. Incube à temperatura ambiente por 30 minutos.
13. Adicione 100 μL da solução ácida de parada (Stop) (1N H_2SO_4) em cada micropoço para cessar a reação enzimática. Misture delicadamente antes de medir a absorbância. Para sistemas automatizados, uma agitação de 10 segundos é suficiente. Meça a absorbância a um comprimento de onda de 450 nm. Os micropoços devem ser lidos dentro de 2 horas após a adição da solução ácida Stop.

CURVA PADRÃO NO TAMPÃO EIA



SENSIBILIDADE

Composto	I-50 em Tampão EIA	I-50 em Urina Humana (Diluição 1:50: 1 parte de amostra para 49 partes do Tampão EIA)	I-50 em Sangue Humano (Diluição 1:5: 1 parte de amostra para 4 partes do Tampão EIA)
d-Anfetamina	5,9 ng/mL	370 ng/mL	38 ng/mL

O termo I-50 é utilizado para definir a sensibilidade do teste. Esse número é derivado de uma curva padrão gerada com a droga. A concentração da droga que mostra 50% menos atividade na coloração do que o zero padrão, é considerada como o I-50.

ESPECIFICIDADE

Composto	Concentração Composto (ng/mL)	Anfetamina Equivalentes (ng/mL)	% Reatividade cruzada
d-Anfetamina	5,9	5,9	100
(±)-MDA	5,9	5,9	100
p-Metoxyanfetamina	6,5	5,9	91
Fentermina	17,0	5,9	35
p-Hidroxianfetamina	18	5,9	33
α-Etiltriptamina	31	5,9	19
4-Fluoroamphetamine	38	5,9	16
l-Anfetamina	410	5,9	1,4
Fenetilamina	910	5,9	0,7
Mefentermina	1.000	5,9	0,6
2-Phenylethylamine	1.000	5,9	0,6
p-Metoximetanfetamina	1.100	5,9	0,5
(±)-MDMA	1.500	5,9	0,4
Dimetoxibromoanfetamina (DOB)	9.000	5,9	0,1
d-Metanfetamina	4.000	5,9	0,1
Metaraminol	> 10.000	5,9	< 0,06
Fenilpropanolamina	> 10.000	5,9	< 0,06
1R,2S(-) Efedrina	> 10.000	5,9	< 0,06
S,S(+) Pseudoefedrina	> 10.000	5,9	< 0,06
(+) N,N-Dietilnorefedrina	> 10.000	5,9	< 0,06
Etcatinona (N-etilnorefedrina)	> 10.000	5,9	< 0,06
(±) N-Etilcatinona Efedrina	> 10.000	5,9	< 0,06
Dietilpropiona (Anfepramona)	> 10.000	5,9	< 0,06

Nota: Equivalentes de Anfetamina representam 50% B/B₀ no ensaio de deslocamento em Tampão EIA.

Compostos com reatividade cruzada abaixo de 0,01% não mostraram qualquer reação significativa até 10 µg/ml.

TODOS OS COMPOSTOS ABAIXO POSSUEM REATIVIDADE CRUZADA <0,01%.

Acepromazina; Acetaminofeno; Ácido Acetilsalicílico; Anfepramona; Amitriptilina; Ácido Ascórbico; Ácido Benzoico; Bupropiona; Cafeína; Ácido Aminocaproico; Clordiazepóxido; Clorpromazina; Clenbuterol; Codeína; Cotinina; Dexametasona; Dextrometorfano; Diclofenaco; Dimetilsulfóxido; Dipirona; Doxepina; Efedrina; Eritromicina; Etil-p-aminobenzoato; Fenfluramina; Fenopropeno; Flunixinina; Ácido Fólico; Ácido Folínico; Furosemdia; Genfibrozila; Ácido Gentísico; Glipizida; Ácido L-Glutâmico; Glutetimida; Glicopirrolato; Heparina; Ácido Hipúrico; Hordenina; Hidrocortisona; Hidróxido de Bupropiona; Hidroximitragina-7; Ibuprofeno; Imipramina; Isoxuprina; Lidocaína; l-Metanfetamina; Meperidina; Mescalina; Metaproterenol; Metadona; L-MAMP;

Metaqualona; Metocarbamol; Azul de Metileno; Metilprednisolona, Mitragina; Nalorfina; Naproxeno; Niacinamida; Nicotina; Nortriptilina; Orfenadrina; Oxifembutazona; Penicilina G-Potássio; Penicilina G-Procaína; Pentoxifilina; Fenproporex; Fenotiazina; Fenilbutazona; Polietilenoglicol; Prednisona; Primidona; Procaínamida; Procaína; Promazina; Pseudoefedrina; Pirantel; Pirlamina; Pirimetamina; PCP; Quetiapine Fumarato; Quinidina; Quinina; Risperidona; Salbutamol; Salicilamida; Ácido Salicílico; Teofilina; Tiamina; Trimetoprim; Trimipramina; Ácido Úrico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultado Positivo: amostras com uma absorbância abaixo ou igual a absorbância do calibrador de limite fornecido com o kit, devem ser consideradas positivas. Todas as amostras positivas devem ser confirmadas por um método quantitativo como GC-MS.

Resultado Negativo: amostras com uma absorbância maior do que a absorbância do calibrador de limite, devem ser consideradas negativas.

Nota: o kit foi desenvolvido somente para fins de triagem. Recomenda-se que todas as amostras suspeitas sejam confirmadas por um método quantitativo como GC-MS ou HPLC.

SUPORTE TÉCNICO

Para assistência técnica, contate o Departamento de Serviço Técnico da Neogen no telefone 19.3935-3727 ou no e-mail info@neogendobrasil.com.br. Representantes estão disponíveis de Segunda a Sexta-Feira de 8:00h – 18:00h.

DIREITOS AUTORAIS

Direitos autorais reservados em nível global. Nenhuma parte desta publicação deve ser reproduzida, transmitida, transcrita ou armazenada em qualquer sistema de recuperação de informação, ou traduzida em qualquer linguagem humana, ou computadorizada de qualquer forma ou por qualquer meio (manual, eletrônico, mecânico, magnético, óptico, químico ou de outra forma) sem autorização expressa por escrito.

GARANTIA

A Neogen Corporation não fornece nenhuma garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, exceto que os materiais utilizados para a fabricação deste produto são de qualidade padrão. Se qualquer material estiver danificado, a Neogen Corporation fornecerá uma substituição do produto. O comprador assume todos os riscos e responsabilidades resultantes do uso deste produto e qualquer um dos modelos preditivos. Não há garantia de comercialização deste produto para quaisquer fins. A Neogen Corporation não será responsável por qualquer dano, incluindo danos especiais, ou consequentes, ou despesas derivadas do uso direto ou indireto deste produto.

Os produtos rotulados com **SOMENTE PARA O USO FORENSE** são testes que não foram aprovados pelo FDA.