



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

KIT PARA DETECÇÃO DE COCAÍNA EM CABELO

INSTRUÇÕES DO KIT ELISA PARA OS PRODUTOS Nº 140119, 140115 E 140113

SOMENTE PARA O USO FORENSE

USO PREVISTO: para a determinação de quantidades vestigiais de Cocaína e/ou outros metabólitos em amostras de cabelo humano.

DESCRIÇÃO

O kit do teste ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) para Cocaína em Cabelo 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).

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste forense ELISA para a detecção de drogas da Neogen é um imunoensaio de fase sólida projetado para a detecção de drogas de abuso em aplicação forense. O teste é feito em micropoços revestidos com anticorpos de captura de alta afinidade. Um controle ou amostra é adicionado aos micropoços, seguido da adição de um conjugado enzimático. Durante o período de incubação, o conjugado enzimático compete com a droga da amostra pelos sítios de ligação dos anticorpos que revestem os micropoços. Após uma etapa de lavagem para remover qualquer material não ligado, o substrato é adicionado para o processo de desenvolvimento da cor. A solução ácida de parada (Stop) é adicionada para descontinuar a reação enzima-substrato. A intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade da droga presente na amostra. Portanto, amostras que contêm a droga inibirão a ligação do conjugado enzimático com o anticorpo de captura, resultando em menos desenvolvimento da cor comparado ao controle negativo. Controles negativo e positivo devem ser analisados juntamente com as amostras. Os resultados devem ser obtidos através da leitura da absorbância dos micropoços em um leitor de micropoços.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Este kit pode ser utilizado até a data de validade no rótulo e no Certificado de Análise, quando armazenado em refrigeração entre 2–8°C. Sempre verifique cada kit para datas de validade e requerimentos para armazenamento específicos.

MATERIAIS FORNECIDOS – KIT ÚNICO (96 MICROPOÇOS)

1. **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.
2. **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.
3. **Conjugado droga-enzima:** 200 µL. Conjugado da droga- peroxidase de rábano. Dilua 1:100 antes da utilização.
4. **Diluyente droga-enzima:** 15 mL.
5. **Solução ácida Stop:** 18 mL de 1N H₂SO₄.
6. **Micropoços revestidos com anticorpo:** 96 micropoços revestidos com anticorpos. A placa está pronta para a utilização. Não lave a placa.

MATERIAIS FORNECIDOS – KIT A GRANEL (480 MICROPOÇOS)

1. **Concentrado de 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 diluição. 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:** 100 mL (pronto para o uso). 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina estabilizada (TMB) com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 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:** 1 mL. Conjugado da droga- peroxidase de rábano. Dilua 1:100 antes da utilização.
4. **Diluente droga-enzima:** 85 mL.
5. **Solução ácida Stop:** 90 mL de 1N H_2SO_4 .
6. **Micropoços revestidos com anticorpo:** 5 placas, cada uma com 96 micropoços revestidos com anticorpos. As placas estão prontas para serem utilizadas. Não lave as placas.

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 (H_2O_2) 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:** 9,5 mL. Conjugado da droga-peroxidase de rábano. Dilua 1:100 antes da utilização.
4. **Diluente droga-enzima:** 850 mL.
5. **Solução ácida Stop:** 500 mL de 1N H_2SO_4 .
6. **Micropoços revestidos com anticorpo:** 50 placas, cada uma com 96 micropoços revestidos com anticorpos. As placas estão prontas para serem utilizadas. Não lave as placas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM, NÃO FORNECIDOS

1. Tampão de diluição (0.1% BSA/PBS). O tampão de diluição referenciado no Procedimento de Diluição pode ser encomendado separadamente (Nº de produto 301777) ou pode ser feito pelo laboratório.
2. Pipetas de precisão que variam entre 10 μ L e 1000 μ L e ponteiros descartáveis.
3. Proveta graduada para diluir e misturar o tampão de lavagem.
4. Vidraria de laboratório (por exemplo tubos de ensaio) para completar o procedimento de extração de cabelo.
5. Leitor de micropoços capaz de medir a absorbância a 450 nm (650 nm, 630 nm, ou 620 nm de comprimento de onda do filtro de referência).
6. Tubos para culturas de vidro de borossilicato ou recipientes equivalentes para a utilização com controles, padrões e procedimentos de extração de cabelo. **PLÁSTICOS NÃO PODEM SER UTILIZADOS.**
7. Metanol.
8. Bloco térmico.
9. Água deionizada
10. Nitrogênio (gás).

PRECAUÇÕES E NOTAS

1. **NÃO** utilize os kits ou componentes após a data de validade.
2. **NÃO** misture conjugados e placas 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 leitura.
7. Os componentes do kit devem permanecer refrigerados quando não estiverem sendo utilizados.
8. Utilize técnica asséptica para abrir e remover os reagentes dos frascos.
9. **NÃO** fume, coma ou beba em áreas onde os espécimes ou reagentes estão sendo manipulados.
10. Não substitua o tampão de lavagem por água deionizada para a etapa de lavagem deste protocolo. Use somente o tampão de lavagem da Neogen.
11. Não utilize Azida de Sódio com amostras, padrões e/ou calibradores.
12. Não reutilize os micropoços, esses devem ser utilizados somente uma vez.

NOTAS DE 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 ponteiros limpas para o tampão, conjugado droga-enzima, controles e amostras.
3. Antes de pipetar um reagente, enxágue 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 de abrir o frasco contendo o conjugado droga-enzima, bata o frasco na vertical para remover qualquer líquido que possa estar na tampa.
7. Antes da adição do substrato, limpe a parte exterior inferior dos micropoços com material sem fiapos, para remover a poeira e impressões digitais.
8. Misture delicadamente os espécimes e reagentes antes da utilização. Evite uma agitação vigorosa.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Prepare as amostras de cabelo de acordo com o método do laboratório ou com o método recomendado abaixo.

PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE CABELO

1. Pese uma porção de 20mg de cada amostra de cabelo e coloque em **tubos de cultura de vidro de borosilicato descartáveis** de 16 x 100-mm, ou em recipientes equivalentes.
2. Passo de lavagem para cabelo: Adicione 2 ml de Metanol a cada tubo e incube durante 10 minutos à temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.
3. Decante o solvente e despeje a solução de metanol.
4. Adicione 2 ml de metanol fresco ao tubo e incube durante 2 horas a 70 – 75°C. Coloque uma tampa de tubo de ensaio perfurada nos tubos de cultura de vidro de borosilicato ou em recipientes equivalentes.
5. Resfrie o tubo até a temperatura ambiente e transfira o metanol para os tubos de cultura de vidro de borosilicato limpos de 12x75 mm ou recipientes equivalentes.
6. Evapore o metanol com fluxo de nitrogênio em um bloco de aquecimento a 37°C.
7. Adicione 600 µL de tampão de diluição (0,1% BSA/PBS) ao resíduo para reconstituir. Vortex.
8. Siga os procedimentos do teste.

Referência: Sweeney, Stacy A. *et al.* "Amphetamines in Hair by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay". Journal of Analytical Toxicology. Vol. 22, Outubro 1998.

PREPARAÇÃO DA ENZIMA

1. Antes da utilização, faça uma diluição 1:100 do conjugado droga-enzima utilizando o diluente droga-enzima fornecido. O conjugado droga-enzima é mais estável em sua forma concentrada. Dilua somente o volume necessário para os micropoços que estão sendo utilizados. Por exemplo:

Nº de placas	Volume do Conjugado	Volume do Diluente Droga-Enzima
1	140 µL	13,86 mL
5	700 µL	69,3 mL
25	3,5 mL	346,5 mL

2. Misture cuidadosamente a solução diluída do conjugado droga-enzima, invertendo manualmente de 10 a 15 vezes. **Não utilize o vórtex.** Armazene o conjugado não utilizado a 4°C.

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 de instrumentos automatizados.

1. Determine o número de micropoços e a quantidade de reagentes a serem utilizados.
2. Todos os componentes do teste ELISA, controles e amostras devem estar à temperatura ambiente antes da utilização. Misture delicadamente os frascos por inversão.

3. Pipete 20 μL dos padrões, controles e amostras nos micropoços.
4. Adicione 100 μL da enzima diluída (refira-se à Preparação da Enzima) em cada micropoço.
5. Deixe a reação incubar em temperatura ambiente por 30 minutos.
6. Uma vez completa a incubação, descarte ou aspire o líquido dos micropoços. Bata a placa dos micropoços contra um papel toalha livre de fibras para remover qualquer líquido remanescente nos micropoços.
7. Lave cada micropoço com 300 μL da solução diluída de tampão de lavagem e em seguida aspire para remover a solução dos micropoços. **Lavagem manual:** para procedimentos de lavagem manual, repita um total de 3 lavagens. Ao final das 3 lavagens, inverta a placa contendo os micropoços e bata contra um papel toalha absorvente para remover qualquer líquido remanescente nos micropoços. **Lavagem automatizada:** se uma lavadora de micropoços automatizada for utilizada, lave a placa num 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.
8. Prossiga imediatamente, adicionando 100 μL do substrato K-Blue em cada micropoço. Certifique-se que a parte exterior inferior dos micropoços esteja limpa e seca.
9. Deixe o substrato incubar por 15 minutos. A Neogen recomenda uma leve agitação durante este período, preferencialmente em um agitador de placas.
10. Adicione 100 μL da solução ácida de parada (Stop) em cada micropoço para cessar a reação.
11. Meça a absorbância a um comprimento de onda de 450 nm.

SENSIBILIDADE/ESPECIFICIDADE

Composto	Concentração Composto (pg/mg)	Cocaína Equivalentes (pg/mg)	% Reatividade cruzada
m-Hidroxibenzoilecgonina	104	500	481%
Cocaetileno	244	500	205%
Benzoilecgonina	244	500	205%
Cocaína	500	500	100%
Tropacocaína	7.200	500	6,94%
Ecgonina	23.200	500	2,16%
Metil éster ecgonina	32.000	500	1,56%
Norbenzoilecgonina	56.000	500	0,89%
Norcocaetileno	72.000	500	0,69%
Metil éster anidroecgonina	100.000	500	0,50%
Norcocaína	156.000	500	0,32%
Anidroecgonina	>400.000	500	<0,13%
Atropina	>400.000	500	<0,13%

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cada laboratório deve determinar o nível do valor de corte para a sua aplicação individual. Quando possível, calibradores de limite e/ou padrões devem ser preparados na mesma matriz a ser testada.

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

Resultado Negativo: amostras com uma absorbância acima do calibrador de limite do laboratório 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.

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