

INTENCIÓN DE USO

El kit Metabolitos de cocaína directo ELISA es una prueba específica y sensible in vitro para detectar la presencia de benzoilecgonina (BE) en muestras forenses, tales como sangre, suero, plasma y orina.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El abuso de la cocaína es generalizada y su prevalencia puede estar aumentando en todos los estratos sociales y la edad. El medicamento generalmente se inhala o se fuma. Existen varios métodos para la medición de Metabolitos de cocaína en la orina. La benzoilecgonina, un metabolito importante aparece dentro de minutos en la orina. Dado que el número y la proporción de los metabolitos varían en sujetos, los resultados se expresan en equivalentes de benzoilecgonina por ml. El kit metabolito directo de ELISA de cocaína es un único ensayo de incubación con resultados similares a los obtenidos por los métodos existentes. Nativo (inalterada) concentración de la orina de cocaína es mucho menor que la de su principal metabolito benzoilecgonina. Después de la administración intra - venosa de las concentraciones de orina cocaína 100mg varió desde 1,2 hasta 2,4 ug / ml en comparación con concentraciones que van desde 5 hasta 55 ug/ml para benzoilecgonina. La cocaína fue indetectable (en un 50 ng/ml de corte) 12 horas después de la administración en comparación con benzoilecgonina, que persiste días después de la administración. Se ha sugerido que una relación de benzoilecgonina /cocaína de menos de 100 es indicativo de uso dentro de las últimas 10 horas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Metabolitos de cocaína directo ELISA se basa en la unión competitiva con el anticuerpo marcado con enzima antígeno y antígeno sin marcar, en proporción a su concentración en la mezcla de reacción. A10 µl alícuota de una muestra desconocida diluida se incubó con 100 µl dilución de la enzima (peroxidasa de rábano picante) marcado derivado benzoilecgonina en pozos de micro, recubiertas de cantidades fijas de alta afinidad orientado anticuerpo policlonal purificado. Los pocillos se lavan a fondo y un sustrato cromogénico añadido. El color producido se detuvo con una solución de parada de ácido diluido y los pocillos se leyó a 450 nm. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de fármaco en la muestra. La técnica es sensible a 1 ng/ml. El Kit de Metabolitos de cocaína directo de ELISA evita la extracción de la muestra de orina o de sangre para la medición. Emplea un antisuero dirigido benzoilecgonina. Debido al método de propiedad de orientar el anticuerpo en el micro- placa de poliestireno sensibilidad mucho mayor se consigue en comparación con la adsorción pasiva. Esto permite a un extremadamente pequeño tamaño de la muestra, lo que reduce los efectos de matriz y la interferencia con las proteínas (s) de unión u otras macromoléculas.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropocillos	12x8x1
2. BE – Conjugado	12 ml
3. Inmunoanálisis Positiva Estándar Referencia	2 ml
4. Estándar Negativo	1 ml
5. Substrato TMB	12ml
6. Solución de Paro	11ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2-8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Materiales biológicos peligrosos potenciales:

1. El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B y de anticuerpos del VIH con reactivos con licencia del FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que pueda ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de la Hepatitis B VIH u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manipulados en el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud manual " Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos. " 1984
2. Este kit está destinado a la detección cuantitativa de cocaína Benzoilecgonina en la orina humana.
3. No pipetear con la boca. No fumar, comer o beber en las áreas en las que las muestras o los reactivos del kit.
4. Los componentes de este kit están pensados para su uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben ser mezclados.
5. Se recomienda que las muestras de suero se realizaron por duplicado.
6. Los resultados óptimos se obtienen por el estricto cumplimiento de este protocolo. Pipeteado exacto y preciso así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. **Precauciones:**
El Kit de benzoilecgonina directo ELISA es para ser utilizado con muestras forenses humanos, como sangre entera, suero y plasma. No ha probado todas las posibles aplicaciones de este ensayo. Criterios de corte son importantes para decidir la dilución de la muestra.
2. **Aditivos:**
Las muestras a las que se ha añadido acida de sodio afectan el ensayo.
3. **Instrucciones de Manejo y Almacenamiento:**
Las muestras de orina deben almacenarse a 2 – 40°C hasta su uso. Las muestras deberán mezclarse o vórtex antes del ensayo. Congelación y descongelación repetida debe ser evitado. Las muestras de orina se deben enviar refrigerado con hielo azul o equivalente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Diluir las muestras forenses, a la gama necesaria con tampón fosfato salino pH 7,0. (Las muestras de orina se diluyeron 1:10 normalmente para un punto de corte Benzoilecgonina de 300 ng/ml.) El factor de dilución y el volumen añadido se pueden ajustar sobre la base de punto de corte del laboratorio.
2. Añadir 10 µl de diluido apropiadamente estándar a cada pocillo por duplicado.
3. Añadir 10 µl de las muestras diluidas por duplicado (recomendado) a cada pocillo.
4. Añadir 100 µl del conjugado enzimático a cada pocillo. Toque en los lados de la sujeción de la placa para asegurar una mezcla adecuada.
5. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-26°C) preferiblemente en la oscuridad, después de la adición de conjugado de enzima para el último pocillo.
6. Lavar los pocillos 6 veces con 350 µl. agua destilada usando un lavador de placas adecuado o botella de lavado con cuidado de no cruzar contaminar pozos. Si las muestras de prueba que contienen cantidades anormalmente altas de hemoglobina (algunas muestras de autopsia), utilizan 10 mM de fosfato tamponado salino pH 7,0-7,4. Esto reducirá el potencial unión no específica de la hemoglobina al pozo, reduciendo así el color de fondo.
7. Invierta pozos y bofetada vigorosamente seca sobre papel absorbente para eliminar todo garantizar la humedad residual. Este paso es fundamental para garantizar que el conjugado de enzima residual, no sesgar los resultados. Si se utiliza un sistema automatizado, asegurarse de que la aspiración final en los aspirados de ciclo de lavado desde cualquiera de los lados del pozo.
8. Añadir 100 µl de reactivo de sustrato a cada pocillo y puntee lados del soporte de la placa para asegurar una mezcla adecuada.
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, preferiblemente en la oscuridad.
10. Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo, para cambiar el color de azul a amarillo.
11. Medir la absorbancia a una longitud de onda doble de 450 nm y 650 nm.
12. Los pocillos, debe leerse dentro de 1 hora de desarrollo de color amarillo.

Los siguientes datos representan una curva típica de dosis / respuesta.

Benzoilecgonina (ng/ml)	Absorbancia
0	2.2
10	0.52
25	0.33
50	0.27

La curva de dosis / respuesta se muestra más arriba no debe ser utilizado en los cálculos de ensayo. Se recomienda que al menos una muestra de control de calidad positiva en la empresa se incluye con cada serie de análisis. Una curva de respuesta a la dosis o un calibrador de corte deben procesarse con cada plato.

PERFORMANCE

1. Precisión:

60 muestras de sangre entera y 35 muestras de orina recogidas de presuntos no usuarios se ensayaron en el metabolito directo de ELISA Kit de cocaína. El cien por ciento de estas muestras normales negativos medidos en 50 ng/ml de benzoilecgonina para sangre entera y 300 ng/ml de benzoilecgonina para la orina. 35 muestras de sangre entera que fueron confirmadas previamente positivo para benzoilecgonina por GC-MS empleando un punto de corte de 50 ng/ml, se pusieron a prueba en el metabolito directo ELISA Kit cocaína. Se encontró que todas las muestras a ser positivo, es decir por encima del punto de corte de 50 ng/ml.

2. Precisión:

La precisión del metabolito directo de ELISA Kit de cocaína ha sido verificada por la evaluación de la media, la desviación estándar (SD) y los coeficientes de variación (CV) en los datos resultantes de ensayos repetitivos.

3. Precisión Intra-ensayo:

La Precisión Intra-ensayo se determinó con los controles de referencia. Un estándar de 0, 10, 25 y 50 ng/ml se ensayó cinco veces en el mismo ensayo.

Benzoilecgonina (ng/ml)	Principales Abs.	S.D.	C.V.%
0	2.377	0.115	4.84
10	1.099	0.078	7.73
25	0.695	0.045	6.47
50	0.518	0.049	9.51

4. Sensibilidad:

La sensibilidad del ensayo basado en la concentración mínima benzoilecgonina requerida para producir una desviación estándar de cuatro de ensayo de AO es 1 ng/ml.

5. Especificidad:

La especificidad del ELISA para Metabolitos de cocaína se determinó mediante la generación de curvas de inhibición para cada uno de los compuestos enumerados a continuación.

Compuesto	Aprox. ng/ml equiv. A 50 ng	Reactividad Cruzada
Benzoilecgonina	50	100
Cocaína	75	66
Cocaína de Etileno	55	90
Norcocaína	5000	2.5
Norcocatilena	5000	1
Ecgonina	5000	1
Ecgonina Metil Ester	10000	1

REFERENCIAS

1. Urine Testing for Drugs of Abuse, National Institute on Drug Abuse Research Monograph. 73: 95-97 (1986).
2. R.K. Siegel. In: National Institute on Drug Abuse. Research Monograph Series 50, pp. 92-110 (1986).
3. M.J. Kogan, K.G. Vereby, A.C. De Pace, R.B. Resnik and S.J. Mule. Anal. Chem. 49:1965 (1977).
4. Diagnostic Products Corp. Double Antibody COCAINE/BENZOYLECGONINE Assay.
5. Roche Diagnostics. Abuscreen COCAINE/BENZOYLECGONINE Radio-immunoassay.
6. Syva Corp. EMIT COCAINE/BENZOYLECGONINE Assay.
7. J. Ambre. J. Anal. Toxicol. 9:241 (1985).

Distribuido por:
Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
01800-111-4343
www.grupomexlab.com