

INTENCIÓN DE USO

El Kit Anfetamina directo ELISA proporciona sólo un resultado analítico preliminar cualitativo. Un método químico alternativo más específico debe ser utilizado con el fin de obtener un resultado analítico confirmado. La cromatografía de gases/espectrometría de masas (GS-MS) es el método preferido para confirmación. El juicio profesional debe aplicarse a cualquier medicamento resultado de abuso, en particular cuando se utilizan resultados preliminares positivos.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El Kit Anfetamina directo ELISA es una prueba específica y sensible in vitro para detectar la presencia de la d-anfetamina en muestras tales como sangre completa, líquidos orales, suero, plasma y orina. Si bien el ensayo detectará el consumo de anfetaminas, la injerencia de L-anfetamina y pseudo-efedrina es prácticamente inexistente. La anfetamina es un estimulante del sistema nervioso central potente. El (+)-isómero también se conoce como la d-anfetamina es de tres a cuatro veces más potente que el (-)-isómero, L-anfetamina. La anfetamina puede ser metabolizado y excretado como el isómero p-hidroxi. Las anfetaminas actúan mediante la inducción de euforia, irritabilidad, ansiedad y paranoia. Las tasas de excreción urinaria están influenciadas por el pH de la orina con orina ácida favorece la excreción del fármaco inalterado. Hasta el 80% de una dosis dada se puede excretar sin cambios, especialmente en orina de ácido. Orina alcalina reduce la excreción de anfetamina sin cambios a menos del 5% de la dosis.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Kit Anfetamina directo ELISA (para la medición de d-anfetamina) se basa en la unión competitiva al anticuerpo marcado con enzima antígeno y el antígeno no marcado, en proporción a su concentración en la mezcla de reacción. A 10 µl alícuota de una muestra desconocida diluida se incubó con 100 µl dilución de enzima (peroxidasa de rábano picante) marcado con d-anfetamina derivado en los pocillos de micro-placa, recubierta con cantidades fijas de alta orientada a la afinidad del 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 ELISA Kit de anfetamina directo evita la extracción de la muestra de orina para la medición. Se emplea un antisuero dirigido d- anfetamina. 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 para reducir los efectos de la matriz y la interferencia con las proteínas (s) de unión u otras macromoléculas.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropocillos recubiertos con anticuerpo policlonal anti-d-anfetamina	12x8x1
2. d-Amph Conjugado	12 ml
3. Inmunoanálisis positivo estándar de referencia	2 ml
4. Estándar Negativo	1 ml
5. Substrato TMB	12 ml
6. Reactivo Detenido	11 ml

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 cuadriculado.

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. El Kit de Anfetamina directo ELISA es para ser utilizado con muestras humanas, tales como sangre completa, líquidos orales, suero, orina 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. Las muestras a las que la acida de sodio ha sido agregado afecta el ensayo.
3. Las muestras de orina deben almacenarse a 2 – 40°C hasta su uso. Las muestras deberán mezclarse antes del ensayo.
4. 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, a la gama necesaria con tampón fosfato salino pH 7,0. Las muestras de orina 01:20 para un nivel de corte de 500 ng/ml) El factor de dilución se puede ajustar el punto de corte basado en los laboratorios.
2. Añadir 10 µl de calibradores y estándares apropiadamente diluidas 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. 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.

d- Amfetamina (ng/ml)	Absorbancia
0	2.459
10	0.891
25	0.431
50	0.255

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.

RESULTADOS

Si la absorbancia media de la muestra es igual a o menor que la absorbancia media de la norma de referencia positivo laboratorio, la muestra es positiva para la anfetamina. Si la absorbancia media de la muestra es mayor que la absorbancia media de la norma de referencia positivo laboratorio, la muestra se llama negativa para anfetamina. Alternativamente, una curva de respuesta a la dosis puede ser establecida por el trazado de concentración estándar (eje de abscisas) frente a la absorbancia correspondiente (ordenada).

Los valores para las muestras desconocidas se obtienen por interpolación de la curva.

PERFORMANCE

1. Precisión:

40 muestras de sangre entera y 40 muestras de orina recogidas de presuntos no usuarios se ensayaron en el kit Anfetamina directo ELISA. El 100% de estas muestras normales negativos medidos en 50 ng/ml para sangre completa y 500 ng/ml para la orina. 35 muestras de sangre entera que fueron confirmadas previamente positivo para anfetaminas por GC-MS empleando un punto de corte de 50 ng/ml, se pusieron a prueba en el Kit Anfetamina directo ELISA. Todas las muestras resultaron ser positivas es decir, por encima de la línea de corte de 50 ng/ml.

2. Precisión:

La precisión del kit Anfetamina directo ELISA ha sido verificado 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:

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. Los resultados se tabulan en la siguiente tabla:

Anfetamina (ng/ml)	Promedio ABS	S.D.	C.V.%
0	2.399	0.115	4.8
10	0.897	0.095	10.6
25	0.458	0.061	13.32
50	0.271	0.022	8.12

4. Sensibilidad:

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

5. Especificidad:

La especificidad de la prueba ELISA para anfetamina se determinó mediante la generación de curvas de inhibición para cada uno de los compuestos enumerados a continuación los antisueros reactividades cruzadas se enumeran en la Tabla 2:

Compuesto	Aprox. ng/ml equiv. A 25 ng	Reactividad Cruzada
Anfetamina	865	2.9
Hydroxiamfetamina HCl	57	44
l-Metamfetamina HCl	1,250	2
dl-MDA	10	250
(metilenedioxiamfetamina) Metamfetamina HCl	417	6.5
dl- HMA	100	25
(Metoxiamfetamina hidroxil) Fenteramina	28	89
Fenfluramina	2,500	1
d-Efedrina	2,500	1
l-Efedrina	2,500	1
d-Fenilpropanolamina	2,500	1
l-Fenilpropanolamina	2,500	1
-MDMA	2,500	1
(metileno dioximetamfetamina) dl-MDEA	2,500	1
(metileno dioxietilamfetamina) d-pseudoefedrina	2,500	1
l-Pseudoefedrina	2,500	1
dl-MBDB	2,500	1
N-metil-3,4metileno dioxifenil-2-butanamino) Tiramino	2,500	1
Metilfenidato	2,500	1

REFERENCIAS

1. Urine Testing for Drugs of Abuse, National Institute on Drug Abuse Research Monograph. 73: 95-97 (1986).
2. N.Weiner. Norepinephrine, epinephrine and the sympathomimetic amines. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th ed. p.145-180 (New York: MacMillan 1985).
3. J. Caldwell and P.S. Sever. The Biochemical Pharmacology of Abused Drugs. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 16: 625- 638 (1974).
4. R. C. Baselt. In: Advances in Analytical Toxicology, Vol.1. p.87 - 93. Ed. R. C. Baselt, Biomedical Publications, Foster City, CA (1984).

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