

INTENCIÓN DE USO

El kit Metanfetamina 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 confirmatorio. La Espectrometría de masas cromatografía de gases (GS-MS) es el método de confirmación preferido. El juicio profesional debe ser aplicado a cualquier resultado de drogas de abuso, en particular cuando se observan resultados preliminares positivos.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El kit Metanfetamina Directo ELISA es un ensayo in vitro específico y sensible para detectar la presencia de Metanfetamina en muestras de sangre, suero, plasma y orina. La prueba detectará la presencia de Metanfetamina sin interferencias por presencia de l-metanfetamina o Pseudo Efedrina. La Metanfetamina es un poderoso estimulante del sistema nervioso central con menores acciones periféricas que la Anfetamina. El Isómero (+)- conocido también como D-Metanfetamina es diez veces más potente que el Isómero (-)-, también llamado l-Metanfetamina.

Entre sus efectos se pueden nombrar euforia, irritabilidad, ansiedad y paranoia. La Metanfetamina es metabolizada por su metabolito activo Anfetamina (vía N-Demetilación) y posteriormente metabolizada por hidroxilación y desaminación de la Anfetamina. Las tasa de excreción urinaria se ven influenciadas en su PH por la presencia de orina ácida, que favorece la excreción de la sustancia no modificada. Hasta el 80% de la dosis consumida puede ser excretada sin modificaciones, especialmente por orina ácida. La orina alcalina reduce la excreción de metanfetamina no modificada hasta menos de 5% de la dosis consumida.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Metanfetamina ELISA (para determinación de D-Metanfetamina) directo se basa en la unión competitiva del anticuerpo a un antígeno marcado enzimáticamente y a otro no marcado, en proporción a su concentración en la mezcla reactiva. Una alícuota de 10 µl de espécimen desconocido diluido es incubado junto a 100 µl del conjugado enzimático marcado (Peroxidasa de Rábano Picante) en las microplacas recubiertas con cantidades fijas de anticuerpo policlonal purificado de gran afinidad. Luego de un paso de lavado es agregado el sustrato. La coloración producida es frenada por la solución de frenado y se realiza la lectura de las microplacas a 450 nm. La intensidad de color generada es inversamente proporcional a la cantidad de Metanfetamina en la muestra. La técnica tiene una sensibilidad de 1 ng/ml.

El Kit Metanfetamina Directo ELISA evita la extracción de muestra de orina o de sangre para la medición. Se emplea un antisuero dirigido. Debido al método de orientar el anticuerpo en la microplaca se logra una sensibilidad mucho mayor en comparación con la adsorción pasiva. Esto permite un tamaño extremadamente pequeño 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. Micropozos recubiertos con anti D-Metanfetamina Policlonal	12x8x1
2. Conjugado Enzimático D-Metanfetamina: 1 Frasco	12 ml
3. Estándar Positivo: 1 Vial	2 ml
4. Estándar Negativo: 1 Vial	1 ml
5. Sustrato TMB: 1 Frasco	12 ml
6. Solución de Frenado: 1 Frasco	11 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA 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. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que 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

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipeteo con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. **Precauciones:** El kit Barbitúrico Directo ELISA debe ser utilizado en muestras humanas de sangre suero, plasma u orina. El criterio de corte es importante en la elección del factor de dilución, y debe depender del criterio del laboratorio.
2. **Aditivos:** Especímenes con Azida de Sodio han afectado los resultados del ensayo.
3. **Almacenamiento:** Las muestras de orina pueden almacenarse a 2-4°C. Las muestras deben ser correctamente mezcladas. Evitar múltiples ciclos de congelación - descongelación.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Diluir las muestras hasta el rango necesario con Buffer de Fosfato Salino pH 7.0 (Las muestras de orina son normalmente diluidas en 1:20 para un punto de corte de Metanfetamina de 500 ng/ml. El volumen y el factor de dilución pueden modificarse según la elección de punto de corte).
2. Agregar 10 µl de los calibradores y estándares en los micropocillos apropiados por duplicado.
3. Agregar 10 µl de las muestras diluidas en los micropocillos apropiados por duplicado.
4. Dispensar 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo. Asegurar el mezclado correcto.
5. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente (18-23°C) preferentemente en la oscuridad.
6. Retirar el líquido de los pozos. Lave en seis tiempos con 350 µl de agua destilada usando un lavador de placas adecuado o botella de lavado con cuidado de causar contaminación cruzada. Las muestras de ensayo que contienen cantidades anormalmente altas de hemoglobina (algunas muestras postmortem), utilizar 10 mM de Buffer de Fosfato Salino pH 7,0-7,4. Esto reducirá la potencial unión no específica de la hemoglobina disminuyendo así el color de fondo.
7. Sacudir profusamente sobre papel absorbente para eliminar gotas residuales. Este paso es crítico.
8. Dispensar 100 µl de sustrato TMB. Asegurar el mezclado correcto.
9. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, preferentemente en la oscuridad.
10. Agregar 100 µl de solución de frenado. La coloración debe cambiar de azul a amarillo.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 60 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los siguientes datos son representativos de la Curva Estándar:

D-Metanfetamina (ng/ml)	Absorbancia
0	1.519
10	0.649
25	0.471
50	0.359

La curva estándar no debe ser utilizada en los cálculos de ensayo. Se recomienda que al menos una muestra de control de calidad positiva del laboratorio se incluya en cada serie de análisis. Una curva estándar deben procesarse con cada ensayo.

RESULTADOS

Si la absorbancia media de la muestra es menor o igual que la absorbancia promedio del estándar de referencia del laboratorio para Metanfetamina, entonces la muestra es positiva para Metanfetamina.

Si la absorbancia media de la muestra resulta mayor, entonces será negativa para Metanfetamina. Alternativamente, una curva estándar 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. Exactitud:

60 muestras de sangre y 40 muestras de orina recogidas de sujetos aparentemente sanos fueron analizadas por el presente ensayo. Un 100% de las muestras resultaron negativas en equivalentes de 50 ng/ml de Metanfetamina. 40 muestras previamente testeadas positivas por GC-MS utilizando un punto de corte de 50 ng/ml fueron analizadas por el presente ensayo, resultando todas positivas sobre un punto de corte de 50 ng/ml.

2. Precisión:

Estudio Intra-Ensayo:

Estándares de 0, 10, 25 y 50 ng/ml fueron analizados 5 veces en el mismo ensayo.

Secobarbital (ng/ml)	Media Abs.	S.D.	C.V.%
0	1.652	0.089	5.4
10	0.697	0.055	7.9
25	0.504	0.0614	12.2
50	0.366	0.0391	10.7

3. Sensibilidad:

Basada en la concentración mínima de Metanfetamina requerida para producir cuatro Desvíos estándar respecto del ensayo cero, resultando ser **1 ng/ml**.

4. Especificidad:

La especificidad del kit Metanfetamina Directo ELISA fue determinada al generar curvas inhibitorias para cada uno de los compuestos que se detallan debajo:

Compuesto	Aprox. ng/ml equiv. a 50 ng de Metanfetamina	Reactividad Cruzada
d,l-methamphetamine	77	65
l-methamphetamine	625	8
d,l-MDMA	37	135
d-amphetamine	2500	2
l-amphetamine	1500	3.4
p-hydroxyamphetamine	>5000	<1.0
d,l-MDA	>5000	<1.0
d,l-MDEA	500	10
d,l- MBDB	1000	5
d,l-HMA	>5000	<1.0
fenfluramine	1000	5
d-ephedrine	4300	1.2
l-ephedrine	>5000	<1.0
d,l-ephedrine	>5000	<1.0
beta - phenethylamine	>5000	<1.0
phentermine	>5000	<1.0
d-phenylpropanolamine	>5000	<1.0
d,l-phenylpropolamine	>5000	<1.0

5. Reactividad Cruzada con Drogas no relacionadas:

Las alícuotas de una matriz de orina humana se enriquecieron con los siguientes compuestos a una concentración de 10,000 ng/ml. Ninguno de estos compuestos dio valores en el ensayo que fuera igual o mayor que el nivel de sensibilidad del ensayo.

Acetaminophen, Acetylsalicylic acid, Aminopyrine, Ampicillin Amobarbital, Ascorbic acid, Atropine, Barbitol, Benzoyllecgonine, Butobarbital, Caffeine, Cocaine, Carbamazepine, Codeine, Chloroquine, Chlorpromazine, Carbromal, Desipramine, Dextromethorphan, Dextropropoxyphene, 5,5-Diphenylhydantoin, 10-11-Dihydro carbamazepine, Diazepam, Ethosuximide, Estriol, Estrone, Estradiol, Ethotoin, Glutethimide, Hexobarbital, Ibuprofen, Imipramine, Lidocaine, LSD, Methadone, Methadone-primary metabolite, Methaqualone, Metharbital, Mephentoin, "-Methyl-"-propylsuccinimide, Mephobarbital, Methyl PEMA, Methsuximide, 4-Methylprimidone, Morphine, Meperidine, Niacinamide, Norethindrone, N-Normethsuximide, Phenobarbital, Phensuximide, PEMA, Primidone, Phencyclidine, Pentobarbital, Phenothiazine, Procaine, Quinine, Secobarbital, Tetracycline, Tetrahydrozoline, THCCOOH.

REFERENCIAS

1. Urine Testing for Drugs of Abuse, National Institute on Drug Abuse Research Monograph, 73, 1986.
2. R.C. Baselt. In: Advances in Analytical Technology, Vol.1. Randall C. Baselt edd. (Biomedical Publications, Foster City, CA. 87-93).
3. Driscoll, R.C., Barr, F.S., Gragg, B.J. and G.W. Moore. Determination of Therapeutic Blood Levels of Methamphetamine by GC. J.Pharm. Sci 60:1492.1971.

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