

INTENCIÓN DE USO

El kit Benzodiazepinas Directo ELISA es un test in vitro sensible para detectar la presencia de Benzodiazepinas en muestras de sangre, suero, plasma y orina.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Las Benzodiazepinas son una clase de fármacos depresores del sistema nervioso central ampliamente prescritos como sedantes, relajantes musculares y tratamientos anticonvulsivos. Su uso crónico resulta en una dependencia moderada y tolerancia a los efectos de la droga. El uso de alcohol combinado con el de Benzodiazepinas ha demostrado tener un mayor efecto supresor en el sistema nervioso central que aquel atribuible a cualquier producto químico por sí solo. Las Benzodiazepinas se administran por vía oral y por lo general se absorben rápidamente. El metabolismo de las benzodiazepinas se lleva a cabo principalmente en el hígado y se excreta en la orina como una variedad de metabolitos relacionados estructuralmente. Similitudes metabólicas incluyen la eliminación de sustituyentes del anillo B de las 1,4 Benzodiazepinas y hidroxilación alfa de los triazolobenzodiazepinas, la hidroxilación del carbono de la posición 3 del anillo B y la conjugación de los metabolitos hidroxilados. Seguido por la excreción urinaria de glucuronidos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Benzodiazepina Directo ELISA 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 espécimen desconocido diluido es incubado junto a 100µl 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 Antidepresivo Tricíclico en la muestra. La técnica tiene una sensibilidad de 2 ng/ml. El presente Kit ELISA evita la extracción de muestra de orina o de sangre para la medición. Se emplea Oxacepan como 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.

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 pipetee 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 Benzodiazepina 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.

| MATERIALES PROVISTOS | 96 Pruebas |
|---|------------|
| 1. Micropozos recubiertos | 12x8x1 |
| 2. Conjugado Enzimático Benzo: 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.

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 sangre para Oxacepan son normalmente diluidas en 1:10 para un punto de corte de 200 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 450nm 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:

| Oxacepan (ng/ml) | Absorbancia |
|------------------|-------------|
| 0 | 3.043 |
| 10 | 0.750 |
| 25 | 0.548 |
| 50 | 0.388 |

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 Benzodiazepinas, entonces la muestra es positiva.

Si la absorbancia media de la muestra resulta mayor, entonces será negativa para Benzodiazepinas. 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.

REFERENCIAS

1. Urine Testing for Drugs of Abuse, National Institute on Drug Abuse Research Monograph, 73, 1986.
2. S.C. Harvey, "Hypnotics and Sedatives" in The Pharmacological Basis of Therapeutics 7th Ed., 1985 L.S. Goodman and A. Gilman, T.W. Rall and F. Murad, edd. (New York, Macmillan, (pp339-51)
3. Greenblatt, D.J., Lacasse Y., and Shader, R.I.: "Acute Overdosage with Benzodiazepine Derivatives." Clin. Pharmacol. Ther. 21:4976, 1977.
4. Blum, K.: Handbook of Abusable Drugs, Gardner Press, p. 371, 1984.
5. R.C. Kelley et al, "Association of Benzodiazepines with death in a major metropolitan area" Journal of Analytical Toxicology 6, 1982 p. 91-96.
6. Kaplan, S.A. and Jack, M.L.: "Metabolism of the Benzodiazepines: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations" In: The Benzodiazepines: From Molecular Biology to Clinical Practice. E. Costa, Ed. Raven Press, New York p. 173, 1983.

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