

### INTENCIÓN DE USO

El kit Barbitúrico 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 (1). 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 Barbitúrico Directo ELISA es un ensayo in vitro específico y sensible para detectar la presencia de Barbitúricos en muestras de sangre, suero, plasma y orina. Los Barbitúricos –derivados de Acido Barbitúrico- actúan como sedantes que en dosis bajas provocan relajación, mientras que en dosis altas pueden causar coma y hasta la muerte. Los Barbitúricos son generalmente consumidos por vía oral, aunque también pueden ser administrados por vía intravenosa o intramuscular, con gran absorción. El metabolismo de los Barbitúricos se realiza principalmente en el hígado, un gran número de caminos de metabolización han sido descritos, tales como oxidación, desulfuración y polimerización por apertura anillar. Debido a que el número y proporción de los diferentes metabolitos Barbitúricos varían en cada individuo, los resultados se expresan en términos equivalentes al estándar secobarbital/ml.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Barbitúrico 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 10 µl de espécimen desconocido diluido es incubada junto a 100 µl del conjugado enzimático (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 Barbitúrico en la muestra. La técnica tiene una sensibilidad de 1 ng/ml.

El Kit Barbitúrico 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.

### 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 Barbitúrico Directo ELISA debe ser utilizado en muestras humanas de sangre suero, plasma u orina.
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 con anti-Barbitúrico Policlonal | 12x8x1     |
| 2. Conjugado Enzimático THC: 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 cuadrículado.

## 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 Secobarbital 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 estándares diluidos 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), utilizan 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.
9. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, preferentemente en la oscuridad.
10. Agregar 100 µl de solución de frenado.
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:

| Secobarbital (ng/ml) | Absorbancia |
|----------------------|-------------|
| 0                    | 1.955       |
| 10                   | 0.758       |
| 25                   | 0.652       |
| 50                   | 0.514       |

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.

## PERFORMANCE

### 1. Exactitud:

45 muestras de sangre y 50 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 Secobarbital para sangre y 200 ng/ml de Secobarbital para orina. 35 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, 5, 10 y 25 ng/ml fueron analizados 8 veces en el mismo ensayo.

| Secobarbital (ng/ml) | Media Abs. | S.D.  | C.V.% |
|----------------------|------------|-------|-------|
| 0                    | 1.944      | 0.149 | 7.67  |
| 5                    | 0.822      | 0.073 | 8.9   |
| 10                   | 0.695      | 0.057 | 8.2   |
| 25                   | 0.562      | 0.066 | 11.7  |

### 3. Sensibilidad:

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

### 4. Especificidad:

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

| Compuesto              | Aprox. ng/ml equiv. a 25 ng de Secobarbital | Reactividad Cruzada |
|------------------------|---|---------------------|
| Aprobarbital           | 45  | 55                  |
| Butobarbital           | 60  | 42                  |
| Barbital               | 125   | 20                  |
| Amobarbital            | 48  | 52                  |
| Butalbital             | 55  | 46                  |
| p-Hydroxyphen-barbital | 60  | 42                  |
| Pentobarbital          | 52  | 48                  |
| Diallylbarbituric acid | 60  | 42                  |
| Phenobarbital          | 114   | 23                  |
| Barbituric acid        | >1250                                       | <1                  |
| Hexobarbital           | >1250                                       | <1                  |
| Mephobarbital          | >1250                                       | <1                  |

### 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 5000 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, Amphetamine, Aminopyrine, Ampicillin, Ascorbic acid, Atropine, Benzoyllecgonine, Caffeine, Cocaine, Carbamazepine, Codeine, Chloroquine, Chlorpromazine, Carbromal, Desipramine, Dextromethorphan, Dextropropoxyphene, 5,5- Diphenylhydantoin, 10-11-ihydrocarbamazepine, Diazepam, Ethosuximide, Estriol, Estrone, Estradiol, Ethotoin, Glutethimide, Ibuprofen, Imipramine, Lidocaine, LSD, Methadone, Methadone-primary metabolite, Methaqualone, Methamphetamine, Mephentoin, "-Methyl"-propylsuccinimide, Methyl PEMA, Methsuximide, 4-Methylprimidone, Morphine, Meperidine, Niacinamide, Norethindrone, N- Normethsuximide, Phensuximide PEMA, Primidone, Phencyclidine, Phenothiazine, Phenylpropanolamine, Procaine, Quinine, THC-COOH.

## REFERENCIAS

1. Urine Testing for Drugs of Abuse, National Institute on Drug Abuse Research Monograph, 73, 1986.
2. S.C. Harvey, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th Ed., L.S. Goodman and A. Gilman edd. (New York, Macmillan, 1975) ( pp102-23)
3. R.C. Baselt. In: Advances in Analytical Technology, Vol.1. Randall C. Baselt ed. (Biomedical Publications, Foster City, CA. 93-97).

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