

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОПТЕРИНА

RE59321, Neopterin ELISA

Каталог. № : **RE59321**

Методика от **08-2012**

Количество : **96**

Производитель : **IBL (Германия)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Иммуноферментный анализ по количественному определению Неоптерина в сыворотке, плазме или моче человека. Только для использования в In-vitro диагностике.

2. РЕЗЮМЕ И ПОЯСНЕНИЯ (См. Оригинал инструкции на английском языке)

3. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Иммуноферментный анализ твердой фазы (ИФА) основан на фундаментальном принципе конкурентного метода ИФА. Неизвестное количество антигена в образце и определенное количество антигена, меченного ферментом, соревнуются за связывающие поверхности антигена (кролик-анти-неоптерин). Оба комплекса антиген-антитело связываются с лунками микротитраторных полосок, покрытых козким-анти-кроличьим антителом. Антиген, который не связывается, удаляется при мытье. Интенсивность полученного цвета после инкубации субстрата обратно пропорциональна количеству антигена в образце. Результаты образцов могут быть определены непосредственно с использованием эталонной кривой.

4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в In-vitro диагностике. Только для профессионального использования.
- Перед началом проведения теста полностью и внимательно прочитать инструкцию. Использовать действующую версию инструкции, предоставленной с набором. Убедиться в том, что все понятно.
- В случае сильного повреждения упаковки набора, обратиться к IBL или Вашему поставщику в письменной форме не позже, чем через неделю после получения набора. Не использовать поврежденные компоненты для проведения теста, но сохранить их для решения спорных вопросов на случай жалобы.
- Проверить соответствие номера партии и срок годности. Не смешивать реагенты из разных партий. Не использовать просроченные реагенты.
- Следовать правилам лабораторной практики и соблюдать правила техники безопасности. Использовать лабораторные халаты, одноразовые перчатки и защитные очки при необходимости.
- Реагенты данного набора, содержащие опасные материалы, могут вызвать раздражение глаз и кожи. За деталями обратиться к разделу ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ и этикеткам. Данные по безопасности данного продукта доступны на веб-странице IBL или по запросу непосредственно от IBL.
- С химикатами и приготовленными или использованными реагентами обращаться как с опасными отходами в соответствии с национальными правилами по биологической безопасности.
- Избегать контакта со Стоп раствором. Это может вызвать раздражение или ожоги кожи.
- Все реагенты этого набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были тестированы и дали отрицательный результат с анти-HIV I/II, HBsAg и анти-HCV. Тем не менее, присутствие этих или других инфекционных агентов полностью нельзя исключить, и поэтому реагенты считать потенциально опасными в обращении и уничтожении.

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор доставляется при температуре окружающей среды и должен храниться при 2-8 °С. Не допускать нагревания и попадания прямых солнечных лучей. Условия хранения и стабильности образца и приготовленных реагентов описаны в соответствующих разделах. Микропланшетные полоски остаются стабильными до окончания

срока годности в распечатанной, но тщательно закрытой упаковке при температуре 2-8 °С.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Сыворотка, Плазма (ЭДТК)

Соблюдать обычные меры предосторожности при венопункции. Важно сохранить химическую целостность образца крови с момента его забора до проведения анализа. Не использовать избыточные гемолитические, иктерические или очень липемические образцы. Не использовать образцы, содержащие NaN₃. Мутные образцы необходимо центрифугировать перед тестированием для удаления любого корпускулярного материала.

Хранение:	2-8 °С	≤ -20 °С (Аликвоты)	Не допускать нагревания и попадания прямых солнечных лучей. Избегать циклов повторного замораживания-оттаивания.
Стабильность:	72 часа	6 месяцев	

Моча

Допускается использование как свежей, так и 24 часовой мочи. Общее количество мочи, собранной в течение 24 часов, собрать и перемешать в одной бутылочке. Консервирование не обязательно. Определить общий объем для подсчета результатов. **Перемешать и центрифугировать образцы перед их использованием для анализа.**

Хранение:	2-8 °С	≤ -20 °С (Аликвоты)	Не допускать нагревания и попадания прямых солнечных лучей. Избегать циклов повторного замораживания-оттаивания.
Стабильность:	72 часа	6 месяцев	

7. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Кол-во	Символ	Компонент
1x12x8	MTP	Пластина микротитратора Разделить IgG полоски. Покрыта анти-кроличьим IgG (козий, поликлональный).
1x5 мл	ANTISERUM	Антисыворотка Неоптерина Готова к использованию. Содержит: Антисыворотка (кроличья), фосфатный буфер, стабилизаторы.
1x13 мл	ENZCONJ	Ферментный конъюгат Готов к использованию. Содержит: Неоптерин, конъюгированный с пероксидазой, фосфатный буфер, стабилизаторы. Хранить защищенным от света.
1x1.5 мл	CAL A-F	Стандарт A-F 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 нмоль/л Готов к использованию. Содержит: Неоптерин, фосфатный буфер, стабилизаторы.
1x2x1.5 мл	Control 1 + 2	Контроль 1 + 2 Готовы к использованию. За информацией о концентрациях/приемлемых диапазонах значений см. Сертификат качества.
1x21 мл	ASSAYBUF	Буфер для анализов Готов к использованию. Содержит: фосфатный буфер, БСА, стабилизаторы.
1x50 мл	WASHBUF CONC	Концентрат Промывочного буфера (20x) Содержит: Твин, стабилизаторы.
1x19 мл	TMB SUBS	Раствор субстрата ТМБ Содержит: ТМБ, буфер, стабилизаторы.
1x19 мл	TMB STOP	Стоп раствор ТМБ 1 М H ₂ SO ₄ . Готов к использованию.
1x	FOIL	Адгезивная фольга

8. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропипетки (Мультипипетка Эппендорфа или подобные приборы, <3 % CV). Объем: 10; 50; 100; 1000 мкл.
- Вихревая мешалка.
- Орбитальный шейкер (500 об/мин).
- 8-канальные микропипетки с резервуарами реагентов.
- Промывалка, автоматизированная или полуавтоматизированная промывочная система пластины микротитратора.
- Считывающее устройство пластины микротитратора, способное считывать спектральную поглощательную способность при 450 нм (контрольная длина волны 600-650 нм).
- Бидистиллированная или деионизированная вода.
- Бумажные полотенца, наконечники для пипеток и таймер.

9. ПРИМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

- Любое ненадлежащее обращение с образцами или отступление от процедуры теста может повлиять на результаты. Указанные объемы пипетирования, время инкубации, температуры и предварительные шаги должны строго соблюдаться в соответствии с инструкцией. Использовать только калиброванные пипетки и приборы.
- Сразу же после начала проведения теста все шаги должны быть полностью выполнены без перерыва. Убедитесь, что требуемые реагенты, материалы и приборы готовы к использованию в нужное время. Привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (18-25 °C) и аккуратно встряхнуть каждую пробирку с жидким реагентом и образцом перед использованием. Смешивать реагенты, не доводя их до пенообразования.
- Избегать загрязнения реагентов, пипеток и резервуаров/пробирок. Для каждого компонента и образца использовать новый одноразовый пластиковый пипеточный наконечник. Не путать крышки. Всегда закрывать неиспользуемые флаконы. Не использовать повторно резервуары/пробирки или реагенты.
- Рекомендуется определение образцов в двух экземплярах для возможности потенциальных ошибок пипетирования.
- Использовать схему пипетирования для проверки подходящей разметки планшета.
- Время инкубации влияет на результаты. Все резервуары должны обслуживаться в одинаковом порядке и временной последовательности. Рекомендуется использование 8-канальной микропипетки для пипетирования растворов во все лунки.
- Мытье микропланшета является важной процедурой. Плохо вымытые лунки дадут неверные результаты. Рекомендуется использование мультиканальной пипетки или автоматизированной промывочной системы пластины. Не допускать высыхания лунок между инкубациями. Не царапать покрытые лунки во время полоскания и аспирации. Смыть и наполнять все реагенты с осторожностью. Во время ополаскивания проверить, что все лунки заполнены точно Промывочным буфером, и что в лунках нет осадков.
- Влажность влияет на покрытые лунки/пробирки. Не вскрывать упаковку до тех пор, пока она не достигнет комнатной температуры. Неиспользованные лунки/пробирки немедленно поместить в упаковку вместе с влагопоглотителем и запечатать.

10. ИНСТРУКЦИИ ПО ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОГотовКЕ

10.1 Подготовка концентрированных компонентов

Содержимое набора для проведения 96 тестов может быть разделено на 3 отдельных испытания. Объемы, указанные ниже, предназначены для одного испытания с 4 полосками (32 определения).

Развес- ть/ Раство- ритель	Компонент	с	Растворитель	Отношение	Хранение	Стабильность
15 мл	WASHB UF CONC	28 5 мл	Дист. вода	1:20	2-8 °C	1 месяц

10.2 Разведение Образцов

Образец	развести	с	Отношение	Примечания
Сыворотка, Плазма	Нет			Избегать попадания прямых солнечных лучей
Моча	Обычным способом	ASSAYBUF	1:101	Например, 10 мкл + 1000 мкл Избегать попадания прямых солнечных лучей

Образцы с содержанием концентраций выше наивысшего стандарта, должны быть разбавлены дополнительно.

Образцы пациентов, лечение которых проводится с использованием АТГ (анти-тимоцитарный глобулин от кролика) после трансплантации будут давать невероятно высокие результаты. Этого эффекта можно избежать предварительной инкубацией образцов:

Пипетировать 100 мкл сыворотки в Sarstedt или стеклянную пробирку и добавить 220 мкл Буфера для анализов. Закрыть пробирку (использовать прошитую крышку для стеклянных пробирок) и инкубировать в течение 10 минут на водяной бане при 95-100 °C, Перемешать и взять 10 мкл геля для анализа. Результаты

умножить на 3.

11. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

ИФА предназначен как для использования в ручном, так и в автоматическом режиме и использованием Процессора DadeBehring ВЕР2000 ELISA для определения неоптерина в сыворотке и плазме. Поэтому, инструкция состоит из двух разных рабочих процедур. Возможно использование этого анализа с другими автоматизированными системами. В этом случае обратиться к IBL за дополнительными сведениями.

11.1 РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА

1.	Пипетировать по 20 мкл каждого Стандарта, Контроля, сыворотки, плазмы и разведенного образца мочи в соответствующие лунки Пластины микротитратора.
2.	Пипетировать 100 мкл Ферментного Конъюгата в каждую лунку.
3.	Пипетировать 50 мкл Антисыворотки Неоптерина в каждую лунку.
4.	Накрыть пластину черной адгезивной фольгой. Инкубировать 90 минут при комнатной температуре (18-25 °C) на орбитальном шейкере (500 об/мин) в темноте.
5.	Удалить адгезивную фольгу. Выбросить раствор для инкубации. Вымыть пластину 4 x 300 мкл с разбавленным Промывочным буфером. Удалить избыток раствора промокаанием опрокинутой пластины бумажным полотенцем.
6.	Для добавления Субстрата и Стоп раствора использовать, если возможно, 8-канальную Микропипетку. Пипетирование должно проводиться в одинаковые промежутки времени для Субстрата и Стоп раствора. Использовать положительный заместитель и избегать образования воздушных пузырей.
7.	Пипетировать 150 мкл Раствора Субстрата ТМВ в каждую лунку.
8.	Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
9.	Остановить реакцию субстрата добавлением 150 мкл Стоп Раствора ТМВ в каждую лунку. Быстро перемешать содержимое аккуратным потряхиванием пластины.
10.	Измерить оптическую плотность фотометром при 450 нм ± 10 нм (Контрольная длина волны: 600-650 нм) в течение 15 минут.

11.2 АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА

В следующей главе описана процедура для типичного процессора ИФА с использованием ВЕР 2000 от Dade Behring как образца. IBL International также предоставляет протоколы для других коммерчески доступных устройств, например, Triturus to Grifols, DSX от Dynex, DS2 от Dynex, Tecan Genesis RSP, ВЕР3 от Dade Behring, Gemini от Stratec и т.п. Пожалуйста, обратитесь к нам, если Вы хотите автоматизировать свой ИФА. Наши специалисты будут рады помочь Вам.

Процедура для ВЕР2000 (Dade Behring) для сыворотки и плазмы
Чтобы процедура на Процессоре ВЕР2000 от Behring прошла успешно, использовать файл программы и базу данных реагентов только те, которые рекомендованы IBL. Эти файлы могут быть без проблем заказаны IBL International.

1.	Аспирировать 110 мкл Ферментного Конъюгата в один наконечник реагента (300 мкл), и затем аспирировать дополнительно к этому объему по 20 мкл каждого Стандарта, Контроля или Образца в тот же наконечник.
2.	Пипетировать 120 мкл данной смеси (Стандарта, Контроля или Образца с Ферментным Конъюгатом) в соответствующие лунки Пластины микротитратора.
3.	Пипетировать 50 мкл Антисыворотки в каждую лунку.
4.	Инкубировать в течение 90 ± 5 минут при комнатной температуре (18-25 °C) на орбитальном шейкере (частота 10 Гц; с амплитудой 4 мм) в темноте.
5.	Аспирировать супернатант. Вымыть пластину 6 x с 300 мкл разведенного Промывочного буфера.
6.	Пипетировать 150 мкл Раствора Субстрата ТМВ в каждую лунку.
7.	Инкубировать 10 минут ± 1 минута при комнатной температуре (18-25 °C).
8.	Пипетировать 150 мкл Стоп Раствора ТМВ в каждую лунку.
9.	Измерить оптическую плотность фотометром при 450 нм (Контрольная длина волны: 600-650 нм) в течение 15 минут.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты теста являются действительными только при условии, что тест был проведен в соответствии с инструкциями. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил лабораторной практики или других применимых стандартов/правил. Все контроли

набора должны находиться в допустимых диапазонах, указанных на этикетках флаконов. Если критерии не соблюдены, исследование считается недействительным и должно быть повторено. Каждая лаборатория должна использовать известные образцы в качестве контролей. Рекомендуется принять участие в соответствующих исследованиях по оценке качества.

В случае отклонения следующие технические проблемы должны быть проверены: Срок годности (приготовленных) реагентов, условия хранения, пипетки, приборы, условия инкубации и методы мытья.

13. КАЛЬКУЛЯЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные OD стандартов (ось y, линейные) наносятся на график напротив их концентраций (ось x, логарифмические) либо на полулогарифмической диаграммной бумаге, либо с использованием автоматического метода. Хорошее соответствие достигается с кубическим сплайном, 4-параметровой логистикой или Logit-Log. Для подсчета стандартной кривой, нанести каждый сигнал стандартов (одно резко отличающееся значение может быть пропущено и более правдоподобные значения сигнала могут быть использованы). Концентрации образцов могут быть считаны со стандартной кривой.

В связи с разбавлением образцов мочи полученные значения умножить на коэффициент 101.

Образцы, которые содержат концентрации выше наивысшего стандарта, должны быть разбавлены, как указано в разделе ИНСТРУКЦИИ ПО ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКЕ и протестированы вторично.

Преобразование:

Основанная на молекулярном весе Неоптерина (МВ: 253.2 г/моль) и Креатинина (МВ: 113.1 г/моль) калькуляция в различных исследованиях может быть проведена следующим образом:

Сыворотка/Плазма:

Неоптерин	(нмоль/л) x 0.253 = (нг/мл)
	(нг/мл) / 0.253 = (нмоль/л)

Моча:

Обычно Неоптерин в моче взаимосвязан с креатинином (который должен быть анализирован отдельно) и выражается в соотношении неоптерина к креатинину (UNCR) в мкмоль неоптерина/моль креатинина:

Креатинин	(мкг/дл) x 88.4 = (мкмоль/л)
	(мкмоль/л) / 1000 = (ммоль/л)
	(ммоль/л) / 1000 = (моль/л)
Неоптерин	(нмоль/л) x 0.253 = (нг/мл)
	(нг/мл) / 0.253 = (нмоль/л)

Типичная Калибровочная Кривая (Схему См. в оригинале инструкции на английском языке)
(Образец. Не использовать для подсчетов!)

Стандарт	Неоптерин (нмоль/л)	Среднее значение OD	OD/ODmax
A	0.00	2.449	100
B	1.35	2.238	91
C	4.00	1.772	72
D	12.0	1.209	49
E	37.0	0.634	26
F	111	0.325	13

14. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неоптерин (Сыворотка)	Интерпретация
< 10 нмоль/л	В норме
> 10 нмоль/л	Повышенный

Только результаты данного теста могут быть единственным критерием для терапевтического заключения. Они должны рассматриваться вместе с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестами.

15. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Предположительно, здоровые пациенты показывают следующие значения:

Сыворотка		Сыворотка			
нмоль/л	нг/мл	Возраст	Пол	Неоптерин нмоль/л	
				Среднее значение	Верхний предел
< 10	< 2.5	0-18	♂, ♀	6.78	13.5
				5.34	8.7
				9.67	19.0

Моча		
Возраст	Пол	мкмоль Неоптерина/моль Креатинина

		Среднее значение	Верхний предел
1-4	♂, ♀	267	432
4-7	♂, ♀	226	405
7-12	♂, ♀	181	374
12-15	♂, ♀	171	343
15-18	♂, ♀	144	320
18-25	♂	123	195
	♀	128	208
26-35	♂	101	182
	♀	124	209
36-45	♂	109	176
	♀	140	239
46-55	♂	105	197
	♀	147	229
56-65	♂	119	218
	♀	156	249
>65	♂	133	229
	♀	151	251

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений.

16. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Забор образца значительно влияет на результаты теста. См. раздел ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА для дополнительной информации. За информацией о перекрестных реактивах обратитесь к разделу ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ.

Следующие компоненты крови не оказывают значительного влияния (+/- 20 % от ожидаемого значения) на результаты теста до значений концентраций, указанных ниже:	Гемоглобин	5.0 мг/мл
	Билирубин	2.5 мг/мл
	Триглицериды	45.5 мг/мл

Не использовать образцы, содержащие азид натрия, так как эти образцы приводят к получению ложных высоких значений.

Образцы пациентов, лечение которых проводилось с использованием АТГ (анти-тимоцитарный глобулин от кролика) после трансплантации будут давать невероятно высокие результаты. Этого эффекта можно избежать предварительной инкубацией образцов, как описано в разделе ИНСТРУКЦИИ ПО ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКЕ.

17. ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

Аналитическая специфичность (Перекрестная реактивность)	Субстанция	Перекрестная реактивность (%)		Перекрестная реактивность других тестируемых субстанций составила < 0.05 %
	7,8-Дигидро-Неоптерин	< 2.1		
Аналитическая чувствительность (Предел обнаружения)	5,6,7,8-Тетрагидро-Неоптерин	< 0.44		
	D-Monapterin	< 0.17		
	L-Monapterin	< 0.03		
	L-Biopterin	< 0.02		
	7,8-Дигидро-L-Biopterin	< 0.03		
Точность	Сыворотка	3.1-4.3	4.3-11.7	До 1:16
	Моча	932-5112	5.3-11.2	
Линейность	Сыворотка	1.8-51.5	91-114	До 1:8
	Моча	234-3622	87-120	
Воспроизводимость	Сыворотка	99	81-116	% восстановления после выброса
	Моча	94	84-117	
Сравнение метода с HPLC	Сыворотка	IBL-анализ = 1.18 x HPLC + 0.44		r = 0.92; n = 111
	Моча	IBL-анализ = 1.17 x HPLC - 13.52		



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com