

Neopterin ELISA

Test immuno-enzymatique pour le dosage quantitatif à but de *diagnostic in-vitro* de la néoptérine dans le sérum et plasma humains.



RE59355



5x12x8



2-8°C

EU:



U.S.: *For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.*



1. BUT DU TEST

Test immuno-enzymatique pour le dosage quantitatif à but de *diagnostic in-vitro* de la néoptérine dans les échantillons de sérum et plasma humains. Ce test immuno-enzymatique est évalué pour un emploi manuel mais également pour un usage automatisé sur le processeur ELISA BEPIII de DadeBehring. Pour cette raison cette fiche technique liste différentes procédures d'analyse. L'application de ce test sur d'autres automates est possible. Dans ce cas, veuillez contacter IBL pour de plus amples renseignements.

2. SOMMAIRE ET INTRODUCTION

La biosynthèse de la néoptérine est en rapport direct avec l'activation du système immunitaire cellulaire. Des taux croissants de néoptérine sont observés chez les patients atteints d'infections virales, suggérant que les valeurs élevées peuvent venir de la réponse immune des patients dirigée contre les cellules infectées par le virus. Il a été montré qu'une stimulation antigénique des cellules sanguines mononucléaires périphériques humaines mène à une libération de la néoptérine dans le milieu de culture cellulaire et que les macrophages humains produisent de la néoptérine in vitro lorsqu'ils sont stimulés par l'interféron gamma. Le dosage des taux en néoptérine dans les fluides corporels humains s'avère être un outil utile et innovateur pour suivre les maladies associées à l'activation de l'immunité cellulaire.

Des concentrations élevées en néoptérine précèdent dans de nombreuses infections les manifestations cliniques et la séroconversion. Les échantillons normaux ne sont pas testés vis à vis de toutes les infections possibles normalement. C'est pourquoi le dosage de la néoptérine dans les échantillons de donneurs de sang est une aide précieuse pour réduire le risque des infections lors des transfusions sanguines.

Le dosage de néoptérine est donc utile pour:

- Suivre les patients traumatisés en service de réanimation
- Pronostiquer une infection VIH ou une maladie maligne
- Suivre une transplantation d'organe
- Marquer l'activité chez les malades auto-immuns
- Diagnostiquer une infection virale
- Différencier une infection virale d'une bactérienne
- Contrôler l'évolution des infections chroniques et suivre les thérapies immuno-stimulatoires

3. PRINCIPE DU TEST

Le kit Néoptérine ELISA fournit du matériel pour le dosage quantitatif de la néoptérine dans les échantillons de sérum et plasma. Le test est basé sur le principe classique de compétition ELISA. Les antigènes conjugués à de la peroxydase et les antigènes non conjugués se fixent de façon compétitive aux anticorps de lapin anti-Néoptérine, eux-mêmes fixés à un anticorps (polyclonal, chèvre) anti-anticorps de lapin. Les deux anticorps sont fixés dans les puits de la microplaque. La néoptérine conjuguée non liée et la néoptérine non-conjuguée sont éliminées lors d'une étape de lavage. L'intensité de la couleur développée après l'incubation du substrat est inversement proportionnelle à la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon. Les résultats des échantillons peuvent être déterminés directement à partir de la courbe étalon.

4. PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Seulement prévu au diagnostic in-vitro et à l'usage professionnel.
2. Lire les instructions complètement et avec attention avant de commencer le test. Utiliser la version valide de la fiche technique incluse dans le kit. S'assurer que tout a été bien compris.
3. Dans le cas de dommages importants de l'emballage du kit, veuillez contacter IBL ou votre fournisseur sous forme écrite, une semaine au plus tard après avoir reçu le kit. N'utilisez pas les composants abîmés pour un test, mettez-les de côté et en sécurité pour les besoins éventuels liés à la plainte.
4. Suivez le numéro du lot et la date de péremption. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots. Ne pas utiliser de réactifs périmés.
5. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les directives de sécurité. Porter des blouses de laboratoire, gants en latex à usage unique et lunettes de protection si nécessaire.
6. Les réactifs de ce kit contiennent du matériel dangereux pouvant irriter les yeux et la peau. Consulter le MATERIEL FOURNI et les étiquettes pour les détails. Les Fiches de Données de Sécurité pour ce produit sont disponibles sur le site internet IBL ou sur demande particulière à IBL.
7. Les réactifs chimiques préparés ou utilisés doivent être traités comme matériel dangereux en accord avec les directives et règlements nationaux de sécurité pour tout matériel à risque.
8. Eviter tout contact avec la solution d'arrêt. Elle peut provoquer des irritations et brûlures cutanées.

9. Tous les réactifs de ce kit contenant des sérums ou plasma humains ont été testés et confirmés négatifs à anti-HIV I/II, HbsAg et anti-HCV. Tous les réactifs doivent être considérés comme potentiellement contaminants et utilisés en tant que tel.

5. STOCKAGE ET STABILITE

Le kit est envoyé à température ambiante et doit être stocké à 2-8°C. À conserver à l'abri de la chaleur ou de la lumière directe. Le stockage et la stabilité des échantillons et réactifs préparés sont indiqués dans les chapitres correspondants.

Les barrettes de la microplaque sont stables jusqu'à la date de péremption du kit en étant stockées à 2-8°C dans le sachet déjà ouvert, mais hermétiquement refermé.

6. COLLECTE ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Sérum, Plasma (EDTA)

Observer les précautions habituelles de prises de sang. Il est important de préserver l'intégrité chimique d'un échantillon sanguin, de sa collecte jusqu'à son analyse. Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons d'apparence turbide doivent être centrifugés avant analyse pour éliminer toute particule gênante.

Stockage:	2-8°C	≤ -20°C (Aliquots)	À conserver à l'abri de la chaleur ou de la lumière directe. Eviter tout cycles de congélation / décongélation répétés.
Stabilité:	72 h	6 mois	

7. MATERIEL FOURNI

Quantité	Symbôle	Composant
5 x 12 x 8	MTP	Microplaque Barrettes sécables. Coatée avec un anticorps IgG anti-lapin (chèvre, polyclonal).
1 x 0.75 mL	ENZCONJ CONC	Conjugué enzymatique, Concentré (101x) Stocker à l'abri de la lumière. Contient: Néoptérine, conjuguée à de la peroxydase, tampon phosphate, stabilisateurs.
1 x 6 x 1.5 mL	CAL A-F	Étalon A-F 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Prêt(e) à l'emploi. Contient: Néoptérine, tampon phosphate, stabilisateurs.
1 x 2 x 1.5 mL	CONTROL 1+2	Contrôle 1+2 Prêt(e) à l'emploi. Contient: Néoptérine, tampon phosphate, stabilisateurs.
2 x 100 mL	ASSAYBUF	Tampon pour essai Prêt(e) à l'emploi. Contient: tampon phosphate, BSA, stabilisateurs.
5 x 10 mL	ASSAYBUF	Tampon pour essai Prêt(e) à l'emploi. Contient: tampon phosphate, BSA, stabilisateurs.
1 x 100 mL	WASHBUF CONC	Tampon de lavage, Concentré (20x) Contient: Tween, stabilisateurs.
1 x 70 mL	TMB SUBS	Solution Substrat TMB, Prêt(e) à l'emploi. Contient: TMB, Tampon, stabilisateurs.
1 x 90 mL	TMB STOP	Solution d'Arrêt TMB Prêt(e) à l'emploi. 1 M H ₂ SO ₄ .
5 x 1	FOIL	Feuille adhésive (noir) Pour usage manuel uniquement.

8. MATERIEL NECESSITE MAIS NON FOURNI

- Pipettes (Multipette Eppendorf ou matériel similaire, CV < 3%) Volumes: 10; 50; 100; 1000 µL
- Vortex
- Micropipette à 8-canaux avec réservoirs pour réactifs.
- Bouteille pour lavage, système automatique ou semi-automatique pour le lavage de microplaque
- Lecteur de microplaque capable de lire l'absorbance à 450 nm (longueur d'onde de référence 600-650 nm)
- Eau bidistillée ou désionisée
- Papier absorbant, embouts de pipette et chronomètre

9. NOTES POUR LA PROCEDURE

1. Toute manipulation impropre des échantillons ou modification de la procédure du test peut influencer les résultats. Les volumes indiqués pour pipeter, les temps d'incubation, températures et étapes de pré-traitement doivent être strictement suivis selon les instructions. N'utiliser que des pipettes et appareils calibrés.
2. Une fois que le test a commencé, toutes les étapes doivent être suivies sans interruption. S'assurer que les réactifs, matériels et appareils nécessaires soient prêts au moment approprié. Amener tous les réactifs et échantillons à température ambiante (18-25 °C) et mélanger doucement en tournant chaque flacon de réactif liquide et d'échantillon avant emploi. Mélanger les réactifs sans former de mousse.
3. Eviter toute contamination des réactifs, pipettes et puits/tubes. Utiliser des nouveaux embouts de pipette en plastique pour chaque réactif, étalon ou échantillon. Ne pas interchanger les bouchons. Toujours refermer les flacons non utilisés. Ne pas réutiliser les puits/tubes ou réactifs.
4. Utiliser un schéma de pipetage pour vérifier la répartition appropriée de la plaque.
5. Le temps d'incubation affecte les résultats. Tous les puits doivent être manipulés dans le même ordre et au même intervalle de temps. Il est recommandé d'utiliser une micropipette à 8-canaux pour pipeter une même solution dans tous les puits.
6. Le lavage de la microplaque est important. Des puits mal lavés provoqueront des résultats erronés. Il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux ou un système de lavage de microplaque automatique. Ne pas laisser sécher les puits entre les incubations. Ne pas gratter les puits coatés pendant le rinçage ou l'aspiration. Rincer et ajouter les réactifs avec précaution. Lors du rinçage, vérifier que tous les puits soient régulièrement remplis avec le tampon de lavage, et qu'aucun reste ne soit ensuite visible.
7. L'humidité affecte les puits/tubes coatés. Ne pas ouvrir le sachet avant que celui-ci n'ait atteint la température ambiante. Les puits/tubes inutilisés doivent être rangés immédiatement dans le sachet refermé avec le dessiccateur.

10. PREPARATIONS PREALABLES AU TEST

10.1. Préparation des composants lyophilisés et concentrés

Les valeurs pour le conjugué et le substrat sont données pour une plaque complète.

Diluer/ dissoudre	Composant		Diluant	Relation	Remarques	Stockage	Stabilité
100 mL	Tampon de lavage	jusqu'à 2000 mL	Eau bidist.	1:20		2-8°C	1 mois
100 µL	Conjugué enzymatique	avec 10 mL	Tampon pour essai	1:101	Stocker à l'abri de la lumière.	2-8°C	1 sem

10.2. Dilution des échantillons

Les échantillons suspectés de contenir une concentration supérieure à celle de l'étalon le plus concentré doivent être dilués avec l'étalon A. Eviter toute exposition solaire. La lumière provoque une dégénération rapide de la néoptérine.

11. PROCEDURE DU TEST


	Les étalons B-E sont seulement nécessaires pour réaliser un test valide. Cependant les étalons A et F peuvent être utilisés pour des essais confirmatoires.
---	--

Schéma de pipetage recommandé:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL B	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
B	CAL C	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
C	CAL C	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
D	CAL D	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
E	CAL D	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
F	CAL E	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
G	CONTROL 1	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
H	CONTROL 2	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat

11.1. Procédure pour le BEP III

Un programme particulier et une base de données sont nécessaires pour valider les tests avec le processeur ELISA DadeBehring. Vous pouvez le commander auprès d'IBL.

1.	Pipeter 100µL de tampon pour essai dans tous les puits.
2.	Pipeter 10 µL de chaque étalon, échantillon et contrôle dans les puits respectifs de la microplaque. Suivre le schéma de distribution indiqué auparavant.
3.	Pipeter 50 µL of de conjugué enzymatique (1:101) dans tous les puits.
4.	Incuber 60 min à TA (18-25°C).
5.	Aspirer le surnageant. Laver la plaque 6 x avec 300 µL tampon de lavage dilué .
6.	Pipeter 100 µL de solution substrat TMB dans chaque puits.
7.	Réchauffer la MTP dans l'incubateur à 56 °C (puis incuber la plaque pendant 3 min à 37 °C).
8.	Incuber 30 ± 5 min à TA (18-25°C).
9.	Pipeter 100 µL de solution d'arrêt TMB dans chaque puits.
10.	Mesurer la densité optique avec un photomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence: 600-650 nm).



Si le test est réalisé dans un système automatisé, les réactifs utilisés ne doivent pas être jetés; par ex. la solution substrat TMB doit être re-transférée dans le container respectif et stockée à 2-8 °C jusqu'à son prochain emploi.

11.2. Procédure manuelle générale

1.	Pipeter 100 µL de tampon pour essai dans tous les puits.
2.	Pipeter 10 µL de chaque étalon, échantillon et Contrôle dans les puits respectifs de la microplaque. Suivre le schéma de distribution indiqué auparavant.
3.	Pipeter 50 µL de conjugué enzymatique (1:101) dans tous les puits.
4.	Couvrir la plaque avec une feuille adhésive <u>noire</u> . Incuber 60 min à TA (18-25°C).
5.	Aspirer le surnageant. Laver la plaque 4 x avec 300 µL du tampon de lavage dilué .
6.	Pipeter 100 µL de solution substrat TMB dans chaque puits.
7.	Incuber 30 ± 5 min à TA (18-25°C).
8.	Pipeter 100 µL de solution d'Arrêt TMB dans chaque puits.
9.	Mesurer la densité optique avec un photomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence: 600-650 nm).

12. CONTROLE QUALITE

Les résultats du test ne sont valides que si l'essai a été réalisé en suivant les instructions. De plus, l'utilisateur doit strictement suivre les règles de bonne pratique de laboratoire (GLP, Good Laboratory Practice) ou autres lois/standards applicables. Tous les étalons et contrôles du kit doivent être trouvés dans les gammes acceptables indiquées dans le certificat de Contrôle Qualité (QC). Si ces critères ne sont pas remplis, le test est non valide et il doit être répété. Chaque laboratoire devrait utiliser des échantillons connus comme contrôle supplémentaire.

En cas de déviation des résultats, vérifier les origines éventuelles techniques: dates de péremption des réactifs (préparés), conditions de stockage, pipettes, appareils, conditions d'incubation et méthodes de lavage.

13. CALCUL DES RESULTATS

Les densités optiques (OD) des étalons (axe y, linéaire) sont reportées en fonction de leurs concentrations (axe x, logarithmique) soit sur papier graphique semi-logarithmique soit en utilisant une méthode automatisée. Utiliser le programme de réduction de données disponible auprès d'IBL pour le calcul des résultats sur le BEP III.

Pour le calcul de la courbe étalon, appliquer chaque signal des étalons (une valeur apparemment fausse d'un double dosage peut ne pas être prise en compte et peut être remplacée par une valeur plus plausible).

La concentration des échantillons peut être lue à partir de la courbe étalon.

Les échantillons montrant une concentration supérieure à celle de l'étalon le plus concentré doivent être dilués de la façon décrite dans les PREPARATIONS PREALABLES AU TEST et testés de nouveau.

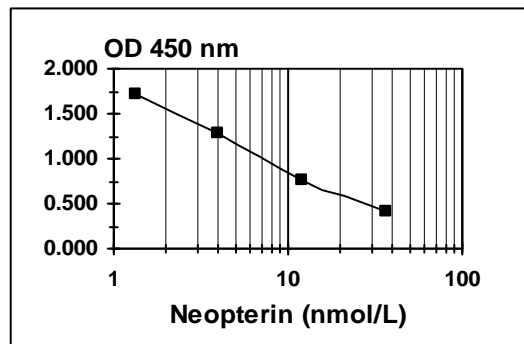
Conversion:

Néoptérine (nmol/L) x 0.253 = ng/mL

Courbe Etalon Typique

(Exemple. Ne pas utiliser pour vos calculs!)

Étalon	Néoptérine (nmol/L)	OD (BEP III)
B	1.35	2.009
C	4.00	1.632 (Moyenne OD)
D	12.0	1.075 (Moyenne OD)
E	37.0	0.652



14. INTERPRETATION DES RESULTATS

Néoptérine (Sérum)	Interprétation
< 10 nmol/L	normal
> 10 nmol/L	élevé

Les résultats ne peuvent pas être l'unique raison de conséquences thérapeutiques. Ils doivent être corrélés à d'autres observations cliniques et tests diagnostics.

15. VALEURS ATTENDUES

Des sujets apparemment sains ont montré les valeurs suivantes:

Néoptérine	Sérum	
	nmol/L	ng/mL
	< 10	< 2.5

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales.

16. LIMITES DE LA PROCEDURE

La collecte des échantillons a une influence significative sur les résultats du test. Voir le paragraphe COLLECTE ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS pour plus de détails.

Pour les réactivités croisées, voir PERFORMANCE.

Les composants sanguins suivants n'ont pas d'effets significatifs (+/- 20 % par rapport aux valeurs attendues) sur les résultats du test jusqu'aux concentrations indiquées ci-dessous:

Hémoglobine	4.00 mg/mL
Bilirubine	0.50 mg/mL
Triglycérides	30.00 mg/mL

Ne pas utiliser d'échantillons contenant de l'azide de sodium car ces échantillons peuvent donner de faux résultats élevés.

17. PERFORMANCE

Spécificité Analytique (Réactivité croisée)	Substance	Réactivité Croisée (%)	Réactivité croisée d'autres substances testées < 0.05 %		
	Dihydro-Néoptérine	3.5			
	Monaptérine	0.29			
	Bioptérine	0.18			
	Dihydro-Bioptérine	0.12			
	Tétrahydro-Néoptérine	0.07			
Sensibilité Analytique (Limite de Détection)	0.32 nmol/L	Signal moyen (Etalon zéro) – 2SD			
Sensibilité fonctionnelle	0.32 nmol/L	Signal moyen (Etalon zéro) – 2SD			
Précision	Gamme (nmol/L)	CV (%)			
	Intra-Essai	1.66 – 44.82			5.5 – 21.7
	Inter-Essai	1.57 – 39.32			5.4 – 14.3
Linéarité	Gamme (nmol/L)	Dilution en série jusqu'au	Gamme (%)		
	1.52 – 43.09	1:8	95.3 – 115.0		
Récupération	Moyenne (%)	Gamme (%)	% Récupération après enrichissement		
	99.4	92.1 – 106.7			
Comparaison de méthode versus HPLC	Essai IBL = 0.81 x HPLC + 1.27		r = 0.99; n = 26		

18. LITTÉRATURE DE REFERENCE DU PRODUIT

- Westermann J, Thiemann F, Gerstner L, Tatzber F, Kozák I, Bertsch T, Krüger C. Evaluation of a New Simple and Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Neopterin Determination. Clin Chem Lab Med, 38 (4): 345-353 (2000)
- Smith D, Zouridakis, E, Mariani M, Fredericks S, Cole D, Kaski J. Neopterin levels in patients with coronary artery disease are independent of Chlamydia pneumoniae seropositivity. Am Heart J, 146 (1): 69-74 (2003)

Symbols / Symbole / Symbôles / Símbolos / Símbolos / Σύμβολα

	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.º Cat.: / N.-Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lote N.º: / Lotto n.: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Usar até: / Da utilizzare entro: / Χρησιμοποιείται από:
	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / N.º de Testes: / Quantità dei tests: / Αριθμός εξετάσεων:
	Concentrate / Konzentrat / Concentré / Concentrar / Concentrado / Concentrato / Συμπύκνωμα
	Lyophilized / Lyophilisat / Lyophilisé / Liofilizado / Liofilizado / Liofilizzato / Λυοφιλιασμένο
	In Vitro Diagnostic Medical Device. / In-vitro-Diagnostikum. / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro. / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro. / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro. / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro. / Ιατρική συσκευή για In-Vitro Διάγνωση.
	Evaluation kit. / Nur für Leistungsbewertungszwecke. / Kit pour évaluation. / Juego de Reactivos para Evaluació. / Kit de avaliação. / Kit di valutazione. / Κιτ Αξιολόγησης.
	Read instructions before use. / Arbeitsanleitung lesen. / Lire la fiche technique avant emploi. / Lea las instrucciones antes de usar. / Ler as instruções antes de usar. / Leggere le istruzioni prima dell'uso. / Διαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση.
	Keep away from heat or direct sun light. / Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. / Garder à l'abri de la chaleur et de toute exposition lumineuse. / Manténgase alejado del calor o la luz solar directa. / Manter longe do calor ou luz solar directa. / Non esporre ai raggi solari. / Να φυλάσσεται μακριά από θερμότητα και άμεση επαφή με το φως του ηλίου.
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazenar a: / Conservare a: / Αποθήκευση στους:
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabricante: / Παραγωγός:
	Caution! / Vorsicht! / Attention! / ¡Precaución! / Cuidado! / Attenzione! / Προσοχή!
<p>Symbols of the kit components see MATERIALS SUPPLIED. Die Symbole der Komponenten sind im Kapitel KOMPONENTEN DES KITS beschrieben. Voir MATERIEL FOURNI pour les symbôles des composants du kit. Símbolos de los componentes del juego de reactivos, vea MATERIALES SUMINISTRADOS. Para símbolos dos componentes do kit ver MATERIAIS FORNECIDOS. Per i simboli dei componenti del kit si veda COMPONENTI DEL KIT. Για τα σύμβολα των συστατικών του κιτ συμβουλευτείτε το ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.</p>	

IBL AFFILIATES WORLDWIDE

	IBL International GmbH Flughafenstr. 52A, D-22335 Hamburg, Germany	Tel.: + 49 (0) 40 532891 -0 Fax: -11 E-MAIL: IBL@IBL-International.com WEB: http://www.IBL-International.com
	IBL Deventer B.V. Zutphenseweg 55, NL-7418 AH Deventer, The Netherlands	Tel.: + 31 570-66 15 15 Fax: -60 73 86 E-MAIL: IBL@IBL-International.com WEB: http://www.IBL-International.com
	IBL - Transatlantic Corp. 288 Wildcat Road, Toronto, Ontario M3J 2N5	Toll free: +1 (866) 645 -6755 Tel.: +1 (416) 645 -1703 Fax: -1704 E-MAIL: IBL@IBL-Transatlantic.com WEB: http://www.IBL-Transatlantic.com

LIABILITY: Complaints will only be accepted in written and if all details of the test performance and results are included (complaint form available from IBL or supplier). Any modification of the test procedure or exchange or mixing of components of different lots could negatively affect the results. These cases invalidate any claim for replacement. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.