

# НАБІР РЕАГЕНТІВ L-KINURENIN ELISA

## L-Kynurenin ELISA

Кат. № : EIA-5772  
Кількість : 96

Дата випуску інструкції: 03-2019  
Версія 1.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

### 1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей аналіз призначений для кількісного визначення L-кінуреніну у людській ЕДТА плазмі, сироватці та сечі. Тільки для діагностики *in vitro*.

### 2 ВСТУП

L-кінуренін є основним продуктом деградації L-триптофану, який каталізується індоламіном-2,3-діоксигенази (IDO).

L-кінуренін відіграє ключову роль як супресор імунітету у випадку інфекційних захворювань (ВІЛ<sup>1</sup>, туберкульоз<sup>2</sup>, бореліоз<sup>3</sup> та ін.) і злоякісних захворювань (рак товстої кишки<sup>4</sup>, рак легенів<sup>5,6</sup>, лейкемія<sup>7</sup>, лімфома Ходжкіна<sup>8</sup>, рак шийки матки<sup>9</sup>), де високий рівень кінуреніну вказує на поганий прогноз. Таким чином, L-кінуренін служить прогностичним маркером, який свідчить про прогресування і тяжкість захворювання.

### 3 МАТЕРІАЛ, ЯКИЙ ПОСТАЧАЄТЬСЯ

Ярлик	Склад набору	К-сть
PLATE	Мікротитровий планшет, прикритий	12 x 8 лунок
STD	Стандарти, готові до використання (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 мкмоль/л)	6 x 200 мкл
CTRL 1	Контроль, готовий до використання (див. специфікацію діапазону)	1 x 200 мкл
CTRL 2	Контроль, готовий до використання (див. специфікацію діапазону)	1 x 200 мкл
WASHBUF A	Концентрат миючого буферу, 10x	2 x 100 мкл
AB	Антитіло до L-кінуреніну, ліофілізоване	1 x 1 флакон
CONJ	Концентрат кон'югату, позначений пероксидазою	1 x 65 мкл
CONJBUF	Буфер для стабілізування кон'югату, готовий до використання	1 x 13 мл
REABUF	Реакційний буфер, готовий до використання	1 x 110 мл
DER	Реагент для дериватизації, ліофілізований	4 x 25 мг
DMSO	Диметилсульфоксид	1 x 7 мл
SUB	Субстрат (тетраметилбензидин), готовий до використання	1 x 15 мл
STOP	Стоп розчин, готовий до використання	1 x 15 мл

### 4 НЕОБХІДНИЙ МАТЕРІАЛ, ЯКИЙ НЕ ПОСТАЧАЄТЬСЯ

- Ультрочища вода\*
- Калібрувальні прецизійні піпетки та 10 мкл -1000 мкл наконечники
- Фольга, що накрити мікротитровий планшет
- Горизонтальний мікротитровий планшетний шейкер
- Багатоканална піпетка або повторювальна піпетка
- Вортекс
- Центрифуга, 3000 г
- Стандартні лабораторні пластикові або скляні флакони, чашки, і т. д.
- Мікротитровий планшетний рідер (необхідні фільтри розділ 7)

\*DRG рекомендує використовувати ультрочищу воду (Тип Води 1; ISO 3696), яка не містить нерозчинених колоїдних іонів та органічних молекул (без частинок > 0.2 мкм) з електричною провідністю 0.055 мкСм/см при температурі 25°C (≥18.2 МΩ см).

### 5 ЗБЕРІГАННЯ ТА ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- Щоб провести аналіз більше одного разу, переконайтеся, що реагенти зберігалися в умовах, зазначених на етикетці. **Приготуйте тільки відповідну кількість, необхідну для кожного аналізу.** Набір можна використовувати до 4 разів протягом терміну придатності, зазначеного на етикетці.

- Реагенти, об'єм яких становить менше ніж 100 мкл, потрібно центрифугувати перед використанням, для того, щоб уникнути втрати об'єму.
- **Підготовка промивного буфера:**  
**Концентрат промивного буферу (WASHBUF A)** перед використанням потрібно розвести ультрочищу водою **1:10** (100 мл WASHBUF A + 900 мл ультрочищої води), добре перемішати. Кристали можуть утворитися через високої концентрації солі у концентраті. Перед розведенням, кристали слід повторно розчинити при кімнатній температурі або на водяній бані при 37 °С. **WASHBUF A** стабільний при температурі від **2 °С до 8 °С** до терміну придатності, зазначеного на етикетці.  
**Промивний буфер** (1:10 розведений WASHBUF A) можна зберігати в закритій пляшці при температурі **2 °С - 8 °С протягом 1 місяця**.
- **DMSO** кристалізується при температурі 2°C - 8°C. Перед використанням доведіть до кімнатної температури, щоб розчинилися кристали.
- Розведіть вмісту одного флакону з **реагентом дериватизації (DER)** (25 мг) з **1.5 мл DMSO**. Залишіть протягом 10 хвилин, щоб розчинився і ретельно перемішайте з вихровим змішувачем.  
Реагент для дериватизації повинен бути **підготовлений безпосередньо перед використанням**. Якщо використовуєте більше ніж один флакон, об'єднайте вміст цих флаконів і перемішайте перед використанням. Після використання будь-який залишок реагенту відкиньте.  
**Зверніть увагу:** DMSO уражає всі пластмасові вироби, крім виробів з поліпропілену та лабораторного скла.
- **Ліофілізоване антитіло до L-кінуреніну (AB)** стабільне при **2°C - 8°C** до закінчення терміну придатності вказаного на етикетці. Розведіть **AB з 6 мл промивного буферу. Антитіло до L-кінуреніну** (розведений AB) **можна зберігати при температурі 2°C - 8°C протягом 2 місяців**.
- **Підготовка кон'югату:**  
Перед використанням, концентрат кон'югату потрібно розчинити **1:201 буфером для стабілізування кон'югату (CONJBUF)** (напр. 60 мкл CONJ + 12 мл CONJBUF, готуйте тільки необхідну кількість). CONJ стабільний при температурі 2°C - 8°C до закінчення терміну придатності вказаного на етикетці. **Кон'югат** (1:201 розведений CONJ) **можна зберігати при температурі 2°C - 8°C протягом одного місяця**.
- Всі інші тест-реагенти готові до використання. Тест-реагенти стабільні до закінчення терміну придатності (див. етикетку) за умови зберігання при температурі **2°C - 8°C**.

### 6 ЗБЕРІГАННЯ І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

#### ЕДТА плазма, сироватка, сеча

У зразках, L-кінуренін стабільний протягом 72 годин при температурі 2°C - 8°C та при кімнатній температурі. Для довготривалого зберігання зразки заморозити до -20°C.

Зразки використовуються **нерозведеними**.

Для приготування зразка додають реагент для дериватизації L-кінуреніну (див. Процедуру приготування зразка).

### 7 ЗПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

#### 7.1 Принцип тесту

Цей набір ІФА призначений для кількісного визначення L-кінуреніну. Аналіз заснований на методі конкурентного ферментно зв'язаного імуноаналізу. Підготовка зразка включає додавання дериватизації реагенту для дериватизації кінуреніну. Після цього оброблені зразки і поліклональний L-кінуренін-антисироватка інкубують у лунках мікротитрового планшета, покритого L-кінуренін-похідним (індикатор). Протягом періоду інкубації цільовий L-кінуренін у зразку конкурує з індикатором, іммобілізованим на стінці мікротитрових лунок, для зв'язування поліклональних антитіл.

Під час другого етапу інкубації до кожної мікротитрової лунки додають антитіло, кон'юговане з пероксидазою, для виявлення антитіл до кінуреніну антитіл. Після відмивання незв'язаних компонентів додають тетраметилбензидин (ТМВ) як субстрат пероксидази. Нарешті, ферментативна реакція припиняється кислотним стоп-розчином. Колір змінюється від синього до жовтого, а поглинання вимірюється у фотометрі при 450 нм. Інтенсивність жовтого кольору обернено пропорційна концентрації L-кінуреніну в зразку; це означає, що висока концентрація L-кінуреніну в зразку знижує концентрацію антитіла, пов'язаного з індикатором, і знижує фотометричний сигнал. Генерується крива доза-ефект одиниці абсорбції (оптична щільність, ОЩ при 450 нм) та концентрація, використовуючи значення, отримані зі стандартів. L-кінуренін, присутній у зразках пацієнта, визначається безпосередньо з цієї кривої.

## 7.2 Процедура підготовки зразка

Доведіть **всі реагенти та зразки до кімнатної температури** (15°C-30°C) та добре перемішайте.

Дериватизація стандартів, контролів та зразків проводиться у одним аналізом у флаконах (напр. 1.5 мл флакон).

Ми рекомендуємо одну дериватизацію на стандарт, контроль та зразок, і перемістити її в дублікати визначень у лунки мікротитрового планшету.

1. Додайте **25 мкл стандарту (STD)/контролю (CTRL)/ зразку** у відповідні лунки.
  2. Додайте 1 мл реакційного буферу (REABUF) у кожний флакон (STD, CTRL, зразок).
  3. Додайте 50 мкл свіжоприготовленого реагенту для дериватизації у кожний флакон (STD, CTRL, зразок) та ретельно перемішайте шляхом повторної інверсії або кілька секунд на вихровому змішувачі. Інкубуйте протягом **45 хв при кімнатній температурі** (15 ° C - 30 ° C) на горизонтальному шейкері.
- 2 x 50 мкл дериватизованих стандартів, контролів і зразків використовують в ІФА як дублікати.

## 7.3 Процедура тесту

Позначте позиції стандартів/контролів/зразків у дублікаті на папері протоколу.

Візьміть необхідну кількість мікротитрових смужок (PLATE) з набору. Зберігайте невикористані смужки, покритими при 2 ° C - 8 ° C. Смужки стабільні до терміну придатності, зазначеного на етикетці.

1. **Перед використанням**, помийте лунки **5 разів з 250 мкл промивного буферу**. Після останньої стадії промивання видаляють залишковий промивний буфер, витрушуючи планшет на абсорбуючий папір.
2. Для аналізу в двох екземплярах візьміть 2 x 50 мкл дериватизованих стандартів / контролів / зразків з флаконів і додайте у відповідні лунки мікротитрового планшету.
3. Додайте 50 мкл антитіла до L-кінуреніну у кожен лунку.
4. Щільно накрийте смужки та інкубуйте протягом **2 годин при кімнатній температурі** (15 ° C - 30°C) на **горизонтальному шейкері**.
5. Утилізуйте вміст кожної лунки та промийте **5 разів з 250 мкл промивного буферу**. Після кінцевого етапу промивання, переверніть планшет та витрусіть залишки промивного буферу на абсорбуючий папір.
6. Додайте **100 мкл кон'югату** у кожен лунку.
7. Накрийте смужки та інкубуйте протягом **1 години при кімнатній температурі** (15°C - 30°C) на **горизонтальному шейкері**.
8. Утилізуйте вміст кожної лунки та промити **5 разів з 250 мкл промивного буферу**. Після кінцевого етапу промивання, переверніть планшет та витрусіть залишки промивного буферу на абсорбуючий папір.
9. Додайте 100 мкл субстрату (SUB) у кожен лунку.
10. Інкубуйте протягом **10-15 хв\* при кімнатній температурі** (15°C-30°C) у **темряві**.
11. Додайте **100 мкл стоп розчину (STOP)** у кожен лунку та добре перемішайте.
12. Визначте **абсорбцію негайно** за допомогою зчитувача ELISA при **450 нм** до 620 нм (або 690 нм) як референтну. Якщо відсутня референтна довжина хвилі, зчитайте тільки при 450 нм. Якщо екстинкція найвищого стандарту перевищує діапазон фотометра, поглинання необхідно вимірювати відразу при **405 нм** до 620 нм (690 нм) в якості референтного.

\*Інтенсивність зміни кольору чутлива до температури. Рекомендуємо спостерігати за зміною кольору і зупиняти реакцію.

Для автоматизованих процесорів ELISA, даний протокол може потребувати коригування відповідно до особливостей відповідної автоматизованої платформи. Для отримання більш детальної інформації звертайтеся до постачальника або DRG.

## 8 РЕЗУЛЬТАТИ

Наступні алгоритми можна використовувати альтернативно для обчислення результатів. Ми рекомендуємо використовувати алгоритм 4 параметрів.

### 1. Алгоритм 4 параметрів

Для концентрації рекомендується використовувати лінійну ординату для оптичної щільності та логарифмічну абсцису. При використанні

логарифмічної абсциси нульовий стандарт потрібно вказати зі значенням меншим 1 (наприклад, 0,001).

### 2. Точкове обчислення

Рекомендуємо лінійну ординату для оптичної щільності та лінійної абсциси для концентрації.

### 3. Спліновий алгоритм

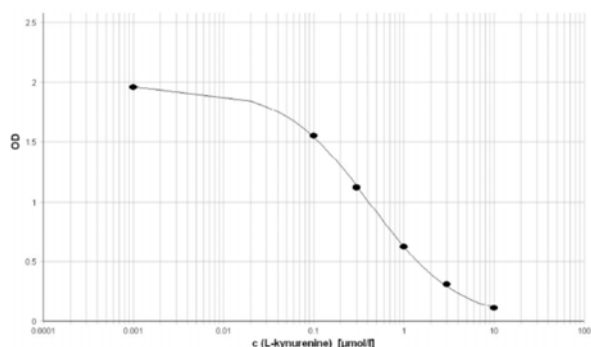
Рекомендуємо лінійну ординату для оптичної щільності та лінійну абсцису для концентрації.

Перед автоматичною оцінкою результатів слід перевірити правдоподібність парних значень. Якщо ця опція недоступна для використовуваної програми, контроль парних значень має виконуватися вручну.

## ЕДТА плазма, сироватка, сеча

Концентрації можна визначити безпосередньо зі стандартної кривої в мкмоль / л. **Не** потрібно жодного **коефіцієнту**. Якщо використовується інший коефіцієнт розведення, отриманий результат помножить на використовуваний коефіцієнт розведення.

Далі наведено приклад калібрувальної кривої. Не використовуйте його для розрахунку результатів.



## 9 ОБМЕЖЕННЯ

Зразки з концентраціями вище діапазону вимірювання (див. Визначення нижче) повинні бути розбавлені реакційним буфером і повторно проаналізовані. Будь ласка, врахуйте це розведення при розрахунку результатів.

Зразки з концентраціями, меншими, ніж діапазон вимірювання (див. Визначення нижче), не можуть бути чітко кількісно визначені.

Верхню межу вимірювального діапазону можна обчислити як:

*найвища концентрація стандартної кривої* × *коефіцієнт розведення зразка, який буде використано*

Нижню межу вимірювального діапазону можна обчислити як:

*LoV* × *коефіцієнт розведення зразка, який буде використано*

## 10 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

DRG рекомендує використовувати зовнішні контролі для внутрішнього контролю якості, якщо це можливо.

Контрольні зразки повинні аналізуватися з кожним запуском. Результати, отримані в результаті аналізу контрольних зразків, повинні бути оцінені щодо прийнятності з використанням відповідних статистичних методів. Результати для зразків пацієнтів можуть бути недійсними, якщо в межах одного і того ж аналізу один або більше значень контрольних зразків якості знаходяться за допустимою межею.

### 10.1 Розведення зразків

DRG рекомендувати використання зовні

Контрольні зразки повинні аналізуватися з кожним прогоном. Результати, отримані в результаті аналізу контрольних зразків, повинні бути оцінені щодо прийнятності з використанням відповідних статистичних методів. Результати для зразків пацієнтів можуть бути недійсними, якщо в межах одного і того ж аналізу один або більше значень контрольних зразків якості знаходяться поза допустимих меж.

### 10.1 Референсний діапазон

На підставі внутрішніх досліджень із зразками сироватки, очевидно здорових осіб, було оцінено середнє значення 1.80 мкмоль / л (n = 70). Стандартне відхилення становило 0.44 мкмоль / л.

З середнього значення  $\pm 2 \times$  СВ оцінювали діапазон норм 0,92 - 2,68 мкмоль/л.

Рекомендуємо кожній лабораторії встановити власний референтний діапазон.

## 11 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 11.1 Точність та відтворюваність

В середині аналізу (к-сть=14)

Зразок	L-кінуренін [мкмоль/л]	ПО [%]
1	0.82	7.6
2	2.86	6.2

Між аналізами (к-сть=8)

Зразок	L-кінуренін [мкмоль/л]	ПО [%]
1	0.80	9.2
2	2.80	6.2

### 11.2 «Введено-знайдено»

Три зразки додали з різними концентраціями та виміряли у цьому дослідженні (n=2). Середній показник відновлення становив 102.5%.

Зразок	Вилучення [мкмоль/л]	Очікуваний L-кінуренін [мкмоль/л]	Вимірний L-кінуренін [мкмоль/л]	Відновлення [%]
A			2.48	
	1.5	3.98	4.49	112.8
	3.0	5.48	5.92	108.0
B			1.98	
	1.5	3.48	3.56	102.3
	3.0	4.98	4.81	96.6
C			2.03	
	1.5	3.53	3.45	97.7
	3.0	5.03	4.99	97.4

### 11.3 Вилучення розведень

Два доданих зразки були розведені та проаналізовані. Середній показник відновлення становив 100.3% (n=2).

Зразок	Розведення [мкмоль/л]	Очікуваний L-кінуренін [мкмоль/л]	Вимірний L-кінуренін [мкмоль/л]	Відновлення [%]
A			2.319	
	1:2	1.160	1.099	94.8
	1:3	0.773	0.748	96.8
B			0.580	
	1:4	0.580	0.498	85.9
			2.581	
B	1:2	1.291	1.297	100.5
	1:3	0.860	0.877	101.9
	1:4	0.645	0.594	92.1
C			2.097	
	1:2	1.049	1.196	114.1
	1:3	0.699	0.822	117.6
	1:4	0.524	0.520	99.2

### 11.4 Аналітична чутливість

Межа бланку, LoB 0.076 мкмоль/л

Межа виявлення, LoB 0.12 мкмоль/л

Межа кількісного визначення, LoQ 0.18 мкмоль/л

Оцінку проводили відповідно до рекомендацій CLSI EP-17-A2. Вказана точність мети для LoQ становила 15% ПО.

### 11.5 Специфічність

Специфічність антитіла тестували вимірюючи перехресну реактивність проти сполук зі структурною схожістю до L-кінуреніну. Специфічність розраховують у відсотках по відношенню до L-кінуренін зв'язуючої активності.

3-НК (3-hydroxy-DL-kynurenine) <0.5%

L-tryptophan <0.08%

5-HTP (5-hydroxytryptophan) <0.01%

Serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) <0.01%

5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) <0.01%

Quinolinic acid <0.01%

Kynurenic acid <0.01%

Picolinic acid <0.01%

## 12 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Всі реагенти в упаковці набору призначені тільки для діагностики *in vitro*.
- Людські матеріали, що використовуються в компонентах набору, тестувалися і виявилися негативними до ВІЛ, гепатиту В і гепатиту С. Проте, з міркувань безпеки, всі компоненти набору слід розглядати як потенційно інфекційні.
- Реагенти набору містять азид натрію або ProClin в якості бактерицидів. Азид натрію і ProClin є токсичними. Субстрати для ферментативних кольорових реакцій є токсичними і канцерогенними. Уникайте контакту зі шкірою або слизовими оболонками.
- Стоп-розчин складається з сірчаної кислоти, яка є сильною кислотою. Незважаючи на те, що вона розбавлена, її потрібно обробляти обережно. Вона може спричинити опіки, тому слід обробляти її в рукавичках, із засобами захисту очей та відповідним захисним одягом. Будь-який розлив слід негайно витерти великою кількістю води. Не вдихати пари і уникати вдихання.

## 13 ТЕХНІЧНІ ПОРАДИ

- Не міняйте різні номери лоту будь-якого компонента набору в рамках одного і того ж аналізу. Крім того, рекомендуємо не збирати лунки різних мікротитрових пластин для аналізу, навіть якщо вони з однієї партії.
- Контрольні Зразки слід аналізувати з кожним запуском.
- Не можна використовувати реагенти після закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці.
- Розчин субстрату повинен залишатися безбарвним до використання.
- Для забезпечення точних результатів необхідна правильне зчеплення пластинчастих ущільнювачів під час інкубації.
- Уникайте спінування під час змішування реагентів.
- Не змішуйте пробки та ковпачки з різних реагентів.
- Аналіз слід завжди виконувати відповідно до вкладеної інструкції.

## 14 ЗАГАЛЬНІ НОТАТКИ ПРО ТЕСТ ТА ПРОЦЕДУРУ ТЕСТУВАННЯ

- Цей аналіз був вироблений і розподілений відповідно до керівних положень IVD 98/79 / EC.
- Необхідно дотримуватися інструкцій для медичних лабораторій.
- Час інкубації, температура інкубації та об'єми піпетування різних компонентів визначаються виробником. Будь-яка зміна в процедурі тестування, яка не узгоджується з виробником, може впливати на результати. Тому DRG не може нести відповідальність за будь-які пошкодження, що виникли внаслідок неправильного використання.

## СИМВОЛИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ

Символ	Означення
	Європейської відповідності
	Прочитайте інструкцію щодо використання*
	Пристрій для діагностики <i>in vitro</i>
	№ в каталозі *
	№ партії*
	Достатньо для <n> тестів*
	Обмеження температури*
	Використати до *
	Виробник*
	Увага*
RUO	Тільки для дослідження
Distributed by	Поширюється
Content	Вміст
Volume/No.	Об'єм/ №



#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### **УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

