

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# Neopterin ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Neopterin in human serum, plasma and urine



**DE59321**



**96 wells**

## 1. INTENDED USE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of neopterin in human serum, plasma and urine.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION

Neopterin is a low molecular weight molecule belonging to the chemical group known as pteridines. It is synthesised by cellular immune reaction of macrophages and dendritic cells upon stimulation with the cytokine interferon-g and as a consequence released. Neopterin has a higher stability in body fluids which makes the sample handling and measurement easier compared to other cytokines. The low molecular weight, let neopterin molecules rapidly pass the intravascular area, where it is released in urine after glomerular filtration. The half life period in human bodies is only affected by renal excretion. So neopterin values reflect the totality of immunological processes for monocytes/macrophages and dendritic cells and can be seen as a general marker of immune activity. This characteristic feature of neopterin to reflect the different interactions of immunocompetent cells is the basis for the extraordinary status of measuring neopterin in immunological diagnosis. As a non-invasive method, urinary neopterin to creatinine ratio determination is also helpful in monitoring disease progression and the effects of therapies, as well.

Neopterin biosynthesis is closely associated with activation of the cellular immune system. Increased concentrations of neopterin were reported in patients with viral infections, suggesting that increased values may originate from the immune response of patients directed against virally infected cells. It was shown that antigenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells leads to neopterin release into cell culture medium and that human macrophages produce neopterin in vitro when stimulated by interferon gamma.

The determination of neopterin levels in human body fluids offers a useful and innovative tool to monitor diseases associated with the activation of cell-mediated immunity.

Increasing neopterin levels in various infections precede the clinical manifestation and seroconversion. Normally samples are not tested for all possible infections. Therefore, the measurement of neopterin in blood donor samples is a useful tool in order to reduce the risk of infections via blood transfusion.

Other diagnostic applications for the determination of neopterin are:

- follow-up of traumatized ICU patients
- use as prognostic indication in HIV infections and malignant diseases
- early indication of complications in allograft recipients
- indication of disease activity in autoimmune diseases
- diagnosis of viral infections
- differential diagnosis of acute viral and bacterial infections
- diagnosis of tumour diseases
- follow-up control of chronic infections and monitoring of immunostimulatory therapy

## 3. TEST PRINCIPLE

Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the basic principle of a competitive ELISA. An unknown amount of antigen in the sample and a fixed amount of enzyme labelled antigen compete for the antibody-binding sites (rabbit-anti-neopterin). Both antigen-antibody complexes bind to the wells of the microtiter strips coated with a goat-anti-rabbit antibody. Unbound antigen is removed by washing. The intensity of the color developed after the substrate incubation is inversely proportional to the amount of antigen in the sample. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

**4. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. In case of severe damage of the kit package please contact Demeditec or your supplier in written form, latest one week after receiving the kit. Do not use damaged components in test runs, but keep safe for complaint related issues.
4. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
5. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
6. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Material Safety Data Sheets for this product are available on the Demditec-Homepage or upon request directly from Demeditec.
7. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
8. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
9. Avoid contact with Stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. All reagents of this kit containing human serum or plasma have been tested and were found negative for anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. However, a presence of these or other infectious agents cannot be excluded absolutely. For this reason reagents should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

**5. STORAGE AND STABILITY**

The kit is shipped at ambient temperature and should be stored at 2-8 °C. Keep away from heat or direct sunlight. The storage and stability of specimens and prepared reagents is stated in the corresponding chapters.

The microtiter strips are stable up to the indicated expiry after the kit is opened. Make sure that the opened bag is tightly closed when stored at 2-8 °C.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE****Serum, Plasma (EDTA)**

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly hemolytic, icteric or grossly lipemic specimens. Do not use specimens containing NaN<sub>3</sub>. Samples appearing turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage:	2-8 °C	≤ -20 °C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sun light. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	72 h	6 months	

**Urine**

It is possible to use spontaneous as well as 24 h urine. The total volume of urine excreted during a 24 h period should be collected and mixed in a single bottle. Preservation is not necessary. Determine total volume for calculation of results. Mix and centrifuge samples before use in the assay..

Storage:	2-8 °C	≤ -20 °C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sun light. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	72 h	6 months	

**7. MATERIALS SUPPLIED**

Quantity	Symbol	Component
12x8	<b>SORB MT</b>	Microtiter Plate; Break apart strips. Coated with anti-rabbit IgG (goat, polyclonal).
1 x 8 ml	<b>ANTISERUM</b>	Neopterin Antiserum; Ready to use. Contains: Antiserum (rabbit), phosphate buffer, stabilizers.
1 x 13 ml	<b>ENZ CONJ</b>	Enzyme Conjugate; Ready to use. Contains: Neopterin, conjugated to peroxidase, phosphate buffer, stabilizers. Store protected from light.
6x1.5 ml	<b>CAL A - F</b>	Standard A-F: 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Ready to use. Contains: Neopterin, phosphate buffer, stabilizers..
2x1.5 ml	<b>CONTROL 1 &amp; 2</b>	Control 1+2; Ready to use. Concentrations / acceptable ranges see QC certificate.
1 x 21 ml	<b>BUF</b>	Assay Buffer; Ready to use. Contains: phosphate buffer, BSA, stabilizers.
1 x 50 ml	<b>WASH SOLN 20x</b>	Wash Buffer Concentrate Concentrate (20x) Contains: Tween, stabilizers.
1 x 19 ml	<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate Solution; Contains: TMB, Buffer, stabilizers.
1 x 19 ml	<b>STOP SOLN</b>	TMB Stop Solution; Ready to use. 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x	-	Adhesive Foil

**8. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

- Micropipettes (Multipette Eppendorf or similar devices, < 3 % CV). Volume: 10; 50; 100; 1000 µL
- Vortex mixer
- Orbital shaker (500 rpm)
- 8-Channel Micropipettor with reagent reservoirs
- Additional assay buffer for urine dilution (can be ordered separately from Demeditec under (cat.-no. DE59321BUF)
- Wash bottle, automated or semi-automated microtiter plate washing system
- Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength 600-650 nm)
- Bidistilled or deionised water
- Paper towels, pipette tips and timer

**9. PROCEDURE NOTES**

Any improper handling of samples or modification of the test procedure may influence the results. The indicated pipetting volumes, incubation times, temperatures and pretreatment steps have to be performed strictly according to the instructions. Use calibrated pipettes and devices only.

Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time. Allow all reagents and specimens to reach room temperature (18-25 °C) and gently swirl each vial of liquid reagent and sample before use. Mix reagents without foaming.

Avoid contamination of reagents, pipettes and wells/tubes. Use new disposable plastic pipette tips for each component and specimen. Do not interchange caps. Always cap not used vials. Do not reuse wells/tubes or reagents.

It is advised to determine samples in duplicate to be able to identify potential pipetting errors.

Use a pipetting scheme to verify an appropriate plate layout.


Incubation time affects results. All wells should be handled in the same order and time sequences. It is recommended to use an 8-channel Micropipettor for pipetting of solutions in all wells.

Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Buffer, and that there are no residues in the wells.

Humidity affects the coated wells/tubes. Do not open the pouch until it reaches room temperature. Unused wells/tubes should be returned immediately to the resealed pouch including the desiccant.

**10. PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS**

## Preparation of concentrated components


	The contents of the kit for 96 determinations can be divided into 3 separate runs. The volumes stated below are for one run with 4 strips (32 determinations).
---	---

Dilute / dissolve	Component	Diluent		Relation	Storage	Stability
15 ml	WASH SOLN 20 x	285 ml	bidist. water	1:20	2-8 °C	1 month

## Dilution of Samples

Sample	to be diluted	with	Relation	Remarks
Serum, Plasma	no			Avoid direct sun light.
Urine	generally	BUF	1:101	e.g. 10 µL + 1000 µL Avoid direct sun light.

Samples containing concentrations higher than the highest standard have to be diluted further.

	<p>Samples from patients treated with ATG (anti-T lymphocyte globulin from rabbit) after transplantation will cause erroneous high results.</p> <p>This effect can be avoided by a pre-incubation of the samples: Pipette 100 µL of serum into a polystyrene or glass tube and add 200 µL of Assay Buffer. Close tubes (use pierced stopper for glass tubes) and incubate for 10 min in a waterbath at 95-100 °C. Vortex and withdraw 20 µL of the resulting suspension for the assay. Results have to be multiplied 3-fold.</p>
---	--

## 11. TEST PROCEDURE

### Manual Procedure

1. Pipette 20  $\mu$ L of each Standard, Control, serum, plasma and diluted urine sample into the respective wells of the Microtiter Plate.
2. Pipette 100  $\mu$ L Enzyme Conjugate into each well.
3. Pipette 50  $\mu$ L of Neopterin Antiserum into each well.
4. Cover plate with black adhesive foil. Incubate 90 min at RT (18-25 °C) on an orbital shaker (500 rpm) in the dark.
5. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate 4 x 300  $\mu$ L with diluted Wash Buffer. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
6. For adding of Substrate and Stop Solution use, if available, an 8-channel Micropipettor. Pipetting should be carried out in the same time intervals for Substrate and Stop Solution. Use positive displacement and avoid formation of air bubbles.
7. Pipette 150  $\mu$ L of TMB Substrate Solution into each well.
8. Incubate 10 min at RT (18-25 °C).
9. Stop the substrate reaction by adding 150  $\mu$ L of TMB Stop Solution into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate.
10. Measure optical density with a photometer at 450 nm (Reference-wavelength: 600-650 nm) within 15 min.

## 12. QUALITY CONTROL

The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or comparable standards/laws. User and/or laboratory must have a validated system to get diagnosis according to GLP. All kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the labels and the QC certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. It is recommended to participate at appropriate quality assessment trials.

In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

### 13. CALCULATION OF RESULTS

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic graph paper or using an automated method. A good fit is provided with cubic spline, 4 Parameter Logistics or Logit-Log.

For the calculation of the standard curve, apply each signal of the standards (one obvious outlier of duplicates might be omitted and the more plausible single value might be used).

The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.

Due to the dilution of urine samples the urine values obtained have to be multiplied by the factor 101.

Samples showing concentrations above the highest standard have to be diluted as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS and reassayed.

#### Conversion:

Based on the molecular weight of Neopterin (MW: 253.2 g/mol) and Creatinine (MW: 113.1 g/mol) a calculation in different units can be made as follows:

#### Serum/Plasma:

Neopterin	$(\text{nmol/L}) \times 0.253 = (\text{ng/ml})$
	$(\text{ng/ml}) / 0.253 = (\text{nmol/L})$

#### Urine:

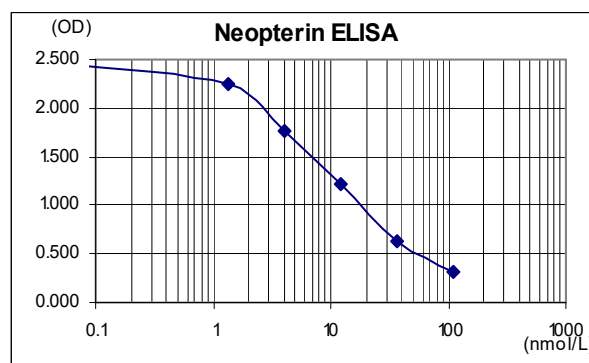
Usually neopterin in urine is correlated to creatinine (which has to be analyzed by separate method) and expressed in neopterin to creatinine - ratio (UNCR) in  $\mu\text{mol}$  neopterin/mol creatinine:

Creatinine	$(\text{mg/dL}) \times 88.4 = (\mu\text{mol/L})$
	$(\mu\text{mol/L}) / 1000 = (\text{mmol/L})$
	$(\text{mmol/L}) / 1000 = (\text{mol/L})$
Neopterin	$(\text{nmol/L}) / 1000 = (\mu\text{mol/L})$

#### Typical Calibration Curve

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	Neopterin (nmol/L)	ODMean	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. INTERPRETATION OF RESULTS**

Neopterin (Serum)	Interpretation
< 10 nmol/L	normal
> 10 nmol/L	elevated

The results themselves should not be the only reason for any therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

**15. EXPECTED VALUES**

Apparently healthy subjects show the following values:

Serum		Serum				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)	
nmol/L	ng/ml	Age	Sex	Neopterin nmol/L			
< 10	< 2.5			Mean	upper limit		
		0-18	♂, ♀	6.78	13.5		
		19-75	♂, ♀	5.34	8.7		
		> 75	♂, ♀	9.67	19.0		
		Urine				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)	
		Age	Sex	µmol Neopterin/mol Creatinine			
				Mean	upper limit		
		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		

It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

**16. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Specimen collection and storage have a significant effect on the test results. See SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE for details.

For cross-reactivities, see PERFORMANCE.

The following blood components do not have a significant effect (+/- 20 % of expected) on the test results up to the below stated concentrations:	Hemoglobin	5.0 mg/ml
	Bilirubin	2.5 mg/ml
	Triglyceride	45.5 mg/ml

Do not use samples containing sodium azide since these samples lead to erroneous high results. Samples from patients who were treated with ATG (anti-T lymphocyte globulin from rabbit) after transplantation will cause erroneous high results. This effect can be avoided by a pre-incubation of the samples as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS.



## 17. PERFORMANCE

Analytical Specificity (Cross-reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)		Cross-reactivity of other substances tested < 0.05 %
	7,8-Dihydro-Neopterin	2.0		
5,6,7,8-Tetrahydro-Neopterin	< 0.44			
D-Monapterin	< 0.17			
L-Monapterin	< 0.03			
L-Biopterin	< 0.01			
7,8-Dihydro-L-Biopterin	< 0.03			
Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Mean signal (Zero-Standard) - 2SD			0.7 nmol/L
Precision	Intra-Assay		Range (nmol/L)	CV (%)
		Serum	3.1 - 43	4.3 – 11.7
	Inter-Assay	Urine	932 - 5112	5.3 – 11.2
		Serum	4.67 – 29.98	8.8 – 13.8
Urine	2616 - 4419	9.3 – 14.4		
Linearity		Range (nmol/L)	Range (%)	Serial dilution up to
	Serum	1.8 – 51.5	91 – 114	1:16
	Urine	234 - 3622	87 – 120	1:8
Recovery	Recovery after spiking		Range (%)	Mean (%)
		Serum	81 – 116	99
		Urine		94
Method Comparison versus HPLC	Serum	Assay = 1.18 x HPLC + 0.44		r = 0.92; n = 111
	Urine	Assay = 1.17 x HPLC – 13.52		r = 0.99; n = 27

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Neopterin in humanem Serum, Plasma und Urin.

## 2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Neopterin ist eine niedermolekulare Pteridinverbindung, die während der zellulären Immunreaktion von Makrophagen und dendritischen Zellen durch das Zytokin Interferon- $\gamma$  induziert und daraufhin sezerniert wird. Neopterin ist in Körperflüssigkeiten biologisch inert, was die Probenbehandlung und die Genauigkeit der Messung im Gegensatz zu den meisten Zytokinen entscheidend vereinfacht. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes gelangt Neopterin schnell in den Intra- und Extravasalraum, wird glomerulär filtriert und im Urin ausgeschieden. Seine Halbwertszeit im menschlichen Organismus wird nur von seiner renalen Ausscheidung bestimmt. Der Neopterinwert spiegelt die Summe der immunologischen Einflüsse auf die Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen wider und gilt somit als genereller Marker der Immunaktivierung. Die Erfassung dieser vielfältigen Wechselwirkungen zwischen immunkompetenten Zellen ist auch die Basis für den besonderen Stellenwert der Neopterinbestimmung in der immunologischen Diagnostik. Als eine nichtinvasive Methode ist die Messung von Neopterin im Urin im Verhältnis zum Kreatiningehalt zudem bei einer Reihe von Krankheitsverläufen bzw. Therapiekontrollen einsetzbar.

Bei Infektionen, besonders viraler und parasitärer Genese, steigt Neopterin schon in der Frühphase noch vor dem Auftreten spezifischer Antikörper an. Infektionen durch extrazelluläre Bakterien führen nur bei chronischem bzw. lebensbedrohlichem Verlauf (Sepsis) zu erhöhten Neopterinspiegeln, während durch intrazellulär lebende Bakterien bedingte Infektionen meist schon im akuten Stadium mit einer Erhöhung von Neopterin einhergehen.

Ein wichtiger Einsatzbereich des Neopterin-Tests ist das Blutspender-Screening zur Herabsetzung des Infektionsrisikos durch Bluttransfusionen. Neopterin ist hier gerade durch seine Unspezifität ein sinnvoller Marker, da Spenderblut nicht routinemäßig auf alle Infektionskrankheiten wie z. B. Zytomegalie, Toxoplasmose oder Hepatitis A untersucht werden kann. Außerdem kann durch die Neopterinbestimmung das sogenannte diagnostische Fenster, welches zwischen dem Zeitpunkt des Erregereintritts und der Antikörperbildung liegt, weiter verkleinert werden. So kommt dem Neopterin auch beim Ausschluß von HIV- oder Hepatitis-Infektionen eine wichtige Bedeutung zu.

Weitere Anwendungsbereiche sind:

- Verlaufskontrolle bei Traumatpatienten auf Intensivstationen
- Prognosestellung bei HIV-Infektionen
- Verlaufskontrolle nach Organtransplantationen
- Aktivitätsmarker bei Autoimmunerkrankungen
- Prognosestellung bei viralen Infektionen
- Unterscheidung viraler von bakteriellen Infektionen
- Prognosestellung bei Tumorerkrankungen
- Verlaufskontrolle bei chronischen Infektionen und Monitoring bei immunstimulierender Therapie

## 3. TESTPRINZIP

Der Neopterin ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur direkten quantitativen Bestimmung von Neopterin in humanem Serum und Urin. In den mit Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Mikrotiterstreifen werden die Proben, Kontrollen und die Standards mit Peroxidase markiertem Neopterin und für Neopterin spezifischem Antiserum vom Kaninchen gemischt. Das unmarkierte Antigen verdrängt einen Teil des markierten Antigens von den Bindungsstellen am anti-Neopterin-Antikörper. Der anti-Neopterin-Antikörper wird von den am Mikrotiterstreifen fixierten anti-Kaninchen-Antikörpern gebunden. Durch einen Waschschrift werden die freien von den gebundenen Antigenen getrennt. Die nach der anschließenden Substratreaktion bei 450 nm gemessene optische Dichte (OD) ist umgekehrt proportional zur Neopterin-Konzentration. Die unbekanntenen Proben werden anhand der Standardkurve ausgewertet.

**4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Nur zum In-vitro-Gebrauch. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
2. Vor der Testdurchführung sollte die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist Demeditec bzw. der jeweilige Lieferant innerhalb einer Woche nach Empfang der Ware schriftlich zu benachrichtigen. Beschädigte Komponenten dürfen nicht zur Testdurchführung verwendet werden, sondern sollten solange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden endgültig geregelt ist.
4. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
5. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
6. Reagenzien dieses Kits, die Gefahrstoffe enthalten, können Reizungen der Augen und der Haut hervorrufen. Siehe Angaben in KOMPONENTEN DES KITS und auf den Etiketten. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf der Demeditec-Homepage zum Download verfügbar oder auf Anfrage direkt von Demeditec erhältlich.
7. Chemikalien und vorbereitete oder gebrauchte Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
8. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
9. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.
10. Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

**5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur angeliefert und sollte bei 2-8 °C gelagert werden. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Hinweise zur Lagerung und Haltbarkeit der Proben und vorbereiteten Reagenzien sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

Die Mikrotiterplatte ist auch nach dem Öffnen der Verpackung bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar, wenn der Beutel sorgfältig wieder verschlossen und bei 2-8 °C gelagert wird.

**6. PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG****Serum, Plasma (EDTA)**

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung:	2-8 °C	≤ -20 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	72 Stunden	6 Monate	

**Urin**

Spontanurin oder 24 h-Sammelurin können verwendet werden. Das Gesamtvolumen über 24 h sollte in einer Flasche gesammelt und gemischt werden. Eine Konservierung ist nicht erforderlich. Gesamtvolumen bestimmen zur späteren Auswertung des Tests. Proben vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.

Lagerung:	2-8 °C	≤ -20 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	72 Stunden	6 Monate	

**7. KOMPONENTEN DES KITS**

Anzahl / Menge	Symbol	Komponente
1 x 12 x 8	<b>SORB</b> <b>MT</b>	Mikrotiterplatte; Streifen einzeln abbrechbar. Beschichtet mit anti-Kaninchen IgG (Ziege, polyklonal).
1 x 8 mL	<b>ANTISERUM</b>	Neopterin Antiserum; Gebrauchsfertig. Enthält: Antiserum (Kaninchen), Phosphatpuffer, Stabilisatoren.
1 x 13 mL	<b>ENZ</b> <b>CONJ</b>	Enzymkonjugat; Gebrauchsfertig. Enthält: Neopterin, konjugiert mit Peroxidase, Phosphatpuffer, Stabilisatoren. Vor Licht geschützt lagern.
6 x 1.5 mL	<b>CAL</b> <b>A - F</b>	Standard A-F; 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Gebrauchsfertig. Enthält: Neopterin, Phosphatpuffer, Stabilisatoren.
2 x 1.5 mL	<b>CONTROL</b> <b>1</b> & <b>2</b>	Kontrolle 1+2; Gebrauchsfertig. Konzentrationen / Akzeptanzbereiche siehe QC-Zertifikat.
1 x 21 mL	<b>BUF</b>	Assaypuffer; Gebrauchsfertig. Enthält: Phosphatpuffer, BSA, Stabilisatoren.
1 x 50 mL	<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>20x</b>	Waschpuffer Konzentrat (20x); Enthält: Tween, Stabilisatoren.
1 x 19 mL	<b>SUB</b> <b>TMB</b>	TMB Substratlösung; Enthält: TMB, Puffer, Stabilisatoren.
1 x 19 mL	<b>STOP</b> <b>SOLN</b>	TMB Stopplösung; Gebrauchsfertig. 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x		Haftklebefolie

**8. ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)**


- Pipetten (Multipette Eppendorf oder vergleichbare Produkte, < 3 % VK). Volumina: 10; 50; 100; 1000 µL
- Vortex-Mischer
- Orbitalschüttler (500 rpm)
- 8-Kanal Mikropipette mit Reagenziengefäßen
- Zusätzlicher Assaypuffer zur Urinverdünnung (kann separat bei Demeditec bestellt werden (Art.-Nr. DE59321BUF))
- Waschflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
- Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 600-650 nm)
- Bidest. oder deionisiertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

## 9. HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettier volumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte sind unbedingt gemäß Arbeitsanleitung einzuhalten. Nur kalibrierte Pipetten und Geräte verwenden. Sobald mit der Testdurchführung begonnen wird, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden. Es ist sicherzustellen, dass alle benötigten Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel zur rechten Zeit zur Verfügung stehen. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (18-25 °C) gebracht und vor Gebrauch vorsichtig ohne Schaumbildung gemischt werden. Kontaminationen der Reagenzien, Pipetten und Wells/Röhrchen sind zu vermeiden. Neue Einmal-Pipettenspitzen für jede zu pipettierende Komponente und jede Probe verwenden. Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen. Nicht benötigte Fläschchen immer verschlossen halten. Wells/Röhrchen oder Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen, um eventuelle Pipettierfehler zu erkennen. Es sollte ein Pipettierschema verwendet werden um die Identifikation der Standards und Proben auf der Platte sicherzustellen. Die Inkubationszeiten beeinflussen die Ergebnisse. Bei jedem Pipettierschritt sollten alle Wells in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt behandelt werden. Die Verwendung einer 8-Kanal-Mikropipette zum Pipettieren in alle Wells wird empfohlen. Die korrekte Durchführung der Waschschritte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsyste ms für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschüt teln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt werden und nach dem Ausschüt teln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt. Feuchtigkeit beeinflusst die beschichteten Wells/Röhrchen. Verpackung nicht öffnen bevor Raumtemperatur erreicht ist. Nicht benötigte Wells/Röhrchen sofort in den wieder verschließbaren Beutel mit Trockenmittel zurückgeben.

## 10. TESTVORBEREITUNGEN

### Vorbereitung konzentrierter Komponenten


	Der Inhalt des Kits für 96 Bestimmungen kann in 3 Läufe aufgeteilt werden. Die unten angegebenen Volumina sind für einen Lauf mit 4 Streifen (32 Bestimmungen).
---	--

Verd. / rekonst.	Komponente	Diluent	Verhältnis	Lagerung	Haltbarkeit
15 mL	WASH   SOLN   20x	285 mL bidest. Wasser	1:20	2-8°C	1 Monat

### Probenverdünnung

Probe	zu verdünnen	mit	Verhältnis	Bemerkungen
Serum, Plasma	nein			Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.
Urin	immer	BUF	1:101	z.B. 10 µL + 1000 µL Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

Proben mit Konzentrationen über dem höchsten Standard müssen weiter verdünnt werden.

	<p>Proben von Transplantationspatienten, die mit ATG (anti-human T-Lymphozytenglobulin vom Kaninchen) behandelt werden, führen zu falsch-hohen Ergebnissen.</p> <p>Dieser Effekt kann durch die folgende Vorbehandlung der Proben vermieden werden: 100 µL Serum in ein Polystyrol- oder Glasröhrchen pipettieren und 200 µL Assaypuffer zugeben. Röhrchen zuschrauben, Glasröhrchen mit durchbohrtem Stopfen verschließen und 10 Minuten im Wasserbad bei 95-100 °C erhitzen. Anschließend vortexen und 20 µL im Assay einsetzen.</p> <p>Der aus der Standardkurve ermittelte Wert ist mit 3 zu multiplizieren.</p>
---	--

## 11. TESTDURCHFÜHRUNG

1. 20 µL von jedem Standard, jeder Kontrolle, Serum-, Plasma- und verdünnten Urinproben in die entsprechenden Wells der mikrotiterplatte pipettieren.
2. Je 100 µL Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren.
3. Je 50 µL of Neopterin Antiserum in jedes Well pipettieren.
4. Platte mit schwarzer Haftklebefolie abdecken. 90 min bei RT (18-25 °C) auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) im Dunkeln inkubieren.
5. Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 4 x 300 µL mit verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
6. Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
7. Je 150 µL TMB Substratlösung in jedes Well pipettieren.
8. 10 min bei RT (18-25 °C) inkubieren.
9. Die Substratreaktion durch Zugabe von je 150 µL TMB Stopplösung in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln.
10. Die Optische Dichte mit einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 600-650 nm) innerhalb von 15 min messen.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn der Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung abgearbeitet wurde. Ferner muss der Anwender die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice) oder vergleichbare Normen/Gesetze beachten. Anwender und/oder Labor müssen zur Diagnosestellung ein gemäß GLP validiertes System verwenden. Alle Kit-Kontrollen müssen innerhalb der Akzeptanzbereiche, die auf den Etiketten und dem QC-Zertifikat angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Ergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden. Jedes Labor sollte darüber hinaus eigene bekannte Proben als weitere Kontrollen mitführen. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Bei Abweichungen sind die folgenden Fehlermöglichkeiten zu überprüfen: Haltbarkeit der (vorbereiteten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten, Geräte und Hilfsmittel, Inkubationsbedingungen und Waschmethoden.

### 13. TESTAUSWERTUNG

Die erhaltenen OD der Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch) auftragen, entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch ein entsprechendes Computerprogramm. Bei Verwendung eines Computerprogramms werden die Cubic-Spline-Methode, 4-Parameter-Analyse (linlog) oder Logit-Log-Berechnung empfohlen. Zur Berechnung der Standardkurve sollten alle Werte der Standards verwendet werden (bei Doppelwerten kann ein offensichtlicher Ausreißerwert eliminiert und stattdessen der plausible Einzelwert verwendet werden). Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Wegen der Verdünnung der Urinproben im Assay müssen die erhaltenen Urinwerte mit dem Faktor 101 multipliziert werden, um die Konzentration zu erhalten. Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen werden, müssen wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben verdünnt und erneut analysiert werden.

#### Umrechnung:

Wird eine Umrechnung in anderen Einheiten gewünscht, lassen sich die Konzentrationen basierend auf den Molekulargewichten für Neopterin (MG: 253.2 g/mol) und Kreatinin (MG: 113.1 g/mol) folgendermaßen umrechnen:

#### Serum/Plasma:

Neopterin	$(\text{nmol/L}) \times 0.253 = (\text{ng/mL})$
	$(\text{ng/mL}) / 0.253 = (\text{nmol/L})$

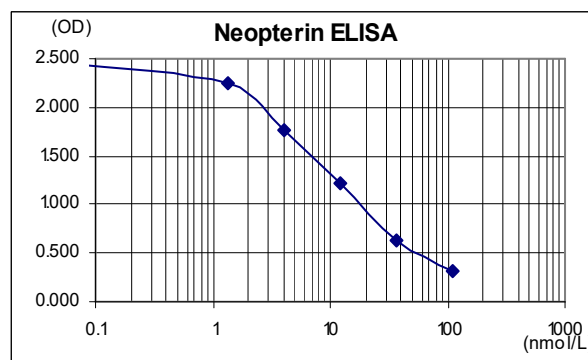
Urin:

Der Neopterinwert in Urin wird üblicherweise auf Kreatinin bezogen, welches gesondert zu bestimmen ist und dann als Neopterin/Kreatinin-Ratio in  $\mu\text{mol}$  Neopterin/mol Kreatinin angegeben wird:

Kreatinin	$(\text{mg/dL}) \times 88.4 = (\mu\text{mol/L})$
	$(\mu\text{mol/L}) / 1000 = (\text{mmol/L})$
	$(\text{mmol/L}) / 1000 = (\text{mol/L})$
Neopterin	$(\text{nmol/L}) / 1000 = (\mu\text{mol/L})$

Typische Standardkurve  
(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	Neopterin (nmol/L)	OD <sub>Mittelwert</sub>	OD/OD <sub>max</sub>
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. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Neopterin (Serum)	Interpretation
< 10 nmol/L	normal
> 10 nmol/L	erhöht

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern nur unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Mittel.

**15. NORMWERTE**

Augenscheinlich gesunde Spender zeigten die folgenden Normwerte:

Serum		Serum			(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al.(1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)	
nmol/L	ng/mL	Alter	Geschlecht	Neopterin nmol/L		
< 10	< 2.5			Mittelwert		obere Grenze
		0-18	♂, ♀	6.78		13.5
		19-75	♂, ♀	5.34	8.7	
		> 75	♂, ♀	9.67	19.0	

Urin				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)
Alter	Geschlecht	µmol Neopterin/mol Kreatinin		
		Mittelwert	obere Grenze	
1-4	♂, ♀	267	432	
4-7	♂, ♀	226	405	
7-12	♂, ♀	181	374	
12-15	♂, ♀	171	343	
15-18	♂, ♀	144	320	
	♂	123	195	
18-25	♀	128	208	
	♂	101	182	
26-35	♀	124	209	
	♂	109	176	
36-45	♀	140	239	
	♂	105	197	
46-55	♀	147	229	
	♂	119	218	
56-65	♀	156	249	
	♂	133	229	
>65	♀	151	251	
	♂			

Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwertbereiche erstellen.



**16. GRENZEN DES VERFAHRENS**

Die korrekte Durchführung der Probengewinnung und Aufbewahrung ist entscheidend für die Testergebnisse. Näheres siehe PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.

Angaben zu Kreuzreaktivitäten sind im Kapitel TESTCHARAKTERISTIKA zu finden.

Die folgenden Blutbestandteile haben bis zu den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse (+/- 20 %):	Hämoglobin	5.0 mg/mL
	Bilirubin	2.5 mg/mL
	Triglyceride	45.5 mg/mL

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden, da diese zu falsch hohen Ergebnissen führen können.

Proben von Patienten, die mit ATG (anti-T Lymphozytenglobulin vom Kaninchen) nach einer Transplantation behandelt wurden, zeigen falsch hohe Ergebnisse. Dieser Effekt kann durch eine Vorinkubation der Proben, wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben, vermieden werden.

**17. TESTCHARAKTERISTIKA**





<b>Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)</b>	Substanz	Kreuzreaktivität (%)	Kreuzreaktivität aller anderen getesteten Substanzen < 0.05 %	
	7,8-Dihydro-Neopterin	2.0		
	5,6,7,8-Tetrahydro-Neopterin	< 0.44		
	D-Monapterin	< 0.17		
	L-Monapterin	< 0.03		
	L-Biopterin	< 0.01		
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	< 0.03		
<b>Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)</b>	Mittleres Signal (Nullstandard) - 2SD		0.7 nmol/L	
<b>Präzision</b>		Bereich (nmol/L)	VK (%)	
	Intra-Assay	Serum	3.1 - 43	4.3 – 11.7
		Urin	932 - 5112	5.3 – 11.2
	Inter-Assay	Serum	4.67 – 29.98	8.8 – 13.8
		Urin	2616 - 4419	9.3 – 14.4
<b>Linearität</b>		Bereich (nmol/L)	Bereich (%)	Höchste Verdünnungsstufe
	Serum	1.8 – 51.5	91 – 114	1:16
	Urin	234 - 3622	87 – 120	1:8
<b>Wiederfindung</b>	Wiederfindung nach Spiken		Bereich (%)	Mittelwert (%)
		Serum	81 – 116	99
		Urin		94
<b>Methodenvergleich gegen HPLC</b>	Serum	Assay = 1.18 x HPLC + 0.44	r = 0.92; n = 111	
	Urin	Assay = 1.17 x HPLC – 13.52	r = 0.99; n = 27	

**18. PRODUCT LITERATURE REFERENCES**

1. Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Weiss G, Werner ER, Werner-Felmayer G. Neopterin: Biochemistry - Methods - Clinical Application. Walter de Gruyter Berlin, New York, (1992)
2. 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)
3. X Garcia-Moll, D Cole, E Zouridakis, JC Kaski. Increased serum Neopterin: a marker of coronary artery disease activity in woman. *Heart* 83:346-350 (2000)
4. 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)
5. B. Inci Fisenk, Durdal US, Osman I. Ozcebe & Gulsen Hascelik. The value of increased Neopterin levels in reducing transfusion-transmitted virus infections: Detection of a donation from a HbsAg positive chronic carrier by screening of neopterin in Turkish blood donors. *Scandinavian Journal of Infectious disease*, 37:599-604 (2005)
6. Michaela Bayer, Sven Schmitz, Jürgen Westermann, Frank Thiemann, Ralf Edelmann, Claudia Szakacs, Gerhardt Lanzer, Jens Blecken. Evaluation of a New-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Neopterin. *Clin Lab*. 51 (2005)
7. R. Weimer, C. Süsal, S. Yildiz, A. Staak, S. Pelzl, F. Renner, H. Dietrich, V. Daniel, S. Kamali-Ernst, W. Padberg, G. Opelz. Post-Transplant sCD30 and Neopterin as Predictors of Chronic Allograft Nephropathy: Impact of Different Immunosuppressive Regimes. *American Journal of Transplantation* (2006)
8. Cangel P.Y. Chan, Junet W.Y. Choi, Kai-Yuan Cao, Ming Wang, Yang Gao, Duan-Hua Zhou, Biao Di, Hui-Fang Xu, Man-Fai Leung, Andreas Bergmann, Matthias Lehmann, Yong-Mei Nie, George W.H. Cauterley, Dietmar Fuchs, Reinhard Renneberg, Bo-Jian Zheng. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *Journal of Infection* (2006)
9. Douglas T. Johnston, Marios Gagos, Nicolas Raio, Louis Ragolia, David Shenouda, Mark A. Davis-Lorton, Joshua R. De Leon. Alterations in serum neopterin correlate with thrombolysis in myocardial infarction risk scores in acute coronary syndromes. *Coronary artery disease* 2006, 17:511-516
10. SP Giese, EM Crone, EA Flavall, Z Amit. Potential to inhibit growth of atherosclerotic plaque development through modulation of macrophages neopterin/ 7,8-dihydroneopterin synthesis. *British Journal of Pharmacology* (2007)
11. Kausik K. Ray, David A. Morrow, Marc S. Sabatine, Amy Shui, Nader Rifai, Christopher P. Cannon, Eugene Braunwald. *Circulation* 2007; 115; 3071:3078



**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore