



Folati Test System
Codice Prodotto: 7525-300

1.0 INTRODUZIONE

Uso previsto: Test colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Folati in campioni di siero umano.

2.0 SPIEGAZIONE DEL TEST

L'assunzione di Acido Folico è aumentata negli ultimi anni grazie alla conoscenza dei suoi numerosi benefici. Appartengono alle vitamine del gruppo B, l'acido folico, o Vitamina B9 è coinvolto in molte funzioni corporee e la sua carenza può causare malattie non solo negli anziani, ma anche nei bambini. La carenza di folati è associata all'anemia megaloblastica, a disfunzioni del tubo neurale (DNT), e a malattie cardiovascolari.^{1,2,3}

L'acido folico svolge un ruolo importante nello sviluppo cerebrale ed è dunque vitale nelle fasi della crescita. Le disfunzioni più comuni causate dalla carenza di folati sono quelle del tubo neurale. Con un ruolo vitale nella sintesi dell'acido nucleico, l'acido folico è utile come supplemento durante la gravidanza e in altri periodi di rapida divisione cellulare.

L'acido folico svolge anche un ruolo vitale nel metabolismo dell'omocisteina, fattore di rischio cardiovascolare. Anche individui con predisposizione a malattie cardiovascolari e diverse forme di tumore possono beneficiare della sua integrazione.^{1,2,4}

Fonti di folati sono i vegetali a foglia verde, legumi, fagioli e cereali fortificati. La pratica di fortificare le farine alimentari con acido folico aumenta la biodisponibilità per l'assorbimento. I folati sono presenti in circolo in forme differenti, alcune delle quali sono più stabili di altre. L'acido folico e il N-Metiltetraido folato sono i più comuni; il secondo è più stabile e si trova in concentrazioni maggiori nel siero. A causa della stabilità della molecola, il N-Metiltetraido folato è la forma su cui ci si focalizza nei metodi di analisi.^{4,5}

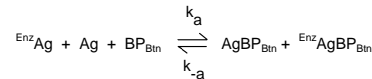
Le proteine leganti i folati sono responsabili del metabolismo dei folati. In circolazione ne esistono due forme: una forma aiuta nel legame alla superficie cellulare e l'altra forma solubile esiste in circolazione. Queste proteine leganti i folati hanno inoltre la capacità di legare differenti derivati dei folati inclusi l'acido folico e il N-Metiltetraido folato. L'interazione tra acido folico e proteina legante i folati è maggiore di quella con il N-Metiltetraido folato. I prodotti presenti oggi sul mercato richiedono un passaggio di estrazione per rilasciare i derivati del folato dalla proteina legante il folato.^{5,6}

In passato i folati sono stati quantificati nei campioni utilizzando metodi quali analisi microbiologiche, procedure bio-specifiche e tecniche HPLC-MS. L'incremento di conoscenze sui folati, la loro importanza e di conseguenza l'assunzione di folati, ha causato una crescita nella domanda per metodi implementati di analisi.⁴

3.0 PRINCIPIO

Competitive Binding Protein Assay (TYPE 8):

I reagenti essenziali richiesti per un dosaggio competitivo legante comprendono proteine leganti specifiche, coniugato enzima-antigene e antigene nativo. Una volta miscelati il coniugato enzima-antigene, la proteina legante biotinilata e il siero contenente l'antigene nativo, avviene una reazione di competizione tra l'antigene nativo e il coniugato enzima-antigene per un numero limitato di siti leganti. L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BP_{Bn} = Biotinylated Binding Protein (Constant Quantity)

Ag = Native Antigen (Variable Quantity)

EnzAg = Enzyme-antigen Conjugate (Constant Quantity)

BP_{Bn} = Antigen-Binding Protein Complex

EnzAgBP_{Bn} = Enzyme-Antigen-Binding Protein Complex

k_a = Rate Constant of Association

k_{-a} = Rate Constant of Disassociation

K = k_a / k_{-a} = Equilibrium Constant

Contemporaneamente avviene una reazione tra la biotina legata alla proteina legante e la streptavidina immobilizzata sulla piastra. Dopo decantazione o aspirazione avviene la separazione della frazione legata della proteina legante.

AgAb_{Bn} + EnzAgBP_{Bn} + Streptavidin_{CW} → immobilized complex

Streptavidin_{CW} = Streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = sandwich complex bound to the solid surface

L'attività enzimatica nella frazione legata della proteina legante è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo. Utilizzando diversi sieri di riferimento di concentrazione nota di antigene, può essere generata una curva di riferimento da cui è possibile determinare la concentrazione dell'antigene nel campione in esame.

4.0 REAGENTI

Materiale fornito:

A. Set di Calibratori Folati – 1ml/fiala - Icone A-F

Sei (6) fialoni di calibratori per folati ad una concentrazione di 0 (A), 1.0 (B), 2.5 (C), 5.0 (D), 10.0 (E), e 25.0 (F) in ng/ml. Contengono conservanti. Conservare a 2-8°C.

Nota: I calibratori basati su siero umano sono stati calibrati utilizzando una preparazione di riferimento con N-Metiltetraido folato altamente purificato.

B. Folati Reagente Enzimatico – 7.0 ml/fiala – Icona E

Un (1) fialone di perossidasi di rafano (HPR) coniugata in una matrice stabilizzata di proteine con colorante rosso. Conservare a 2-8°C.

C. Folati Reagente Biotina – 7.0 ml/fiala - Icona V

Un (1) fialone di reagente con proteina legante i folati biotinilati purificati coniugato in buffer con colorante verde. Contiene conservanti. Conservare a 2-8°C.

D. Piastra coattata con Streptavidina – 96 pozzetti –Icona U

Una micropiastra da 96 pozzetti coattata con streptavidina e conservata in un sacchetto di alluminio con essiccante. Conservare a 2-8°C.

E. Soluzione di lavaggio concentrata – 20ml/fiala - Icona D

Un (1) fialone contenente tensioattivo in soluzione salina. Contiene conservanti. Conservare a 2-8°C.

F. Reagente Substrato – 12ml/fiala - Icona S

Un (1) fialone contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido d'idrogeno (H₂O₂) in tampone. Conservare a 2-8°C.

G. Soluzione Stop – 8ml/fiala - Icona N

Un (1) fialone contenente un acido forte (0.5M H₂SO₄). Conservare a 2-8°C.

H. Agente di Rilascio – 14ml/fiala - Icona I

Un (1) fialone contenente una base forte (dirossido di sodio) e cianuro di potassio. Conservare a 2-8°C.

I. Agente Stabilizzante – 0.7 ml/ fiala - Icona P

Un (1) fialone contenente tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP). Conservare a 2-8°C.

J. Buffer Neutralizzante – 7 ml/ fiala - Icona NZ

Un (1) fialone con buffer che abbassa il pH dell'estrazione campione. Conservare a 2-8°C.

K. Istruzioni per l'uso

Nota 1: Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

Nota 2: Evitare l'esposizione prolungata a fonti luminose e di calore. **I reagenti aperti sono stabili per 60 giorni se conservati a 2-8°C. La stabilità del kit e dei componenti è indicata sull'etichetta.**

Nota 3: I reagenti sono sufficienti per una singola piastra da 96 pozzetti.

4.1 Richiesto ma non fornito:

- Pipetta in grado di erogare volumi di 0.050ml (50µl) e 0.100ml (100µl) con una precisione maggiore di 1.5%.
- Dispensatore per erogazioni ripetitive di 0.100ml (100µl) e 0.350ml (350µl) volumi con una precisione maggiore di 1.5%.
- Dispensatore a volume variabile (200-1000µl) per il coniugato.
- Provette in vetro per la preparazione del calibratore, del controllo e del campione del paziente.
- Lavatore per micropiastre o bottiglia a spruzzetta (optional).
- Lettore per micropiastre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 nm).
- Carta assorbente per asciugare i pozzetti della micropiastra.
- Involucro di plastica o coperchio per micropiastra per i passaggi di incubazione.
- Aspiratore (optional) per le fasi di lavaggio.
- Timer.
- Controlli di qualità interni.

5.0 PRECAUZIONI

Per Uso Diagnostico in Vitro
Non per uso interno o esterno su soggetti umani o animali

Gli standard presenti nel kit sono stati testati e sono risultati non reattivi per la presenza di HBsAg, HIV 1&2 e HCV. Poiché nessun metodo attualmente disponibile può offrire assicurazione completa che questi agenti siano assenti, tutti gli standard devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati con le normali precauzioni.

Smaltere i componenti del kit in base alle regolamentazioni locali o statali.

6.0 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni possono essere siero, plasma o sangue. Osservare le normali precauzioni nella raccolta dei campioni. Per un confronto accurato attraverso cui stabilire valori normali, prelevare il campione di mattina a digiuno. Raccogliere il campione per via venosa in una provetta (con o senza additivi) oppure in provette sottovuoto contenenti eparina (plasma). Lasciare che il sangue coaguli. Centrifugare il campione per separare il siero o il plasma dalle cellule.

I campioni possono essere conservati a 2-8°C al massimo per due (2) giorni. Se il campione non è testato entro questo lasso di tempo, può essere conservato a -20°C fino a 7 giorni. Evitare l'uso di apparecchiature contaminate. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testato in doppio, è richiesto 0.100ml di campione.

7.0 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli bassi, normali e alti per monitorare le prestazioni del test. Questi controlli devono essere trattati come ignoti ed i valori devono essere determinati in ogni test effettuato. Creare delle tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per verificare i trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazione del test. Inoltre, la capacità di assorbanza massima dovrebbe essere coerente con l'esperienza passata. Una deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare un cambiamento inavvertito nelle condizioni sperimentali o una

degradazione dei reagenti del kit. Utilizzare reagenti nuovi per determinare il motivo delle variazioni.

8.0 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Wash Buffer

Diluire il contenuto della soluzione di lavaggio a 1000ml con acqua distillata o deionizzata in un contenitore adatto per la conservazione. Il Buffer diluito può essere conservato a 2-30°C fino a 60 giorni.

2. AGENTE DI ESTRAZIONE

Aggiungere un'aliquota di agente stabilizzante per preparare una soluzione diluita a 1/40 (agente stabilizzante / agente di rilascio). Per esempio, per ottenere 4 ml (4000 µl) aggiungere 0.100 (1000µl) di agente stabilizzante a 3.9ml (3900µl) di agente di rilascio.

3. ESTRAZIONE DEL CAMPIONE (vd. nota 3)

Preparare abbastanza provette per campioni, controlli e calibratori. Dispensare 0.10ml (100µl) di campione nella provetta. Pipettare 0.050ml (50µl) dell'agente di estrazione preparato in ogni provetta, agitare (vd. nota 3) dopo ogni addizione. Lasciare che avvenga la reazione per 15 minuti. Dopo i 15 minuti dispensare 0.50ml (50µl) di buffer neutralizzante, agitare (vd. nota 3). Dopo l'aggiunta del buffer neutralizzante e la miscelazione, lasciare che la reazione si completi per altri 5 minuti prima di dispensare nei pozzetti.

Nota 1: Non utilizzare la soluzione substrato se assume una colorazione blu.

Nota 2: Non utilizzare reagenti contaminati o che presentano sviluppo batterico.

Nota 3: Si raccomanda l'utilizzo di un Vortex.

Nota 4: È estremamente importante dispensare in maniera accurata il volume corretto con una pipetta calibrata e pipettare toccando il collo della provetta in vetro inclinata.

9.0 PROCEDURA DEL TEST

Prima di procedere con il test portare tutti i reagenti, i controlli e i calibratori a temperatura ambiente (20 - 27°C).

**** Il test deve essere eseguito da un operatore qualificato ****

- Preparare tutti i campioni seguendo la procedura "Estrazione del Campione" nella sezione "8.0 Preparazione dei Reagenti"; aspettare 5 minuti prima di procedere affinché si completi la reazione di neutralizzazione (vd. sopra).
- Preparare il numero adeguato di pozzetti per il dosaggio di calibratori, controlli e siero del paziente da essere testati in doppio. **Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto in alluminio, sigillare e conservare a 2-8°C.**
- Pipettare 0.050 ml (50µL) di siero, controllo e calibratore nel pozzetto assegnato.
- Aggiungere 0.050 ml (50µl) di reagente enzimatico Folati in ogni pozzetto.
- Agitare gentilmente la piastra per 20-30 secondi per miscelare.
- Aggiungere 0.050 ml (50µl) di reagente Folati Biotina in ogni pozzetto.
- Agitare gentilmente la piastra per 20-30 secondi per miscelare.
- Coprire e incubare per 45 minuti a temperatura ambiente.
- Eliminare il contenuto della piastra per decantazione o aspirazione. Se per decantazione, picchiare leggermente i pozzetti su carta assorbente.
- Aggiungere 0.350ml (350µl) di soluzione di lavaggio (vd. la sezione Preparazione dei Reagenti), decantare (picchiare e asciugare) o aspirare. Ripetere altre due (2) volte per un totale di tre (3) lavaggi. **Per il lavaggio è possibile utilizzare un lavatore manuale o automatico. Seguire le istruzioni d'uso del produttore. Se si utilizza una spruzzetta evitare schizzi tra un pozzetto e l'altro.**
- Aggiungere 0.100 ml (100µl) di reagente substrato in ogni pozzetto. **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso ordine in modo da minimizzare le differenze nei tempi di reazione tra un pozzetto e l'altro.**
- NON AGITARE LA PIASTRA DOPO L'AGGIUNTA DEL SUBSTRATO**
- Incubare a temperatura ambiente per venti (20) minuti.
- Aggiungere 0.050ml (50µl) di soluzione stop in ogni pozzetto e agitare gentilmente la piastra per 15-20 secondi. **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso ordine in modo da minimizzare le differenze nei tempi di reazione tra un pozzetto e l'altro.**

14. Leggere l'assorbanza in ogni pozzetto a 450nm (usando una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630nm). **Leggere i risultati entro trenta (30) minuti dall'aggiunta della soluzione stop.**

Nota: Diluire i campioni la cui concentrazione si ritiene maggiore di 25ng/ml a 1:5 con Folati '0' ng/ml calibratore e testare di nuovo.

10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

Utilizzare una curva standard per determinare la concentrazione di Folati in campioni non noti.

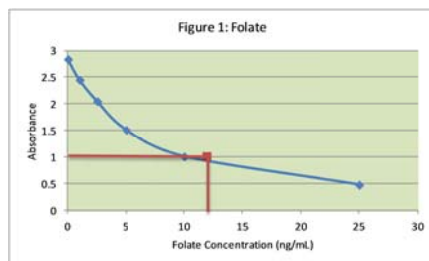
1. Registrare l'assorbanza ottenuta dal lettore di micropiastre come indicato nell'esempio 1.
2. Ripartire l'assorbanza di ciascun duplicato di standard in funzione della rispettiva concentrazione di Folati in ng/ml su carta semilogaritmica (non fare la media dei duplicati degli standard prima di riportare).
3. Tracciare la miglior curva di calibrazione.
4. Per determinare la concentrazione di Folati in un campione non noto, identificare l'assorbanza media dei duplicati per ogni campione non noto sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva, e leggere la concentrazione (in pg/ml) dall'asse orizzontale del grafico (i duplicati dei campioni non noti possono essere calcolati come indicato). Nel seguente esempio, l'assorbanza media (1.021) interseca la curva standard della concentrazione di Folati a 11.9ng/ml (vd. figura 1).

Nota: Per l'elaborazione della curva possono essere utilizzati dei software progettati appositamente per i dosaggi Elisa su micropiastre. **Accertarsi della validazione di tali software in caso di utilizzo.**

*I dati, la figura e la tabella sotto sono a scopo esemplificativo. Non devono essere utilizzati per i risultati analitici.

ESEMPIO 1

Sample I.D.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value (ng/ml)
Cal A	A1	2.812	2.839	0
	B1	2.865		
Cal B	C1	2.437	2.455	1
	D1	2.473		
Cal C	E1	2.058	2.055	2.5
	F1	2.051		
Cal D	G1	1.542	1.518	5
	H1	1.494		
Cal E	A2	1.003	1.015	10
	B2	1.027		
Cal F	C2	0.453	0.485	25
	D2	0.516		
Sample	E2	1.004	1.021	11.9
	F2	1.038		



11.0 PARAMETRI Q.C.

Affinché i risultati del test risultino attendibili devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

1. L'assorbanza (OD) del calibratore 0 pg/ml deve essere ≥ 1.3 .
2. Quattro su sei pool di controllo qualità devono rientrare entro i range stabiliti.

12.0 PRECAUZIONI

La scheda di sicurezza di questo prodotto è disponibile su richiesta.

12.1 Performance

1. È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia lo stesso per ottenere risultati riproducibili.
2. L'aggiunta del campione non deve avvenire oltre i 10 minuti per evitare risultati scorretti.
3. Non utilizzare campioni altamente lipemici, emolizzati o contaminati.
4. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di generare un'altra curva di riferimento standard.
5. L'aggiunta della soluzione substrato dà inizio ad una reazione cinetica che termina con l'aggiunta della soluzione stop. Pertanto il substrato e la soluzione stop devono essere aggiunti nella stessa sequenza per evitare scarti temporali durante la reazione.
6. I lettori di micropiastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
7. La mancata rimozione della soluzione in fase di lavaggio per aspirazione o decantazione può determinare risultati errati.
8. Utilizzare componenti dello stesso lotto. Non interscambiare reagenti di lotti differenti.
9. Pipettare in maniera accurata e precisa e il rispetto di tempi e temperature richieste sono essenziali.
10. Tutte le norme nazionali applicabili, regolamenti e leggi tra cui, ma non limitato a, buone procedure di laboratorio, devono essere seguite scrupolosamente per garantire l'utilizzo corretto del dispositivo.
11. È importante calibrare le attrezzature, pipette, lettori, lavati e/o strumenti automatici utilizzati con questo dispositivo ed eseguire la manutenzione di routine.
12. MSDS – come previsto dalla Direttiva 98/79EC – per questo e per altri dispositivi possono essere richiesti via mail a Monobind@monobind.com.

12.2 Interpretazione

1. **L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da personale qualificato.**
2. I risultati di laboratorio sono solo un aspetto per determinare la cura del paziente e non devono essere l'unica base per la terapia, in particolare se in conflitto con altri determinanti.
3. I reagenti sono stati formulati per eliminare al massimo le interferenze. Tuttavia una potenziale interazione tra rari campioni di siero e i reagenti può causare risultati errati. Gli anticorpi eterofili sono spesso causa di queste interazioni ed è nota la loro problematicità con tutti i tipi di saggi immunologici. (Boscato LM Stuart MC. 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays' Clin.Chem. 1988:3427-33). A scopo diagnostico, i risultati di questo saggio devono essere utilizzati in combinazione con altre indagini cliniche e la storia clinica del paziente.
4. Per risultati validi, controlli adeguati e altri parametri devono essere compresi nei range elencati e nei requisiti del test.
5. Se il kit è alterato miscelando reagenti di kit diversi e produce risultati errati, o se i risultati vengono interpretati in maniera non corretta, Monobind non avrà alcuna responsabilità.
6. Se si utilizza un software per dosaggi Elisa, i valori dei calibratori devono cadere entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

13.0 VALORI ATTESI

In accordo con intervalli di riferimento stabiliti per una popolazione sana, i range attesi per il test system Folati AccuBind® ELISA Test System sono specificati nella Tabella 1.

TABELLA 1
Valori attesi per il test Folati⁷

Popolazione Normale Adulti > 3.0 ng/ml

È importante ricordare che la creazione di un range di valori attesi attraverso un determinato metodo per una popolazione "sana" dipende da una molteplicità di fattori: la specificità del metodo, la popolazione testata e la precisione del metodo. Per queste ragioni ogni laboratorio deve dipendere da un range di valori attesi stabiliti dal produttore solo fino a quando non verrà determinato un range utilizzando una popolazione indigena nell'area in cui è situato il laboratorio.

14.0 CARATTERISTICHE

14.1 Precisione

La precisione del test system Folati AccuBind® ELISA è stata determinata analizzando tre diversi pool di sieri di controllo. Il numero (N), i valori medi (X), la deviazione standard (σ) e il coefficiente di variazione (C.V.) per ognuno di questi sieri di controllo sono illustrati nella Tabella 2 e 3.

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	24	3.72	0.31	8.3
Level 2	24	9.26	0.53	5.7
Level 3	24	13.71	0.83	6.1

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	12	3.32	0.32	9.6
Level 2	12	8.85	0.68	7.7
Level 3	12	12.85	1.15	8.9

*Misurati su 10 saggi in duplicato in un arco di tempo di 10 giorni.

14.2 Sensibilità

Il test system Folati AccuBind® ELISA ha una sensibilità di 0.52ng/ml. La sensibilità è stata calcolata determinando la variabilità del calibratore 0 ng/ml e utilizzando 2σ (95% certezza).

14.3 Accuratezza

Il test system Folati AccuBind® ELISA Test System è stato comparato con un metodo di riferimento. Sono stati utilizzati campioni biologici con valori che oscillavano tra 3.2ng/ml – 13.7ng/ml. Il numero totale di tali campioni è pari a 30. La minima equazione di regressione quadratica e il coefficiente di correlazione per questo kit sono stati calcolati con il metodo di riferimento. I dati ottenuti sono illustrati nella Tabella 4.

Metodo	Mezzo (x)	Y=	0.162 +1.07(X)	0.984
Questo Metodo (Y)	7.76			
Riferimento (X)	8.46			

Solo una piccola quantità di discrepanze tra questo metodo e il metodo di riferimento sono indicate dalla vicinanza dei valori medi. La minima equazione di regressione quadratica e il coefficiente di correlazione indicano un eccellente accordo di metodo.

14.4 Specificità

La specificità della proteina legante i folati è stata valutata aggiungendo le sostanze interferenti in varie concentrazioni ad una matrice di siero.

Sostanza	Interferenze
Bilirubin	ND*
Biotin	ND*
Lipemia	ND*

*ND=Not Detectable

15.0 BIBLIOGRAFIA

1. Scholl, TO. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996, 63, 520-525.
2. Clarke, R. *Age and Ageing*. 2004, 33, 34-41.
3. Owen, WE. *American Journal of Clinical Pathology*. 2003, 120, 121-126.
4. Arcot, J. *Trends in Food Science and Technology*. 2005, 16, 253-266.

5. Mantovani, LT. *European Journal of Cancer*. 1994, 30, 363-369.
6. Nygren-Babol, L. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 437-442.
7. Snow, CF, M.D. *Archives of Internal Medicine*. 1999, 159, 1289-1298.

Rev. 01 Date: 2014-Jul-21 DCO: 1003
Product Code: 7525-300

Size	96(A)	192(B)	
Reagent (fill)	A)	1,0 ml set	1,0 ml set
	B)	1 (7 ml)	2 (7 ml)
	C)	1 (7 ml)	2 (7 ml)
	D)	1 plate	2 plates
	E)	1 (20 ml)	2 (20 ml)
	F)	1 (12 ml)	2 (12 ml)
	G)	1 (8 ml)	2 (8 ml)
	H)	1 (14 ml)	2 (14 ml)
	I)	1 (0.7ml)	2 (0.7ml)
	J)	1 (7 ml)	2 (7 ml)

For Orders and Inquiries, please contact



Tel: +1 949.951.2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.

