NADMED

ES

Q-NADMED BLOOD
kit de ensayo NAD+ y NADH

Kit de ensayo cuantitativo para sangre total

Versión 4.0

DE UN SOLO USO

Estas instrucciones deben leerse en su totalidad antes de usar este producto.

CE IVD USO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre comercial: Q-NADMED Blood kit de ensayo NAD+ y NADH cuantitativo para sangre total
B. Número de catálogo:
    a. IVD_001, 40 muestras (formato de 96 pocillos)
    b. IVD_001/MY, 40 muestras (formato de 96 pocillos)
C. Almacenamiento: –80°C
D. Fecha de publicación de las instrucciones: septiembre de 2023

Fabricante:

NADMED Ltd / Oy
Haartmaninkatu 4, Edificio 14
00290 Helsinki, FINLANDIA
www.nadmed.com, info@nadmed.com

TABLA DE CONTENIDOS

INFORMACIÓN GENERAL 2
TABLA DE CONTENIDOS 3
USO PREVISTO 4
ANTECEDENTES CLÍNICOS 4
PRINCIPIOS DEL ENSAYO 4
REACTIVOS PROPORCIONADOS 5
PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS 5
ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS 6
OTROS MATERIALES NECESARIOS 6
PREPARACIÓN DEL REACTIVO 7
RECOGIDA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO 7
CONSIDERACIONES PRÁCTICAS 8
EXTRACCIÓN DE NAD+ Y NADH DE LA SANGRE 10
PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES 11
MÉTODO DEL ENSAYO 13
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS 15
CONTROL POSITIVO 15
EFICACIA Y LIMITACIONES 16
SÍMBOLOS 20
IMÁGENES ESQUEMÁTICAS 22
NOTAS 23
DISPOSICIÓN DE LA PLACA 24

USO PREVISTO

Q-NADMED Blood, un dispositivo médico para diagnóstico in vitro, es un kit de ensayo analítico para medir las concentraciones de los metabolitos NAD+ y NADH en sangre total humana. El ensayo es cuantitativo. Los usuarios previstos del kit de ensayo Q-NADMED son personal de laboratorio con formación. El principal uso previsto es detectar los cambios sistémicos en NAD+ y NADH. Los principales usuarios previstos de los resultados del ensayo son profesionales de la salud que interpretan los resultados obtenidos en el contexto de los estados de enfermedad/salud. Los resultados del kit de ensayo de Q-NADMED pueden usarse para tomar decisiones sobre tratamientos de suplementación con precursores de NAD. El segundo uso previsto del kit de ensayo Q-NADMED es controlar los niveles de NAD+ y NADH en pacientes que reciben tratamientos como suplementación de precursores de NAD y para ajustar la dosis.

ANTECEDENTES CLÍNICOS

Los metabolitos NAD+ y NADH adaptan el metabolismo humano y la homeostasis energética frente a las cambiantes condiciones endógenas y exógenas. Los datos de investigación acumulados muestran que los niveles sistémicos de NAD+ se reducen como respuesta a una enfermedad manifiesta, lo que crea una señal de un desequilibrio de la homeostasis energética del cuerpo. El grado de reducción de NAD+ varía según los pacientes y las diferentes enfermedades. El descenso progresivo de los niveles de NAD+ hace imposible que el cuerpo mantenga sus funciones metabólicas básicas incluso en condiciones de terapia activa. Q-NADMED permite cribar pacientes para buscar una deficiencia de NAD+ y NADH con el objetivo de corregirla y mejorar la eficiencia del tratamiento. La investigación actual sobre la contribución de NAD+ y NADH en los mecanismos y la progresión de diferentes enfermedades es muy activa. La lista de patologías con sospecha de cambios en la concentración de NAD+ y NADH no deja de aumentar con pruebas publicadas para la enfermedad mitocondrial, el envejecimiento, la sepsis, las infecciones víricas, las enfermedades cardiovasculares y hepáticas, la diabetes tipo 1 y tipo 2, las enfermedades neurológicas y el cáncer.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El principio del ensayo es una reacción enzimática cíclica con una detección colorimétrica del punto final. Primero, los metabolitos NAD+ y NADH se extraen juntos de una muestra de sangre en un solo paso. Después, el extracto se divide en dos partes. En la primera parte, se estabiliza el NAD+ y se elimina el NADH, mientras que en la segunda parte se estabiliza el NADH y se elimina el NAD+. Después, los metabolitos NAD+ y NADH se analizan en dos placas separadas con una reacción enzimática acoplada a un cambio de color. La intensidad del cambio de color en el ensayo es directamente proporcional a la concentración de NAD+ o NADH en la mezcla de reacción.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

REACTIVOS	DESCRIPCIÓN*	ANTES DEL ENSAYO
BUFFER A	28 mL de tampón de extracción	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
NAD+ stabilizing reagent	8 mL de solución de tampón para medida de NAD+	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
NADH stabilizing reagent	8 mL de solución de tampón para medida de NADH	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
NAD+ standard stock	1 microtubo con 40 µL de 1 mM NAD+	Ver guía de preparación.
NADH standard stock	1 microtubo con 40 µL de 1 mM NADH	Ver guía de preparación.
BUFFER C	2 frascos con 19 mL del tampón del ensayo	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
Assay color reagent	2 frascos con 3 mL de reactivo con el color del ensayo	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C). Debería usarse en 2 h tras haberse equilibrado.
Enzyme	2 microtubos con 40 µL de enzima. Una por placa.	Descongelar solo antes de añadirlo a la Mezcla maestra.
Stop solution	3 mL de solución para detener la reacción del ensayo	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C).
Positive control (buffer)	1 microtubo con 45 µL del tampón para la preparación del control positivo	Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C). Ver guía de preparación.

*Nota: Variación aceptada del volumen de relleno del 5 %.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para su uso únicamente como *diagnóstico in vitro*. Para su uso únicamente por personal capacitado.

La Stop solution puede causar irritación de la piel, los ojos y las vías respiratorias. Evitar inhalar los vapores.

El Assay color reagent puede causar irritación de la piel. Manejar con cuidado, usar guantes.

BUFFER A puede causar irritación ocular. Manejar con cuidado, usar gafas de protección.

No fumar, beber, comer ni maquillarse en el área de trabajo. Usar guantes de protección, ropa protectora y protección ocular. Lavarse bien las manos después de su manejo.

La ficha de datos de seguridad (FDS) de Q-NADMED presenta los peligros identificados que comportan los químicos que hay en este kit y la información de advertencia pertinente asociada a esos peligros.

La ficha de datos de seguridad (FDS) de Q-NADMED describe la eliminación de los componentes usados del kit.

ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrirlo, todos los componentes del kit deben estar almacenados a –80°C. Evitar las fluctuaciones de temperatura en el congelador.
- Una vez descongelados, el BUFFER A, los reactivos NAD+ y NADH stabilizing reagent, el Positive control (buffer) y la Stop solution son estables durante dos semanas a temperatura ambiente
- El BUFFER C ha de descongelarse y usarse el día del ensayo.
- El Assay color reagent es estable durante un máximo de 3 horas a temperatura ambiente una vez descongelado.
- La Enzyme debería usarse directamente una vez descongelada.
- Los estándares y el control positivo deberían prepararse y usarse el día del ensayo.
- Los estándares deberían protegerse de la luz.

OTROS MATERIALES NECESARIOS

Se necesitan los siguientes materiales, pero no vienen incluidos en el kit:

- Agua desionizada (agua mili-Q de un sistema de purificación de agua o agua desionizada disponible en el mercado, p. ej., Sigma cat. n.º 38796)
- Microtubos 1,5 mL, para la preparación, extracción, estabilización y preparación de los estándares del ensayo. Requisitos de material de los microtubos: tubos de microcentrífuga básicos no estériles hechos de polipropileno (PP) transparente/de color natural diseñados para diagnóstico in vitro (p.ej., Sarstedt Ref. 72.690.001). No usar microtubos diseñados para biología molecular marcados como estériles (esterilizados químicamente), sin endotoxinas, pirógenos, ADN humano y de baja retención; no usar microtubos diseñados para trabajar con proteínas marcados como LoBind.
- Dos reservorios para pipetas multicanal (de poliestireno no estéril): uno para pipetear la Mezcla maestra y otro para pipetear la Stop solution.
- Dos microplacas de 96 pocillos transparentes de poliestireno con propiedades de fijación media de proteínas diseñadas para ensayos de colorimetría y absorbancia.
- Baño seco (bloque de calor) de temperatura ajustable (hasta 80°C).
- Microcentrífuga de sobremesa refrigerada (velocidad máx. 20 000 x g).
- Baño de agua con hielo (paquetes de hielo con agua del grifo añadida hasta que tengan consistencia de granizado, que sostiene firmemente los microtubos insertados y evita que floten).
- Pipetas monocanal calibradas (0,5-10 µL, 5-50 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) y multicanal (5-50 µL, 30-300 µL) y puntas de pipeta biseladas de baja retención.
- Lector espectrofotométrico de microplacas capaz de medir la absorbancia a 570-573 nm.
- Papel de aluminio para proteger los microtubos y las placas de la luz.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Descongelar todos los componentes del ensayo para NAD+ y/o NADH según las instrucciones de la tabla de la página 5 antes del ensayo.

A. **BUFFER A**: listo para usar
B. **NAD+ stabilizing reagent**: listo para usar
C. **NADH stabilizing reagent**: listo para usar
D. **Enzyme**: lista para usar
E. **Stop solution**: lista para usar. Si se forma un precipitado en la Stop solution antes de que se descongele, debería volver a disolverse con 5 minutos de incubación a +37°C y luego volver a enfriarse a 25 °C antes de usarse. No agitar la Stop solution con fuerza.
F. **Positive control (buffer)**: listo para usar. (Más instrucciones en la preparación del control positivo)
G. **50 µM NAD+ standard stock**: añadir 25 µL de 1 mM NAD+ standard stock (incluido) en 475 µL de agua desionizada, mezclar bien. Proteger de la luz. (Más instrucciones en la preparación de estándares y del control positivo).
H. **10 µM NADH standard stock**: añadir 10 µL de 1 mM NADH standard stock (incluido) en 990 µL de agua desionizada, mezclar bien. Proteger de la luz. (Más instrucciones en la preparación de estándares y del control positivo).
I. **Mezcla maestra**: se tiene que mezclar 1 frasco de Assay color reagent (3 mL) en 1 frasco de **BUFFER C** para crear 1 botella de Mezcla maestra necesaria para 1 placa de ensayo de NAD+ o de NADH. Para protegerla de la luz, no sacar de la botella original de color ámbar. No agitar con fuerza. Descartar el sobrante, no volver a congelar.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

El kit solo es para analizar muestras de sangre total. La sangre venosa, recogida de una extracción de la vena y la sangre periférica, recogida con dispositivos de recogida de muestras de sangre de tipo lanceta, son muestras aptas. Las muestras de sangre total deberían recogerse en tubos de recolección recubiertos con un espray de heparina litio o EDTA K2 como anticoagulantes y **han de mezclarse adecuadamente** rotándolos hacia arriba y hacia abajo.

Requisitos de los tubos para la recogida de sangre venosa con anticoagulantes (BD Vacutainer o Vacuette): usar tubos para sangre EDTA K2 con un recubrimiento en espray de EDTA K2 lo que resultará en una concentración de 1,2-2 mg de EDTA K2 por 1 mL de sangre recogida o de tubos para sangre heparina litio (HL) con un recubrimiento en espray de HL lo que resultará en una concentración de 17-18 IU de HL por 1 mL de sangre recogida. El análisis requiere volúmenes pequeños de sangre completa, por lo que recomendamos usar tubos pequeños de recogida de sangre total, es decir, de 2-3 mL. Recoger el volumen de sangre requerido en el tubo de recogida es vital para mantener la concentración de anticoagulante objetivo en la muestra.

Las muestras se pueden analizar frescas o congeladas. La sangre fresca puede analizarse en un plazo de 72 horas si se mantiene a 4-8°C una vez se haya extraído. Como la sangre sufre un proceso de separación en el tubo de recogida, es vital mezclar con cuidado la muestra antes de extraer una alícuota para la extracción. Si la sangre no puede analizarse fresca, recomendamos encarecidamente el alicuotado de la

muestra 72 horas después de la extracción en alícuotas de 150-200 µL usando microtubos de 0,5-2 mL no estériles, de pared única, transparentes de polipropileno y congelarlos a −20ºC o −80ºC. Congelar tubos de recogida con un volumen de muestra más grande (es decir >2 mL) o en microtubos de doble pared con faldón aumentará el tiempo de congelación y, sobre todo, el tiempo de descongelación antes de la extracción, lo que puede causar una gran variabilidad en los resultados. El tiempo de almacenamiento para las alícuotas pequeñas es de un mes a −20ºC y aproximadamente un año a −80ºC. El kit mide el contenido intracelular de NAD. Por ello, es muy importante mezclar de manera adecuada cada muestra fresca antes y durante el proceso de alicuotado para garantizar que cada una de las alícuotas contiene aproximadamente el mismo número de células. Las muestras congeladas deben almacenarse congeladas todo el tiempo antes del ensayo. Para los ensayos clínicos, recomendamos encarecidamente mantener el mismo intervalo de tiempo entre la extracción de la muestra y el alicuotado/congelado para todas las muestras del estudio. Para poder medir el NAD+ y el NADH, se necesitan 100 µL de la sangre total. A continuación, las muestras congeladas y descongeladas no pueden usarse para el análisis.

CONSIDERACIONES PRÁCTICAS

- No usar los componentes del kit pasada la fecha de caducidad.
- No mezclar materiales de kits de diferente lote. No se permiten los ciclos continuos de congelación y descongelación.
- El ensayo NO es apto para medir el NAD+ o NADH en plasma o suero ni en células o tejidos cultivados (humanos o animales).
- Mezclar bien los reactivos haciéndolos girar suavemente. Los microtubos pequeños deberían centrifugarse rápidamente a baja velocidad antes de abrirse.
- Se pueden usar tanto muestras de sangre frescas como congeladas para el ensayo. Es esencial que las muestras sean homogéneas (que estén adecuadamente mezcladas) para su análisis.
- Recomendamos extraer un máximo de ocho muestras a la vez para reducir el tiempo de manejo.
- Los análisis de NAD+ y NADH se llevan a cabo en dos placas separadas. Recomendamos llevar a cabo los ensayos de NAD+ y NADH el día de la extracción.
- Para evitar la contaminación cruzada, usar puntas de pipeta nuevas cuando se añada el estándar, la muestra y el reactivo. Además, hay que usar reservorios separados para la Mezcla maestra y la Stop solution.
- Las pipetas de alta precisión y las puntas biseladas con retención baja mejorarán la precisión.
- El Assay color reagent es un compuesto amarillo sensible a la luz que se vuelve marrón si se da una reacción enzimática. La exposición a la luz solar directa o a la luz artificial causa que su color impreciso se vuelva verde. Para minimizar la interferencia de la luz con el ensayo, recomendamos realizar las siguientes acciones:
    - pipetear la Mezcla maestra y luego la Stop solution en la placa en condiciones de luz natural indirecta (luz tenue). Para conseguir estas condiciones, apagar las luces artificiales interiores y evitar pipetear cerca de una ventana. Por luz natural indirecta (luz tenue) se entiende la cantidad de luz ambiental que se percibe cuando se conduce dentro de un coche bajo un puente en un día nublado.

- cubrir la placa de 96 pocillos con una tapa hecha de papel de aluminio durante el tiempo de reacción posterior a la adición de la Mezcla maestra, así como durante la transferencia al lector de placa una vez añadida la Stop solution. No envolver la placa con el papel de aluminio, pues existe el riesgo de que se contaminen y se mezclen las muestras al desenvolverla.
- El protocolo indica los pasos que requieren trabajar en condiciones de luz tenue.

- El control positivo es una muestra artificial que contiene cantidades establecidas de NAD+ y NADH puros.
- Requisitos técnicos para el baño seco (bloque de calor):
  - Compruebe la eficiencia de la transferencia de calor en el baño seco del siguiente modo:

  1. Añada 250 µL de agua a un microtubo que encaje en el baño seco que está utilizando.
  2. Inserte un termómetro de laboratorio convencional en el microtubo con el líquido y colóquelo en el baño seco ajustado a 80°C.
  3. Mida el tiempo necesario para aumentar la temperatura del líquido a 70-75°C.
  4. Todos los tiempos de incubación de baño seco mencionados en este protocolo están provistos para un baño seco que caliente 250 µL de agua a 75°C en 2 minutos. Esto es suficiente para que la reacción química alcance los 70-75°C grados en la solución tras la incubación en el baño seco.

- Requisitos técnicos del lector de placa espectrofotométrico:
  1. Medición de absorción de la luz a 570-573 nm,
  2. Opción para ajustar el brillo/intensidad del escáner a baja. En algunos lectores de placa, el brillo puede ajustarse según el número de flashes por medición. En ese caso, ajustar el número de flashes en el rango de 5 a 10.
- La Mezcla maestra y la Stop solution contienen detergentes. Para evitar la formación de burbujas, pipetear la Mezcla maestra y la Stop solution presionando la pipeta en la primera posición de parada, eliminar cualquier burbuja que hubiera en los pocillos con una aguja pequeña. Evitar tocar el contenido de los pocillos con la punta de la pipeta.
- Recomendamos el siguiente orden en los pasos:
  1. Dejar que el BUFFER A, el NAD+ stabilizing reagent, el NADH stabilizing reagent y la Stop solution lleguen a temperatura ambiente el día antes del ensayo. Estas soluciones son estables a temperatura ambiente durante dos semanas.
  2. Preparar los estándares y el control positivo el día del ensayo.
  3. El día del ensayo, descongelar los frascos con el BUFFER C y el Assay color reagent y dejar que lleguen a temperatura ambiente. Tardan entre 2 y 3 horas en derretirse. Durante este tiempo llevar a cabo la extracción de las muestras y preparar dos alícuotas de los extractos de las muestras para una medición separada de NAD+ y NADH. Llevar a cabo los ensayos NAD+ y NADH en placas separadas, uno después del otro.

EXTRACCIÓN DE NAD+ Y NADH DE LA SANGRE

Nota: Esta sección se lleva a cabo en condiciones de luz normales.

1. Dejar que el BUFFER A, el NAD+ stabilizing reagent y el NADH stabilizing reagent lleguen a temperatura ambiente antes de la extracción.
2. Usar sangre fresca refrigerada en hielo o descongelar las muestras de sangre congelada en agua con hielo durante 12-15 minutos antes de la extracción. (**Consejo:** se recomienda usar ciclos rápidos de manos calientes ocasionalmente durante el tiempo de descongelación). Recomendamos extraer un máximo de 8 muestras a la vez.
3. Pipetear 500 µL de BUFFER A en los microtubos de 1,5 mL.
4. Calentar las alícuotas del BUFFER A en un baño seco a 75-80°C durante 2-3 min. (máx. 5 min). Mantener en el baño seco hasta el paso 6.
5. Mezclar rápidamente las muestras de sangre en un par de ciclos de pipeteado ascendente y descendente con una rotación simultánea de la punta antes de la extracción, para evitar la formación de espuma.
6. Añadir 100 µL de sangre en un movimiento rápido y firme directamente en el microtubo con el BUFFER A caliente que se ha mantenido en el baño seco. Mezclar inmediatamente con unos cuantos ciclos de pipeteado ascendente y descendente intensos con rotación simultánea de la punta para mezclar de manera eficiente la muestra fría con el BUFFER A caliente.
7. Incubar el homogeneizado a 75–80°C durante 1 minuto.
8. Enfriar la mezcla en un baño de agua con hielo durante al menos 5 minutos. Una vez enfriada sobre hielo, el homogeneizado debería polimerizarse sin dejar líquido.
9. Centrifugar a 20 000 x g durante 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un microtubo limpio y desechar el sedimento. Mantener los extractos totales obtenidos (sobrenadantes) que contienen NAD+ y NADH a 4°C, cubiertos con una tapa de papel de aluminio hasta el siguiente paso. Continuar con el paso 2 al 9 con la siguiente remesa de 8 muestras hasta que se acaben las muestras que se deben extraer. Una vez se hayan extraído todas las muestras, continuar con el paso 10. *Opcional:* los sobrenadantes pueden almacenarse a −80°C durante una semana. En este caso, descongelar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la preparación de las alícuotas en el paso 10.
10. Preparar las dos alícuotas separadas de los extractos obtenidos en microtubos limpios: 150 µL/tubo.
11. A la primera alícuota de 150 µL, añadir 100 µL de NAD+ stabilizing reagent para conseguir un extracto estabilizado con NAD+ (mantiene el NAD+ y elimina el NADH). Mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Si el ensayo no se lleva a cabo de manera inmediata, refrigerar los extractos estabilizados hasta el ensayo. Proteger de la luz tapándolo con una tapa de papel de aluminio.
12. A la segunda muestra parcial de 150 µL, añadir 100 µL de NADH stabilizing reagent para conseguir un extracto estabilizado con NADH (mantiene el NADH y elimina el NAD+). Mezclar bien e incubar durante 2 minutos en un baño seco a 80°C. Enfriar sobre hielo durante 5 minutos. Si el ensayo no se lleva a cabo de manera inmediata, refrigerar los extractos estabilizados hasta el ensayo. Proteger de la luz tapándolo con una tapa de papel de aluminio.

NOTA: La dilución final de la muestra de sangre total original será de 10 veces.

NOTA: En caso de suplementación con precursores de NAD, los niveles de NAD+ pueden aumentar en sangre, y por ello, el extracto de NAD+ estabilizado debería diluirse más (dos veces) usando agua desionizada antes del ensayo. En este caso, la dilución final de la muestra de sangre original será de 20 veces para NAD+. El extracto de NADH estabilizado no requiere dilución.

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Nota: Esta sección se lleva a cabo en condiciones de luz normales.

1. Preparar los estándares el día del ensayo. Descongelar los microtubos con 1 mM de standard stock durante 5 minutos a temperatura ambiente. Proteger de la luz con una tapa de papel de aluminio mientras se descongela.
2. Preparar **50 µM de solución de NAD+** añadiendo 25 µL de 1 mM de NAD+ Standard Stock (incluido) en 475 µL de agua desionizada, mezclar bien. Este stock se usa para la preparación de estándares de NAD+ y control positivo.
3. Preparar **los estándares de NAD+** según el esquema que aparece a continuación mezclando los volúmenes indicados de los reactivos en el siguiente orden: agua desionizada, 50 µM de solución de NAD+, BUFFER A y NAD+ stabilizing reagent. El volumen final de cada estándar es de 1 mL. (**Consejo:** usar la misma pipeta monocanal de 20-200 µL para pipetear 50 µM de solución de NAD+ y el agua).

NÚMERO DE ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN de NAD+ (µM)	PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES			
		50 µM NAD+ stock (µL)	dH_2O (µL)	BUFFER A (µL)	NAD+ stabilizing reagent (µL)
ST1	0	0	100	500	400
ST2	1	20	80	500	400
ST3	2	40	60	500	400
ST4	3	60	40	500	400
ST5	5	100	0	500	400

4. Preparar **10 µM de solución de NADH** añadiendo 10 µL de 1 mM de NADH Standard Stock (incluido) en 990 µL de agua desionizada, mezclar bien. Este stock se usa para la preparación de estándares de NADH y control positivo.
5. Preparar **los estándares de NADH** según el esquema que aparece a continuación mezclando los volúmenes indicados en el siguiente orden: agua desionizada, 10 µM de solución de NADH, BUFFER A y NADH stabilizing reagent. El volumen final de cada estándar es de 1 mL. (**Consejo**: usar la misma pipeta monocanal de 20-200 µL para pipetear 10 µM de solución de NADH y el agua).

NÚMERO DE ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN de NADH (µM)	PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES			
		10 µM NADH stock (µL)	dH_2O (µL)	BUFFER A (µL)	NADH stabilizing reagent (µL)
ST1	0	0	100	500	400
ST2	0,2	20	80	500	400
ST3	0,4	40	60	500	400
ST4	0,6	60	40	500	400
ST5	1	100	0	500	400

6. Cubrir el puesto con los estándares preparados con una tapa de papel de aluminio para protegerlos de la luz y mantenerlos refrigerados antes de pipetearlos en la placa.

PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO

Nota: Esta sección se lleva a cabo en condiciones de luz normales

El control positivo se prepara antes del ensayo mezclando cantidades conocidas de estándares de NAD+ y NADH con el Positive control buffer (incluido). El volumen del control positivo y la concentración de metabolitos de NAD simulan los de una muestra de sangre de un sujeto humano sano. El control positivo preparado se somete a los mismos pasos de extracción y estabilización que las muestras de sangre total.

1. Descongelar el microtubo con el Positive control (buffer) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Para preparar el control positivo, añadir 45 µL de Positive control buffer en un microtubo.
3. Añadir 75 µL de **50 µM de solución de NAD+** (preparación en la página 11) y 30 µL de **10 µM de solución de NADH** (preparación en la página 11) al Positive control buffer y mezclar bien. La concentración esperada de NAD+ en el control positivo es de 25 ± 2 µM y de NADH es 2 ± 0.3 µM.
4. El control positivo no contiene proteínas y, por tanto, puede extraerse con el BUFFER A pipetearlos a temperatura ambiente. Añadir 100 µL del control positivo preparado en 500 µL de BUFFER A a temperatura ambiente para crear un «extracto» de control positivo, mezclar bien y continuar con el paso 5.
5. Preparar las dos alícuotas separadas del «extracto» de control positivo (del paso 4) en microtubos limpios: 150 µL/tubo.
6. A la primera alícuota de 150 µL añadir 100 µL de **NAD+ stabilizing reagent**, mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después mantener refrigerada y cubierta con papel de aluminio hasta el ensayo. Esta alícuota estabilizada del control positivo se usará en **el ensayo de NAD+.**
7. A la segunda alícuota de 150 µL añadir 100 µL de **NADH stabilizing reagent**, mezclar bien. Calentar esta solución a 75-80 °C durante 2 minutos, enfriar en hielo. Después mantener refrigerada y cubierta con papel de aluminio hasta el ensayo. Esta alícuota estabilizada del control positivo se usará en **el ensayo de NADH**.

NOTA: La dilución final del control positivo será de 10 veces.

MÉTODO DEL ENSAYO

Notas:

- Los pasos 1-3 se llevan a cabo en condiciones de luz normales.
- **Los pasos 4-9 se llevan a cabo en condiciones de luz tenue (con la luz artificial directa apagada).**
- Todos los ensayos contienen muestras en blanco para corregir todas las señales de fondo inespecíficas. Las muestras en blanco se preparan a partir de cuatro extractos de muestra estabilizados (es decir, BL UNK 1-4 de las muestras 1-4) para corregir una interacción inespecífica entre los componentes del extracto y el Assay color reagent de la Mezcla maestra. El control positivo no necesita un espacio en blanco separado.
- Si se analiza sangre de sujetos que están en tratamiento con suplementación con precursores de NAD+, estas muestras requerirán al menos dos pocillos con muestras en blanco para este tipo de muestra. Si las muestras de los sujetos suplementados y de los no suplementados se van a analizar en la misma placa, recomendamos preparar dos pocillos de muestra en blanco por condición. Para esto, seleccionar dos extractos estabilizados de los individuos suplementados y dos de los no suplementados. Usar estos extractos para preparar las muestras en blanco: dos pocillos por condición.
- **Todas las muestras en blanco están incubadas con la Mezcla maestra SIN Enzyme añadida**.
- La Enzyme debería descongelarse justo antes de añadirse a la Mezcla maestra. Centrifugar ligeramente el microtubo con la Enzyme a baja velocidad antes de abrirlo.

Pasos:

1. Incubar los estándares preparados, el extracto de muestra estabilizado y el control positivo durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de pipetearlo a la placa.
2. Pipetear 20 µL de cada estándar de NAD+ y NADH en duplicados empezando por ST1 (0 µM) según el esquema de la placa de la página 23.
3. Pipetear 20 µL del control positivo estabilizado y los extractos de muestra estabilizados en duplicados (ver el esquema de la pág. 23). Para los primeros cuatro extractos de muestra estabilizados, pipetear un replicado extra en el pocillo indicado (BL UNK1-4) según el esquema de la pág. 23. Estos cuatro pocillos son las muestras en blanco necesarias para el análisis sin Enzyme, para corregir las interacciones inespecíficas entre el extracto y el Assay color reagent dentro de la Mezcla maestra.
4. Desde este paso en adelante, trabajar en condiciones de luz tenue. Preparar la Mezcla maestra añadiendo el Assay color reagent al BUFFER C, mezclar con suavidad rotándolo.
5. Añadir 190 µL de la Mezcla maestra sin Enzyme a cada uno de los cuatro pocillos de muestra en blanco (BL UNK1-4).
6. Añadir 40 µL de Enzyme al frasco en la Mezcla maestra restante. Mezclar con cuidado, evitar la formación de espuma. Verter la Mezcla maestra con las enzimas añadidas en el reservorio; proteger la Mezcla maestra en el reservorio durante el pipeteado con una tapa de papel de aluminio. (Vea más instrucciones en nuestro video instructivo en www.nadmed.com).

7. Añadir 190 µL de Mezcla maestra con Enzyme añadida a todos los pocillos restantes incluidos los del control positivo estabilizado, usando una pipeta multicanal; evitar la formación de espuma y la luz directa. Cubrir inmediatamente la placa preparada con la tapa de papel de aluminio.
8. Para el ensayo de NAD+: incubar la placa cubierta durante 4-6 minutos a temperatura ambiente.

   Para el ensayo de NADH: incubar la placa cubierta durante 6-10 minutos a temperatura ambiente.

   NOTA: La reacción puede detenerse cuando haya un gradiente de color evidente en los estándares y una diferencia en la intensidad del color entre las muestras con enzima añadida y las muestras en blanco. Cuanto más largo sea el tiempo de reacción, más intensa será la señal que se observe. La intensidad del color del ensayo de NADH es menor que la del NAD+, porque la concentración en la sangre de NADH es mucho menor que la de NAD+. Por lo tanto, el rango de los estándares de NADH es de 0 a 1 µM y el de los de NAD+ es de 0 a 5 µM.
9. Detener las reacciones añadiendo 10 µL de Stop solution a cada pocillo en el mismo orden que la Mezcla maestra con una pipeta multicanal. Evitar la formación de espuma agitando suavemente la placa con la mano en una superficie plana y eliminando las burbujas.
10. Medir la absorbancia de la luz a 573 nm inmediatamente después de añadir la Stop solution (la absorbancia se puede medir a los 5 minutos de haber detenido las reacciones). Si es posible, agitar la placa dentro del lector de placa durante 5 segundos antes de la medición. Nota: Tras añadir la Stop solution, la intensidad del color puede aumentar de manera lenta y uniforme en todos los pocillos. Esto se debe a un proceso de fondo no enzimático en la Mezcla maestra.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcular la media de las lecturas de absorbancia para cada estándar (ST1–ST5). Crear una curva estándar colocando los datos de la media de la absorbancia para cada estándar en el eje y frente a la concentración (en µM) en el eje x y realizar una regresión linear sencilla basada en la curva estándar.
2. Encontrar la concentración de cada metabolito en cada pocillo usando la fórmula de regresión lineal de la curva estándar.
3. Calcular la media de cuatro muestras en blanco (BL UNK1-4). El valor obtenido representa una señal inespecífica de los extractos estabilizados.
4. Calcular la media de los duplicados de cada extracto de muestra estabilizado (UNK).
5. Calcular la media de los duplicados del control positivo estabilizado y multiplicar por 10 para obtener la concentración (µM) de metabolitos de NAD+ y NADH en los 150 µL originales del control positivo.
6. Corregir las concentraciones obtenidas en los extractos de muestras estabilizados para el valor de la muestra en blanco (calculado en el paso 3) y multiplicar por 10 para obtener la concentración (µM) de metabolitos de NAD+ o NADH en la muestra de sangre original (consulte los detalles en la página 16). Si los extractos de NAD+ estabilizados han sido diluidos adicionalmente, la concentración deberá multiplicarse por el factor de dilución adicional.

CONTROL POSITIVO

El objetivo del control positivo es controlar la eficiencia del paso de estabilización cuando uno de los metabolitos se elimina de la mezcla. La concentración de NAD+ medido en el control positivo se espera que se encuentre dentro del rango de 23-27 µM; la de NADH, dentro del rango de 1,7-2,3 µM.

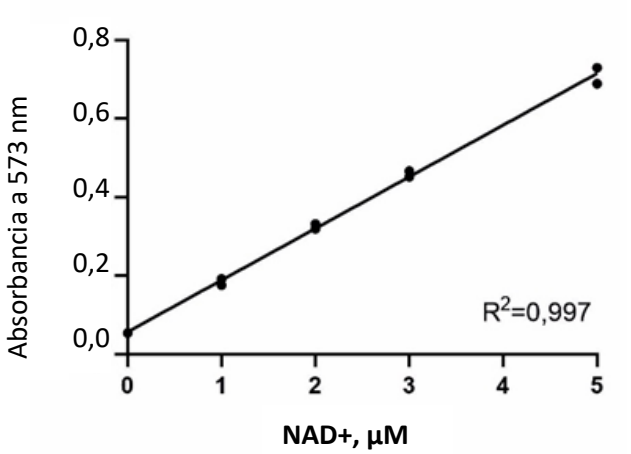
- Se espera que los valores de absorbancia del control positivo estabilizado en la placa de NAD+ estén entre la absorbancia de ST3 y ST4.
- Se espera que los valores de absorbancia del control positivo estabilizado en la placa de NADH sean iguales que ST2 con una variación de 0,05 unidades ópticas.

EFICACIA Y LIMITACIONES

A. DATOS TÍPICOS

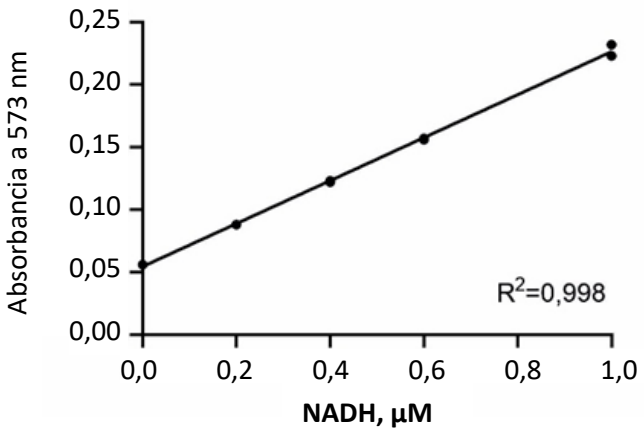
La curva estándar y las concentraciones en los extractos de muestra estabilizados se proporcionan únicamente como demostración y no deberían usarse nunca en lugar de la curva de calibración en tiempo real.

CURVA ESTÁNDAR PARA NAD+



Estándar	NAD+ (µM)	Absorbancia (573 nm) Tiempo de ensayo: 4 min
ST1	0	0,054
		0,054
ST2	1	0,176
		0,192
ST3	2	0,319
		0,332
ST4	3	0,452
		0,466
ST5	5	0,689
		0,730

CURVA ESTÁNDAR PARA NADH



Estándar	NADH (µM)	Absorbancia (573 nm) Tiempo de ensayo: 6 min
ST1	0	0,056
		0,056
ST2	0,2	0,088
		0,088
ST3	0,4	0,122
		0,123
ST4	0,6	0,157
		0,156
ST5	1	0,223
		0,232

CÁLCULO DE RESULTADOS PARA NAD+

Los valores de concentración en los extractos de muestras estabilizados (UNK) y las muestras en blanco (BL UNK1-4) se determinan por la fórmula de ajuste linear de la curva estándar de NAD+

Desconocidas	Concentración en extractos estabilizados (µM)	Concentración en extractos estabilizados corregida por la media de la muestra en blanco (BL UNK 1-4, µM)	Concentración final de NAD+ en la muestra original (µM)*
UNK 1	2,944	3,008	30,08
	3,151		
UNK 2	2,841	2,945	29,45
	3,129		
UNK 3	2,686	2,668	26,68
	2,730		
UNK 4	1,895	1,907	19,07
	1,999		
UNK 5	2,346	2,343	23,43
	2,420		
UNK 6	3,432	3,425	34,25
	3,499		
BL UNK 1	0,040	-	
BL UNK 2	0,048		
BL UNK 3	0,026		
BL UNK 4	0,048		

* Corregido por un factor de dilución x10

CÁLCULO DE RESULTADOS PARA NADH

Los valores de concentración en los extractos de muestras estabilizados (UNK) y las muestras en blanco (BL UNK1-4) se determinan por la fórmula de ajuste linear de la curva estándar de NADH.

Desconocidas	Concentración en extractos estabilizados (µM)	Concentración en extractos estabilizados corregida por la media de la muestra en blanco (BL UNK 1-4, µM)	Concentración final de NADH en la muestra original (µM)*
UNK 1	0,239	0,086	0,86
	0,239		
UNK 2	0,284	0,133	1,33
	0,290		
UNK 3	0,228	0,077	0,77
	0,234		
UNK 4	0,234	0,083	0,83
	0,239		
UNK 5	0,200	0,044	0,44
	0,195		
UNK 6	0,228	0,083	0,83
	0,245		
BL UNK 1	0,156	-	
BL UNK 2	0,161		
BL UNK 3	0,150		
BL UNK 4	0,150		

* Corregido por un factor de dilución x10

B. LÍMITES DE DETECCIÓN

El límite de blanco (LoB) para Q-NADMED Blood se presenta en la tabla inferior (LoB± desviación estándar [SD]).

Límite de blanco	
	pmol/pocillo
NAD+	1,84 ± 0,9
NADH	2,10 ± 0,5

El límite de detección (LoD) se ha calculado con las curvas estándar de NAD+ y NADH y se presenta en la tabla inferior (LoD± SD).

Límite de detección	
	µM en sangre total
NAD+	0,33 ± 0,2
NADH	0,19 ± 0,05

El límite de cuantificación (LoQ) se presenta en la tabla inferior (LoQ ± SD).

Límite de cuantificación	
	µM en sangre total
NAD+	0,66 ± 0,3
NADH	0,40 ± 0,1

C. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

La precisión de la eficacia del ensayo se ha determinado por la variación de la medición intraanalítica. La tabla inferior presenta la precisión intraanalítica (CV = coeficiente de variación).

Precisión intraanalítica	
	CV (%) ± SD
NAD+	1,48 ± 0,8
NADH	3,33 ± 1,5

La tabla inferior resume los resultados de la reproducibilidad del ensayo (N = número, * 3 alícuotas de la misma mezcla se analizaron tres veces).

Reproducibilidad						
	NAD+			NADH		
Muestra	Ctr1	Ctr2	Ctr3	Ctr1	Ctr2	Ctr3
N de mediciones *	9	9	9	9	9	9
Media (µM)	27,41	29,41	22,00	0,55	0,71	0,64
Desviación estándar	0,62	1,31	0,87	0,03	0,05	0,05
CV (%)	2,28	4,45	3,95	5,20	7,06	8,45

D. PRECISIÓN

La precisión del ensayo se ha calculado a partir de las muestras con una cantidad establecida de NAD+ y NADH puras. La siguiente tabla resume los resultados (precisión del ensayo ± SD).

Precisión (%)		
NAD+	N = 32	97,13 ± 7,6
NADH	N = 25	104,22 ± 16,5

E. CORTE DEL ENSAYO

Los valores de corte máximos y mínimos representan las concentraciones máxima y mínima observadas en el 5-7 % de las personas en un extracto concreto de la población. La siguiente tabla resume los valores de corte.

Valor de corte		
	Bajo	Alto
NAD+ (µM)	20	36
NADH (µM)	0,6	1,8

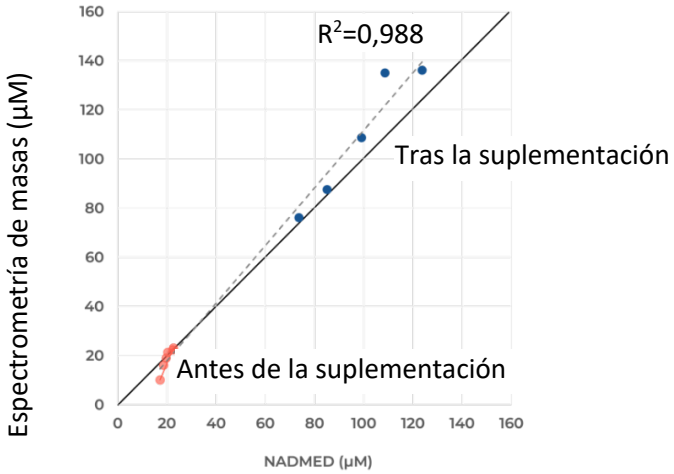
F. CARACTERÍSTICAS DE EFICACIA

La interferencia de otros metabolitos en el extracto no se ha investigado de manera separada ya que su contribución ha sido baja y se ha tenido en cuenta al llevar a cabo el análisis en blanco sin la Enzyme añadida.

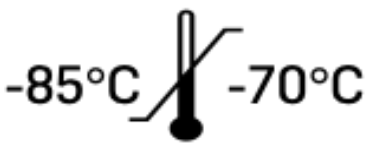
Precaución: La presencia de sorbato potásico, borato, piridina y bismuto en una muestra puede causar la inhibición de la Enzyme y, por tanto, provocar una subestimación de los resultados.

G. COMPARACIÓN DE MÉTODO

Para validar la eficacia de Q-NADMED, se ha medido la concentración de NAD+ en un set de muestras control de sangre humana que también se ha analizado por espectrometría de masas. Las muestras de sangre congeladas de cinco sujetos sanos (antes y después de 16 semanas de suplementación de ácido nicotínico) se han analizado de forma paralela con Q-NADMED y espectrometría de masas. Los resultados de Q-NADMED han coincidido con los obtenidos por la espectrometría de masas.



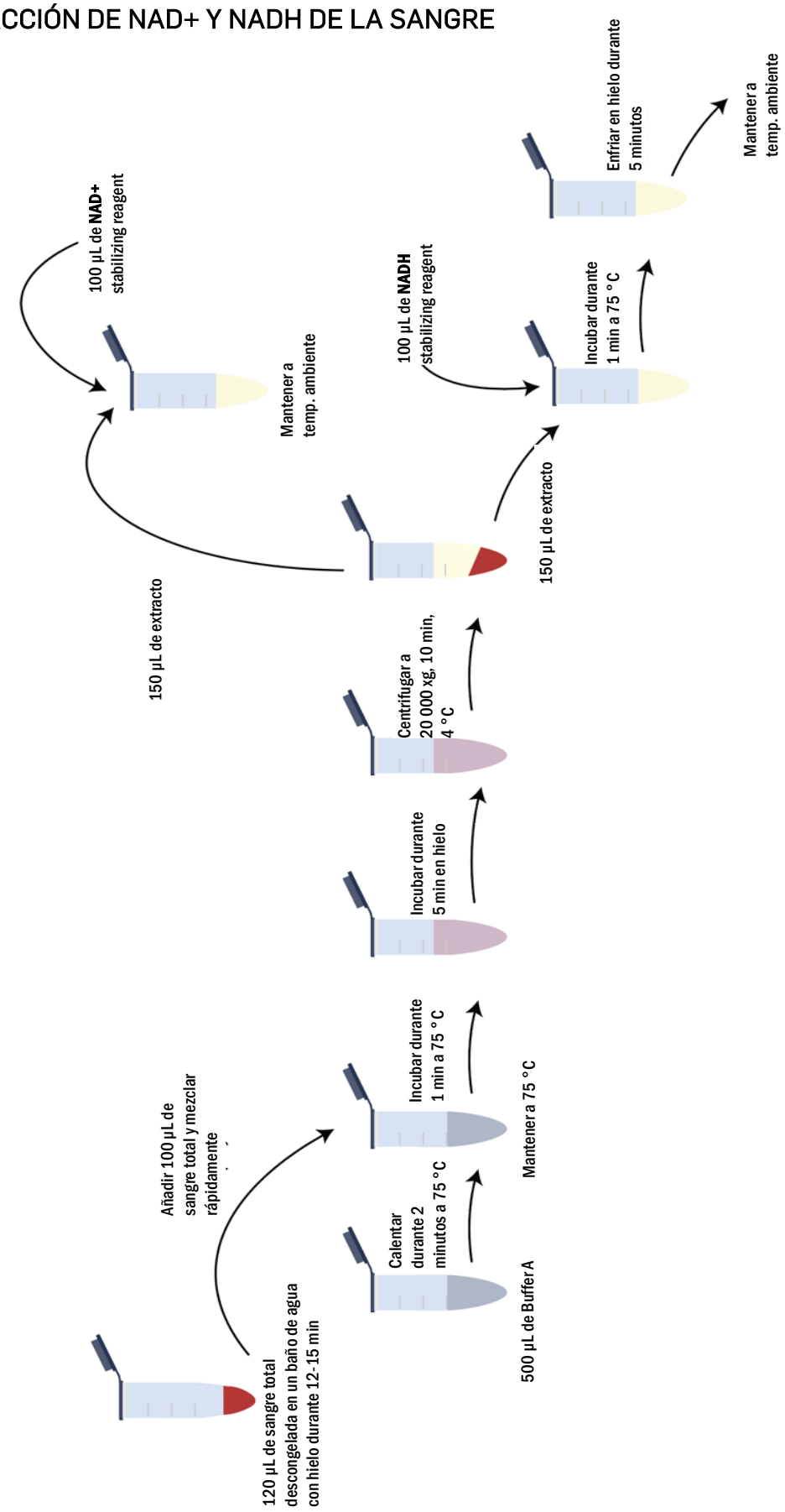
SÍMBOLOS

Símbolo	
	Líquidos y vapores inflamables
	Advertencia/peligro
	Consultar instrucciones de uso
	Fecha de caducidad
	Código
	Número de lote
	Fabricante
	Límite de temperatura

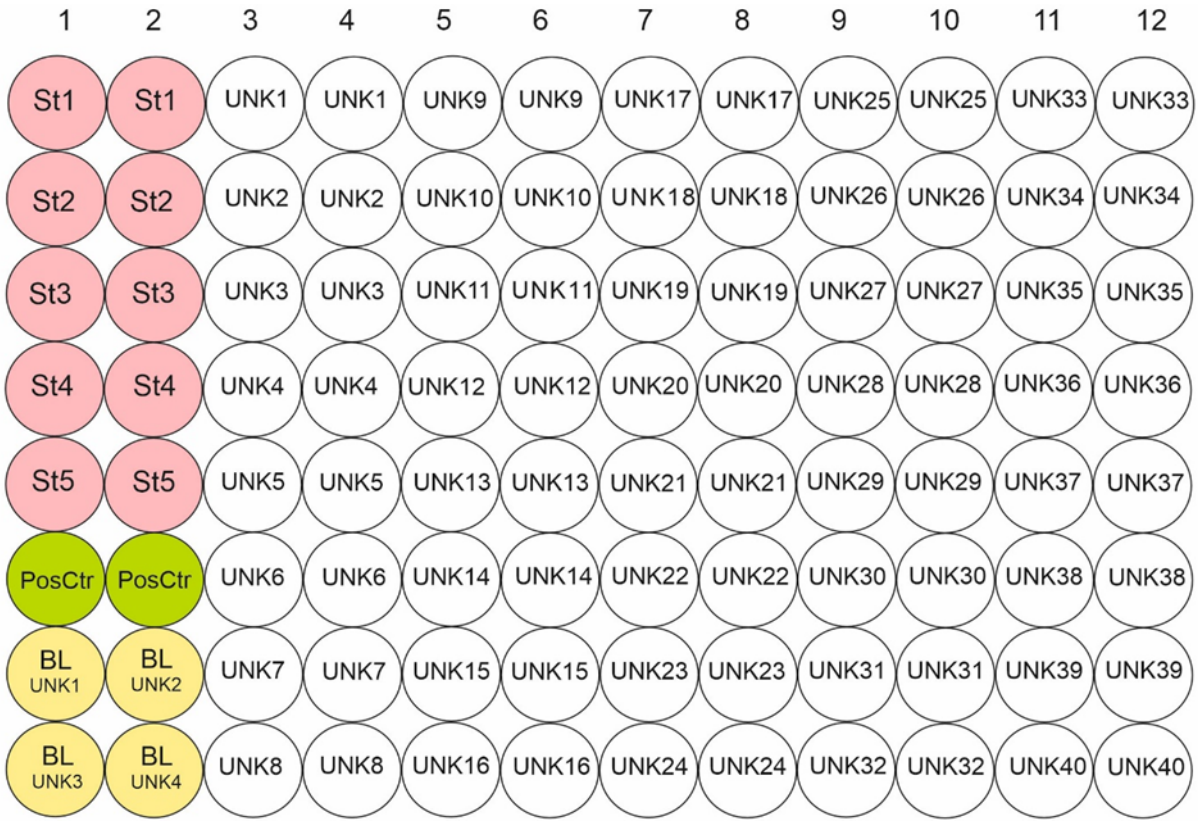
	No usar si el paquete está dañado
	Mantener seco
	Número de reacciones
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Proteger de la luz directa

IMÁGENES ESQUEMÁTICAS

A. EXTRACCIÓN DE NAD+ Y NADH DE LA SANGRE

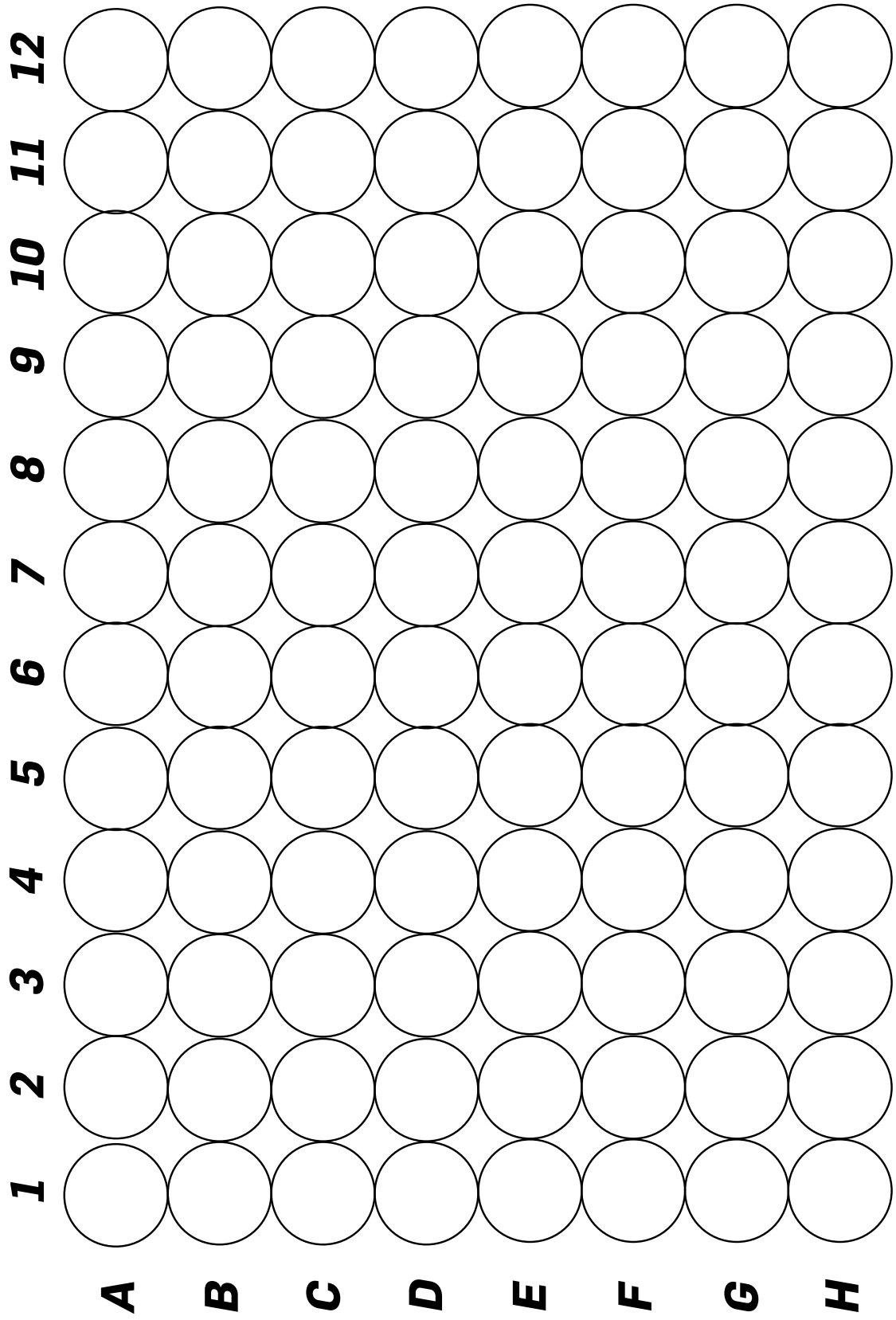


B. DISPOSICIÓN DE PLACA RECOMENDADA PARA LA MEDICIÓN DE NAD+ Y NADH



Disposición de la placa para el ensayo de NAD+ o NADH: St: estándar; BL: blancos con muestras concretas que se usan para la lectura de blancos; UNK: muestras desconocidas, extractos de las muestras estabilizados con una concentración de metabolitos desconocida; PosCtr: control positivo estabilizado. Usar 20 µL de estándar, control positivo y extractos de muestra estabilizados por pocillo. Las muestras en blanco de las primeras cuatro muestras se analizan en la Mezcla maestra sin enzimas añadidas.

NOTAS

DISPOSICIÓN DE LA PLACA

Usar esta disposición de placa para registrar los estándares y las muestras analizadas.