

CE

REF BIO60HEPA
96 Vertiefung Platte



ARGUTUS MEDICAL

HEPKIT[®]-Alpha
Human Alpha GST

Enzymimmunoassay

DEUTSCH

Gebrauchsanweisung

INHALT

VERWENDUNGSZWECK	4
EINLEITUNG	4
TESTPRINZIP	4
BESTANDTEILE DES KITS	5
VORSICHTSMASSNAHMEN	6
STABILITÄT UND LAGERUNG	7
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN	8
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	8
PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG	9
VORBEREITUNG DER PROBEN	9
TESTDURCHFÜHRUNG (1)	10
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE (1)	11
TESTPROTOKOLL BEI MEHRFACHDURCHFÜHRUNG	11
VERKÜRZTE TESTDURCHFÜHRUNG (OHNE KALIBRATIONSKURVE) (2)	12
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE (2)	13
QUALITÄTSKONTROLLKRITERIEN	13
EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS	13

LEISTUNGSDATEN DES TESTS	14
BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE	15
GARANTIE	16
KURZ-ARBEITSANLEITUNG	16
ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE	17
LITERATUR	17

VERWENDUNGSZWECK

Der Argutus Medical HEPKIT[®]-Alpha dient zur quantitativen Bestimmung der alpha-Glutathion-S-Transferase (α GST) im Serum und Natriumheparinisierten Plasma. Zur Bestimmung der α GST im wissenschaftlichen/nicht-klinischen Bereich oder anderer GST-Klassen, wenden Sie sich bitte an Argutus Medical.

EINLEITUNG

In der Leber ist die alpha-Glutathion-S-Transferase in den Hepatozyten lokalisiert, während das Vorkommen der pi-GST (π GST) auf die intrahepatischen Gallengangszellen^{1,2,3} beschränkt ist. Die heterogene Unterklassen Verteilung der GST Isozyme lässt vermuten, dass diese eine einzigartige *in vivo* Funktion in den unterschiedlichen Bereichen der Leber haben und dass der Nachweis von den verschiedenen GST Isozym-Konzentrationen in biologischen Flüssigkeiten einen entscheidenden Nutzen im Monitoring von Zellschäden in den einzelnen Regionen der Leber bringen kann. Gegenwärtig werden Leberfunktionsmessungen anhand von Leberenzymen, wie der Alanin- Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) vorgenommen. Ein Nachteil dieser Enzymmarker ist ihre ungleiche Verteilung in verschiedenen Leberregionen; die periportale Konzentration ist höher als die zentrilobuläre⁴. Die α GST dagegen zeigt eine gleichmäßige Verteilung in beiden Regionen²⁻³. Da die zentrilobulären Hepatozyten bei verschiedenen klinisch relevanten Beschwerden, u.a. Transplantatabstoßung^{5,6,7}, viraler Hepatitis⁸, chronisch-aggressiver Hepatitis⁹ und Lebervergiftungen¹⁰ sehr rasch geschädigt werden können, ist die α GST unter diesen und anderen klinischen Umständen ein empfindlicherer Marker für den Leberstatus.

HEPKIT[®]-Alpha ist ein spezifischer und präziser Enzymimmuntest zur Bestimmung der α GST^{11,12} und wird von Modulatoren der Enzymaktivität, wie Gallensalzen und Billirubin¹¹ nicht beeinflusst. Daher ist es nun möglich, die Quantifizierung der α GST zur Statusbestimmung der Leberzellen von Personen, bei denen die Gefahr einer Leberschädigung besteht, zu nutzen.

TESTPRINZIP

Der Argutus Medical HEPKIT[®]-Alpha ist ein quantitativer Enzymimmuntest. Methodisch basiert der Test auf der schrittweisen Zugabe von Probe, Enzymkonjugat und Substrat in die Wells (Auftragsstellen) einer Mikroassayplatte, die mit anti- α GST-IgG beschichtet sind. Die resultierende Farbintensität ist proportional zur α GST-Konzentration in der Probe. Nachweisbar sind Konzentrationen im Bereich von 1,25 – 40 μ g/L.

BESTANDTEILE DES KITS

- | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------|-----|
| <p>1. Mikroassayplatte, beschichtet mit Antikörpern
12 Mikroassaystreifen.
die mit anti-αGST-IgG beschichtet sind.
GEBRAUCHSFERTIG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">PLA</td> </tr> </table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| <p>2. GST-Kalibrator
Gereinigte αGST in
Stabilisierungspuffer (200μL).
Enthält Thiomersal und Natriumazid.
STAMMLÖSUNG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CLA</td> </tr> </table> | CLA | | |
| CLA | | | | |
| <p>3. Positivkontrolle αGST (in proteinhaltiger
Lösung mit Stabilisatoren (4,5mL).
Enthält Thiomersal und Natriumazid.
GEBRAUCHSFERTIG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONTROL</td> <td style="padding: 5px;">+</td> </tr> </table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| <p>4. Konjugat-Konzentrat
51x anti-αGST-IgG konjugiert an
Meerrettichperoxidase
(HRP) (300μL).
Enthält Thiomersal.
KONZENTRAT</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONJ</td> <td style="padding: 5px;">51X</td> </tr> </table> | CONJ | 51X | |
| CONJ | 51X | | | |
| <p>5. Waschkonzentrat
20x phosphatgepufferte Kochsalzlösung/Tween-20
(PBST, 55mL).
Enthält Thiomersal
KONZENTRAT</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">BUF</td> <td style="padding: 5px;">WASH</td> <td style="padding: 5px;">20X</td> </tr> </table> | BUF | WASH | 20X |
| BUF | WASH | 20X | | |
| <p>6. Substrat
Stabilisierte TMB-Lösung (11mL).
GEBRAUCHSFERTIG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SUBS</td> <td style="padding: 5px;">TMB</td> </tr> </table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| <p>7. Stopplösung
0,5 mol/L Schwefelsäure (11mL).
GEBRAUCHSFERTIG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SOLN</td> <td style="padding: 5px;">STP</td> </tr> </table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| <p>8. Gebrauchsanweisung</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">INS</td> </tr> </table> | INS | | |
| INS | | | | |

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEIT

- Der Argutus Medical HEPKIT® - Alpha ist nur zum in vitro – Gebrauch vorgesehen.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Dieser Testkit enthält Material humanen Ursprungs, das auf Hepatitis B-DNA HCVRNA und HIV-RNA getestet und negativ befundet wurde. Da es jedoch keine absolut sicheren Testmethoden zum Ausschluss von Infektionsträgern gibt, müssen alle patientenproben und Reagenzien als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, das bei Inkorporation Vergiftungen hervorrufen kann.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure, die ätzend ist. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt sofort großzügig mit Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
- Das Substrat enthält TMB und kann zu Reizungen der Haut und Schleimhäute führen. Bei Hautkontakt sofort großzügig mit Wasser spülen.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid, das bei Anreicherung in Blei- und Kupferrohrleitungen explosive Salze bilden kann. Bei der Beseitigung flüssiger Azidabfälle sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden.
- Alle klinischen Proben sowie infiziertes oder potentiell infiziertes Material sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) gehandhabt und beseitigt werden.
- Reste an Chemikalien oder an Präparationsbzw. Kitbestandteilen werden grundsätzlich als gefährlicher Abfall angesehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Während der Handhabung der Proben und der Durchführung des Tests müssen Schutzkleidung, Einweg-Latexhandschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nach der Testdurchführung gründlich die Hände waschen.
- Niemals mit dem Mund pipettieren. Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.

ALLGEMEINES ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- Argutus Medical empfiehlt, dass Anwender für eine optimale Studienkontinuität bei klinischen Testprojekten alle Proben unter Verwendung derselben Kit Charge untersuchen.
- Den Kit oder einzelne Reagenzien nicht nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die aktiven Komponenten des Kits sind als Einheit optimiert. Keine Kitkomponenten mit Komponenten anderer Chargen oder anderer Quellen mischen.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Wird der Test nicht entsprechend den vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen durchgeführt, können die Ergebnisse ungültig sein. Alle Tests, die nicht den Vorgaben entsprechen, müssen wiederholt werden.
- Die Reagenzzugabe sollte am seitlichen Innenrand der Wells erfolgen, ohne diese Stelle mit der Pipettenspitze zu zerkratzen.

- Zu keinem Zeitpunkt der Testdurchführung dürfen die Wells austrocknen.
- Um Kontaminationen zu verhindern, muss für jede Patientenprobe und jedes Reagenz eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Keine Reagenzien einsetzen, die sichtbare Schleier oder Präzipitationen aufweisen.
- Das Waschkonzentrat muss vor der Rekonstitution gut durchmischt werden und darf keine Kristalle enthalten.
- Zur Herstellung der Waschlösung wird destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität benötigt. Wasser minderer Qualität oder kontaminiertes Wasser kann zu erhöhten Hintergrundwerten führen.
- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht und gut gemischt werden.
- Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über 2-8°C aufbewahrt werden.
- Immer saubere Glas- oder Einmalgeräte für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Die Oberfläche der Mikroassaystreifen um die Wells immer tropffrei halten. Nach jedem Arbeitsschritt Streifen rund um die Wells vorsichtig mit Saugpapier trocknen.
- Die Unterseite der Mikroassayplatte muss vor dem Ablesen der Extinktionswerte sauber und trocken sein.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipetierplan mit Plattenschema erstellt werden.

STABILITÄT UND LAGERUNG

1. Alle Reagenzien des Kits sind bei Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.
2. α GST-Kalibratoren müssen innerhalb von 30 Minuten nach der Herstellung verwendet werden.
3. Die Waschlösung (PBST) ist bei Raumtemperatur bis zu zwei Wochen stabil, bei 2-8°C bis zu einem Monat.
4. Eine längere Lagerung von verdünntem Konjugat bei Raumtemperatur sollte vermieden werden; es muss innerhalb von 15 Minuten nach der Herstellung verwendet werden.
5. Die Mikroassaystreifen sollten bis zum Gebrauch zusammen mit Trockenmittel im verschlossenen Beutel bei 2-8°C bleiben. Nicht benötigte Wells zusammen mit Trockenmittel in den Aufbewahrungsbeutel zurücklegen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

1. Mikropipetten (5µL bis 50µL, 50µL bis 200µL und 200µL bis 1000µL) und eine Mehrkanalpipette (50µL bis 200µL)
2. Waschgerät für die Mikroassaystreifen
3. ELISA Plattenreader mit 450nm-Filter und, wenn möglich, einem Referenzwellenlängen-Filter bei 630nm
4. 1L-Becherglas
5. Stoppuhr
6. Reagenzientrog
7. Deionisiertes/Destilliertes Wasser
8. Plattenschüttler
9. Messzylinder
10. Teströhrchen

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. WASCHLÖSUNG (PBST)

Waschkonzentrat 20fach verdünnen, indem man z.B. zu 10mL Waschkonzentrat 190mL deionisiertes Wasser hinzufügt. Nur das benötigte Volumen ansetzen. Das Konzentrat darf keine Salzkristalle enthalten. (Eventuell vorhandene Kristalle vor der Verdünnung durch vorsichtiges Erwärmen des Konzentrats bei 37°C für 30 Minuten lösen.)

2. KALIBRATOREN

Aus der αGST-Stammlösung den Kalibrator (A) mit der Konzentration 40µg/L wie folgt herstellen:

Stammlösung:	25µL
Waschlösung:	<u>2500µL</u>
Gesamtmenge:	2525µL (A)

Mithilfe beschrifteter Röhrchen werden die weiteren Kalibratoren wie folgt hergestellt:

Kalibrator	Kalibratorlösung (µL)	Waschlösung Volumen (µL)
40µg/L (A)	500 (A)	-
20µg/L (B)	500 (A)	500
10µg/L (C)	500 (B)	500
5µg/L (D)	500 (C)	500
2,5µg/L (E)	500 (D)	500
1,25µg/L (F)	500 (E)	500
0µg/L (G)	-	500

3. KONJUGAT

Erst unmittelbar vor Gebrauch das Konjugat-Konzentrat 1/51 verdünnen, indem man pro Mikroassaystreifen 20µL Konjugat-Konzentrat zu 1mL Waschlösung gibt. Jeder Streifen erfordert 1020µL des vorbereiteten Konjugats.

PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG

Serumproben sollten bei längerer Lagerung bei –20°C aufbewahrt werden. Serum, das bis zu 15 Monate bei –20°C gelagert wurde, zeigte keine Änderungen in der αGST-Konzentration. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte aber vermieden werden, um αGST-Verluste zu verhindern. Zwischen natriumheparinisiertem Plasma und Serum wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Wiederfindung der αGST beobachtet.

VORBEREITUNG DER PROBEN

Unmittelbar vor der Durchführung des Tests müssen die Patientenproben 1/5 verdünnt werden, indem man zu 200µL Waschlösung 50µL Probe gibt. Sollen mehr als 10 Doppelbestimmungen durchgeführt werden, wird zur Vereinfachung dieser Prozedur eine unbeschichtete Mikroassayplatte zur Vorverdünnung empfohlen. Die Positivkontrolle muss nicht verdünnt zu werden.

TESTDURCHFÜHRUNG (1)

HINWEIS: Alle Reagenzien sollten vor Durchführung des Tests Raumtemperatur erreicht haben.

1. INKUBATION DER PROBEN /KALIBRATOREN

- 1.1 Waschlösung und Kalibratoren herstellen wie unter "Vorbereitung der Reagenzien" beschrieben.
- 1.2 Patientenproben verdünnen wie unter "Vorbereitung der Proben" beschrieben.
- 1.3 Die benötigte Anzahl an Wells in die Mikroassayplatte einsetzen (14 für die Kalibratoren plus jeweils zwei pro Kontrolle und Probe). Die Wells sollten immer in 8er Reihen eingesetzt werden. Kalibratoren (**G-A; äquivalente Konzentration 0-40µg/L**), Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) jeweils paarweise zu der Mikroassayplatte geben.
- 1.4 Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **60 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
HINWEIS: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.

2. INKUBATION MIT KONJUGAT

- 2.1 Nach **55 Minuten** Konjugat vorbereiten, wie unter "Vorbereitung der Reagenzien" beschrieben.
- 2.2 Abdeckung abnehmen und jeden Streifen 4mal mit Waschlösung (**250µL-350µL/Well**) waschen. Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig ausklopfen, bis die restliche Waschlösung aus allen Wells entfernt ist.
HINWEIS: Sowohl manuelles als auch automatisches Waschen ist möglich.
- 2.3 **100µL** Konjugat/Well zugeben.
- 2.4 Die Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **30 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
HINWEIS: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.
- 2.5 Jeden Streifen waschen wie unter Punkt 2.2 beschrieben.

3. FARBENTWICKLUNG

- 3.1 Mit einer Mehrkanalpipette **100µL** Substrat pro Vertiefung zugeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln genau **15 minuten** lang inkubieren.

4. STOPP

- 4.1 Die Reaktion mit **100µL** Stopplösung/Well (Mehrkanalpipette) abstoppen. Substrat und Stopplösung müssen sich vollständig vermischen.
- 4.2 **Sofort** Extinktion bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm (sofern vorhanden) messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE (1)

1. Mittelwerte der Extinktionswerte jedes Kalibrators, Probe und Kontrolle berechnen.
2. Aus den Kalibratorwerten eine Kalibrationskurve erstellen: $E_{450/630nm}$ vs $[\alpha\text{GST}]$ in $\mu\text{g/L}$. Die Kurve sollte eine ähnliche Form haben wie in Abbildung 1 gezeigt.
3. Anhand der Extinktionsmittelwerte der Proben die $[\alpha\text{GST}]$ in $\mu\text{g/L}$ der jeweiligen Proben aus der Kalibrationskurve ablesen.
4. Die abgelesenen $[\alpha\text{GST}]$ -Werte mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multiplizieren, um die tatsächlichen αGST Konzentrationen in den Patientenproben zu erhalten.
5. Die Konzentration der Positivkontrolle kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.
6. Probenkonzentrationen mit Messwerten außerhalb der Standardkurve sind ungültig und müssen mit einem höheren Verdünnungsfaktor wiederholt werden. Es ist nicht zulässig, Daten zu extrapolieren.

TESTPROTOKOLL BEI MEHRFACHDURCHFÜHRUNG

Wurde nach erfolgreicher Testdurchführung einmal eine Kalibrationskurve erstellt, ist es unter bestimmten Voraussetzungen möglich, weitere Patientenproben anhand dieser Kalibrationskurve zu analysieren (siehe "Verkürzte Testdurchführung (2)"), wenn die gleiche Mikroassayplatte und die gleichen Kitkomponenten benutzt werden. Um eine optimale Interassay-Reproduzierbarkeit zu erzielen, müssen folgende Anweisungen befolgt werden:

1. Die weiteren Analysen müssen auf der gleichen EIA-Platte und mit den gleichen Kitkomponenten durchgeführt werden, die zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet wurden.
2. Die Kalibrationskurve ist nur für weitere Ansätze gültig, die innerhalb von 21 Tagen nach ihrer Erstellung durchgeführt werden. Nach 21 Tagen muss eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.
3. **TEMPERATUR** und **INKUBATIONSZEITEN** der Folgeanalysen müssen mit denen, die zur Erstellung der Kalibrationskurve (siehe "Standard-Testdurchführung") dienten, identisch sein. Sowohl für die erstmalige Standard-Testdurchführung als auch die folgenden Testdurchführungen wird ein Brutschrank empfohlen.
4. Die Positivkontrolle des HEPKIT®-Alpha muss zur Kontrolle der Interassay-Reproduzierbarkeit bei jeder Testdurchführung mitbestimmt werden.
5. Es wird empfohlen, alle zu bestimmenden Proben paarweise zu messen. Dies gilt auch für die Positivkontrolle.
6. Nach der Durchführung des Tests sollten die αGST -Konzentrationen in den Proben wie unter "Berechnung der Ergebnisse (2)" beschrieben, berechnet werden.

VERKÜRZTE TESTDURCHFÜHRUNG (OHNE KALIBRATIONSSTREIFEN) (2)

HINWEIS: (1) Vor Beginn der Testdurchführung sollten alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. (2) **TEMPERATUR** und **INKUBATIONSZEITEN** müssen identisch zu denen sein, die zur Erstellung der Kalibrationskurve geführt haben (siehe oben "Standard- Testdurchführung"). **Die Verwendung eines Brutschanks wird empfohlen.**

1. INKUBATION DER PROBEN

- 1.1. Waschlösung herstellen wie unter "Vorbereitung der Reagenzien" beschrieben.
- 1.2. Patientenproben verdünnen wie unter "Vorbereitung der Proben" beschrieben.
- 1.3. Die benötigte Anzahl an Wells in die Mikroassayplatte einsetzen (jeweils zwei pro Kontrolle und Probe). Die Wells sollten immer in 8er-Reihen eingesetzt werden. Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) jeweils paarweise zu der Mikroassayplatte geben.
- 1.4. Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **60 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
HINWEIS: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.

2. INKUBATION MIT KONJUGAT

- 2.1. Nach 55 Minuten Konjugat ansetzen wie unter "Vorbereitung der Reagenzien" beschrieben.
- 2.2. Abdeckung abnehmen und jeden Streifen 4mal mit Waschlösung (**250µL-350µL/Well**) waschen. Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig ausklopfen, bis die restliche Waschlösung aus allen Wells entfernt ist.
HINWEIS: Sowohl manuelles als auch automatisches Waschen ist möglich.
- 2.3. **100µL** Konjugat/Well zugeben.
- 2.4. Die Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **30 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
HINWEIS: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.
- 2.5. Jeden Streifen waschen wie unter Punkt 2.2 beschrieben.

3. FARBENTWICKLUNG

- 3.1. **100µL** Substrat/Well mit einer Multikanalpipette zugeben und bei Raumtemperatur genau **15 Minuten** inkubieren.

4. STOPP

- 4.1. Die Reaktion mit **100µL** Stopplösung/Well abstoppen. Substrat und Stopplösung müssen sich vollständig vermischen.
- 4.2. Sofort Extinktion bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm (sofern vorhanden) messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE (2)

1. Von jeder Probe und Kontrolle die mittlere Extinktion berechnen.
2. Aus den Extinktionsmittelwerten der Proben anhand der bereits mit der gleichen Platte und den gleichen Komponenten erstellten Kalibrationskurve die $[\alpha\text{GST}]$ in $\mu\text{g/L}$ ablesen.
3. Die abgelesenen $[\alpha\text{GST}]$ -Werte mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multiplizieren, um die tatsächlichen αGST Konzentrationen in den Patientenproben zu erhalten.
4. Die Konzentration der Positivkontrolle kann direkt aus der Kalibrationskurve abgelesen werden.
5. Probenkonzentrationen mit Messwerten außerhalb der Standardkurve sind ungültig und müssen mit einem höheren Verdünnungsfaktor wiederholt werden. Es ist nicht zulässig, Daten zu extrapolieren.

QUALITÄTSKONTROLLKRITERIEN

Die Positivkontrolle muss bei jedem Test mitbestimmt werden, um die Gültigkeit der Ergebnisse bewerten zu können. Die Ergebnisse gelten als gültig, wenn die Werte der Positivkontrolle innerhalb des auf dem Packungsdeckel angegebenen Wertebereichs liegen. Wird dieses Kriterium nicht erfüllt, gilt der Test als ungültig und muss wiederholt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

Die Ergebnisse dieses Tests müssen mit dem klinischen Profil des Patienten und weiteren Laborergebnissen in Beziehung gesetzt werden.

LEISTUNGSDATEN DES TESTS

REFERENZBEREICH

Die Referenzbereiche für die α GSTKonzentration in gesunden Personen wurden in vielen Studien bestimmt. Laut der von Rees G. W *et al*¹¹ durchgeführten Studie, an der eine Population aus 219 gesunden Blutspendern teilnahm, beträgt die obere Grenze des Referenzbereichs (logarithmischer Mittelwert + 2 SD) 11,4 μ g/L. Argutus Medical empfiehlt allen Laboratorien, eigene Referenzbereiche festzulegen.

NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze des Argutus Medical HEPKIT[®]-Alpha liegt bei 0,05 μ g/L pro Microassay-Well bzw. Bei 0,25 μ g/L pro Probe.

MESSBEREICH

Die Kalibrationskurve umfasst den Bereich 1,25 - 40 μ g/L, d.h. in den 1/5 mit Waschlösung verdünnten Proben können Konzentrationen im Bereich 6,25 - 200 μ g/L α GST bestimmt werden. Dieser Bereich kann durch eine höhere Probenverdünnung erweitert werden.

SPEZIFITÄT

Der HEPKIT[®]-Alpha ist ein hochspezifischer Test zum α GST-Nachweis. Mit den Isoformen mu- oder pi-GST wurden weder im EIA noch im Immunoblot signifikante Kreuzreaktion beobachtet.

BEEINFLUSSUNG

Mit lipämischen, hämolytischen oder ikterischen Proben wurde keine wesentliche Beeinflussung dieses Tests beobachtet. Lipämie*: Weniger als 10% Beeinflussung bei Konzentrationen bis zu 1000IU pro Probe. Hämolyse: Weniger als 10% Beeinflussung bei Konzentrationen bis zu 1,17g/L Hämoglobin in der Probe. Ikterus: Weniger als 11% Beeinflussung bei Konzentrationen bis zu 5mg/mL Bilirubin in der Probe. *Testdurchführung mit Intralipid 20% von Fresenius. Plasmaproben, die in Röhrchen gesammelt wurden, die EDTA oder Lithium-Heparin als Antikoagulanzen enthielten, stören den Test. Interne Studien haben gezeigt, dass Proben mit extrem hoher Konzentration an Rheumafaktoren diesen Test ebenfalls stören können. Wenden Sie sich bitte zwecks weiterer Informationen an Argutus Medical.

REPRODUZIERBARKEIT

Tabelle 1: Intraassay-Variation des HEPKIT[®]-Alpha

Probe	[αGST] μg/L	SD	%CV	n
Niedrig	0,79	0,12	15,3	20
Mittel	56,05	3,6	6,42	20
Hoch	154,72	20,26	13,09	20

Tabelle 2: Interassay-Variation des HEPKIT®-Alpha bei jeweils vollständiger Standardtestdurchführung

Probe	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Niedrig	1,03	0,25	24,41	10
Mittel	51,54	5,81	11,27	10
Hoch	135,41	34,07	25,16	10
PC	12,84	1,12	8,68	10

Tabelle 3: Variationsbreite zwischen einzelnen Chargen des HEPKIT®- Alpha, berechnet anhand von drei verschiedenen Chargen des Kits

Sample	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Niedrig	0,94	0,23	24,45	30
Mittel	53,63	5,51	10,27	30
Hoch	141,81	25,72	18,14	30

BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE

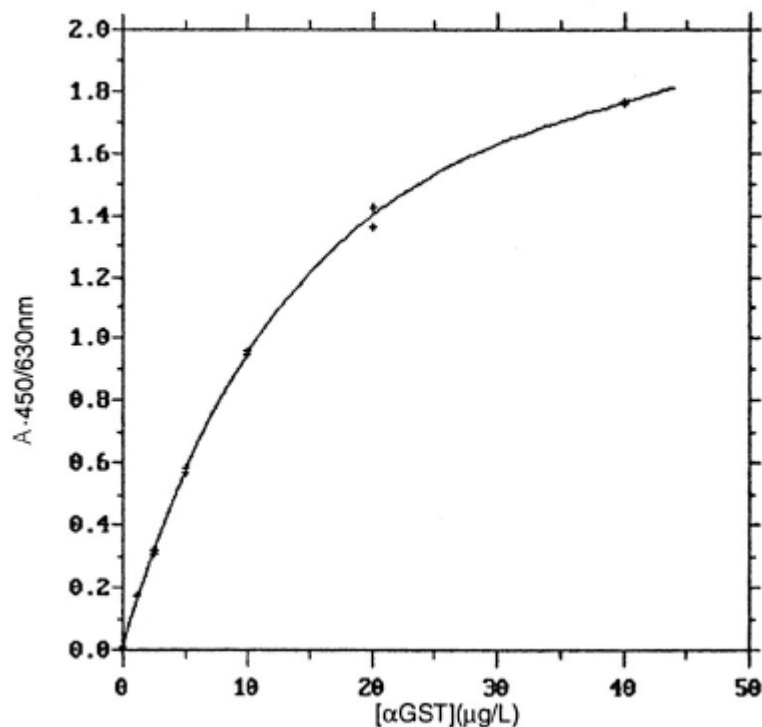


Abbildung 1: Typische Kalibrationskurve des Argutus Medical HEPKIT®-Alpha. Auftragung der Extinktion $E_{450/630\text{nm}}$ versus $[\alpha\text{GST}]$ in $\mu\text{g/L}$, Messbereich 1,25 - 40 $\mu\text{g/L}$ αGST .

GARANTIE

Die hier präsentierten Leistungsdaten wurden mit der hier beschriebenen Durchführung erhalten. Jede Änderung oder Modifikation der Durchführung, die nicht von Argutus Medical empfohlen wird, kann die Ergebnisse beeinträchtigen. In diesem Falle erkennt Argutus Medical alle erklärten, stillschweigend miteinbegriffenen gesetzlichen Garantien nicht an, einschließlich der Vermarktung und der Tauglichkeit für den Gebrauch. Argutus Medical übernimmt dann für direkte und folgende Schäden keine Haftung.

KURZ-ARBEITSANLEITUNG

1. INKUBATION VON PROBEN /KALIBRATOREN

- 1.1 Herstellung der Waschlösung und der Kalibratoren
- 1.2 Vorbereitung der Patientenproben.
- 1.3 Wells in die Mikroassayplatte einsetzen. Kalibratoren, Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) in die Wells geben; jeweils Duplikate ansetzen.
- 1.4 Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **60 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.

2. INKUBATION MIT KONJUGAT

- 2.1 Nach 55 Minuten Konjugat vorbereiten wie unter "Vorbereitung der Reagenzien" beschrieben.
- 2.2 Abdeckung entfernen und jeden Streifen 4mal mit Waschlösung (**250µL-350µL/Well**) waschen.
- 2.3 **100µL** Konjugat/Well zugeben.
- 2.4 Die Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) für **30 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
- 2.5 Streifen wie unter Punkt 2.2 beschrieben waschen.

3. FARBENTWICKLUNG





- 3.1 Je **100 µL** Substrat/Well zugeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für **genau 15 Minuten** inkubieren.

4. STOPP

- 4.1 Die Reaktion mit **100µL** Stopplösung/Well abstoppen. Substrat und Stopplösung müssen sich vollständig vermischen.
- 4.2 Sofort Extinktion bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm (sofern vorhanden) messen.

5. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE

Bereich der Positivkontrolle	<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>+</td><td>...</td></tr></table>	CONTROL	+	...
CONTROL	+	...		
Diagnostisches <i>In-vitro-Medizingerät</i>	<table border="1"><tr><td>IVD</td></tr></table>	IVD		
IVD				
Chargenbezeichnung	<table border="1"><tr><td>LOT</td></tr></table>	LOT		
LOT				
Katalognummer	<table border="1"><tr><td>REF</td></tr></table>	REF		
REF				
Temperaturspanne				
Verwendbar bis				
Hersteller				
Biologische Gefahr				

LITERATUR

1. **Campbell, J.A.H. et al.** (1991). Immunohistologic localisation of alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in human tissues. *Cancer (Philadelphia)* **67**, 1608 - 1613.
2. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1993). Immunohistochemical localisation of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacology and Toxicology* **72**, 321-331.
3. **Manning, F. et al.** (1995). Argutus Medical International Internal Research.
4. **Beckett, G. J. and Hayes, J.D.** (1993) Glutathione S-transferases: Biomedical Applications. *Advances in Clinical Chemistry* **30**, 281-380.
5. **Trull, A.K. et al.** (1994). Serum α -glutathione S-transferase: a sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation* **58**, (12), 1345-51.
6. **Platz, K.-P. et al.** (1997) Determination of pi-glutathione-S-transferase will improve monitoring after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* **29**, 2827-2829.
7. **Hughes, V.F. et al.** Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum α -glutathione S-transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* **64**, 1446-1452.
8. **Nelson D.R. et al.** (1995). α -glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Clin. Pathol.* **104**; 193-198.
9. **Norris, S. et al.** (1994). Serum α -GST as an early indicator of disease relapse following treatment withdrawal in autoimmune CAH. *Hepatology* **20**;4:Pt. 2.
10. **Murray, J. M. et al.** (1992). Indocyanine green clearance and hepatic function during and after prolonged anaesthesia: Comparison of halothane with isoflurane. *Br. J. Anaesth.* **68**, 168-171.
11. **Rees, G.W. et al.** (1995). Validation of an enzyme immunoassay for the detection of α -glutathione S-transferase in human serum. *Ann. Clin. Biochem.* **32** 575-583.
12. **Doyle, S. et al.** (1994). Detection of serum α -glutathione S-transferase by enzyme immunoassay. International Symposium on Liver and Drugs, Bratislava, Slovakia.



ARGUTUS MEDICAL

**Argutus Medical Ltd.,
Unit 9 Trinity Technology & Enterprise Campus,
Pearse Street, Dublin 2, Ireland**

Tel: +353 1 670 8576

Fax: +353 1 670 8575

info@argutusmed.com

<http://www.argutusmed.com>

USA Patent No. 5217868
European Patent no. 640145
Other Patents Pending
Document Code: HEPA-124-DE-09
03/09