

CE

REF BIO60HEPA
Plat De 96 Puits



ARGUTUS MEDICAL

HEPKIT®-Alpha
Human Alpha GST

Immunoenzymatique

FRANÇAIS

Mode d'emploi

TABLE DES MATIERES

OBJET	4
CONTEXTE CLINIQUE	4
PRINCIPE DU DOSAGE	4
COMPOSITION DU COFFRET	5
PRECAUTIONS D'EMPLOI	6
STABILITE ET CONSERVATION	7
MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI	7
PREPARATION DES REACTIFS	8
PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS	9
PREPARATION DES ECHANTILLONS	9
MODE OPERATOIRE COMPLET (1)	10
CALCUL DES RESULTATS (1)	11
DOSAGES REPETITIFS: CONDITIONS PARTICULIERES	11
MODE OPERATOIRE ABREGE (2)	12
CALCUL DES RESULTATS (2)	13
CONTRÔLE DE QUALITÉ	13

LIMITES DU TEST	13
PERFORMANCE	14
EXEMPLE DE COURBE DE CALIBRATION	15
RESPONSABILITE	16
RESUME DU MODE OPERATOIRE	16
INTERPRÉTATION DES SYMBOLES	17
BIBLIOGRAPHIE	17

OBJET

La trousse Argutus Medical HEPKIT®-Alpha permet la détermination quantitative de l'alpha glutathion S-transférase (α GST) dans le sérum et dans le plasma sur tube d'héparinate de sodium. Pour toute information relative à l'utilisation du test α GST en recherche ou au dosage des autres classes de GST, veuillez contacter Argutus Medical.

CONTEXTE CLINIQUE

Dans le foie, l'alpha glutathion S-transférase ne se retrouve que dans les hépatocytes, tandis que l'isoforme Pi (π GST) est localisée dans les cellules épithéliales des canaux biliaires^{1,2,3}. Cette répartition hétérogène des GST indique que ces isoenzymes ont *in vivo* des fonctions distinctes dans des régions différentes au sein du foie, et que l'analyse quantitative des isoenzymes GST dans les liquides biologiques pourrait être d'une remarquable utilité dans la surveillance spécifique des fonctions hépatiques diverses. En général, la fonction hépatique est analysée à l'aide de la mesure d'enzymes telles que l'Alanine Aminotransférase (ALT) et l'Aspartate Aminotransférase (AST). L'inconvénient de ces indicateurs est qu'ils ne sont pas répartis uniformément dans tout le foie, leur concentration périportale étant plus grande que dans la région centrolobulaire⁴. Par contre, l' α GST est caractérisée par sa répartition homogène aussi bien dans la région centrolobulaire que périportale²⁻³.

Comme la lésion des hépatocytes centrolobulaires s'observe au cours de nombreux processus pathologiques tels que le rejet de l'allogreffe⁵⁻⁷, l'hépatite virale⁸, l'hépatite chronique en activité⁹ et les atteintes toxiques¹⁰, l' α GST pourrait être un indicateur plus sensible que les autres dans ces situations cliniques.

PRINCIPE DU DOSAGE

Argutus Medical HEPKIT®-Alpha est une technique immunoenzymatique quantitative. Le principe repose sur l'addition successive d'un échantillon, du conjugué enzymatique et du substrat dans les puits enduits d'IgG anti- α GST. L'intensité de la coloration qui en résulte est proportionnelle à la quantité d' α GST présente dans l'échantillon. La gamme standard est comprise entre 1,25-40 μ g/L.

COMPOSITION DU COFFRET

- | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------|-----|
| <p>1. Plaque ELISA enduite
Microcupules sécables en puits individuel
sensibilisées avec des IgG polyclonales de lapin
anti-αGST humaine et purifiées par affinité.
12 barrettes de 8 cupules sécables.
PRET A L'EMPLOI</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">PLA</td> </tr> </table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| <p>2. αGST Standard
αGST humaine purifiée dans du tampon stabilisant (200μL).
Contient du Thimérosal et de l'azide de sodium.
SOLUTION MERE</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CAL</td> </tr> </table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| <p>3. Contrôle positif
Solution d'αGST humaine contenant protéines (4,5ml).
Contient du Thimérosal et de l'azide de sodium.
PRET A L'EMPLOI</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONTROL</td> <td style="padding: 5px;">+</td> </tr> </table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| <p>4. Conjugué concentré
51X. IgG anti-αGST conjuguées à la
péroxyde de Raifort (300μL).
Contient du Thimérosal.
CONCENTRE</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONJ</td> <td style="padding: 5px;">51</td> </tr> </table> | CONJ | 51 | |
| CONJ | 51 | | | |
| <p>5. Tampon de dilution/lavage concentré 20x
Phosphate buffered saline/Tween-20 (PBST 55mL).
Contient du Thimérosal.
CONCENTRE</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <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
Solution de tétraméthylbenzidine
(TMB), stabilisants (11mL).
PRET A L'EMPLOI</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SUBS</td> <td style="padding: 5px;">TMB</td> </tr> </table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| <p>7. Solution d'arrêt
0,5 mol/L d'acide sulfurique (11mL).
PRET A L'EMPLOI</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SOL</td> <td style="padding: 5px;">STP</td> </tr> </table> | SOL | STP | |
| SOL | STP | | | |
| <p>8. Notice d'utilisation</p> | <table border="1" style="margin-left: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">INS</td> </tr> </table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUTIONS D'EMPLOI

SECURITE

- Pour usage diagnostique in-vitro seulement.
- La trousse Argutus Medical HEPKIT®-Alpha est uniquement destinée à une utilisation par le personnel de laboratoire qualifié.
- Ce kit contient des produits d'origine humaine qui ont été testés négatifs à l'ARN VIH, l'ARN Hépatite C, l'ADN Hépatite B, l'antigène de surface Hépatite B et les anticorps du HCV des VIH1 et VIH2. Cependant ils doivent être manipulés comme des produits infectieux.
- Certains réactifs contiennent du Thimérosal qui peut être toxique par ingestion.
- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique qui est corrosif. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement avec de l'eau et consulter un médecin.
- Le substrat contient du TMB (irritant pour la peau et les muqueuses). En cas de contact avec la peau, rincer avec de l'eau.
- Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium, qui peut former des azides métalliques potentiellement explosifs dans les tuyauteries en plomb ou en cuivre. Au moment de leur élimination, ces réactifs devront être rincés avec de grands volumes d'eau pour éviter l'accumulation de l'azide.
- Eliminer tous les échantillons cliniques ainsi que le matériel contaminé ou potentiellement contaminé en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Tout élément doit être manipulé comme potentiellement infectieux.
- Tous les résidus de réactifs, préparations ou produits chimiques doivent être considérés comme dangereux. Il est indispensable de les éliminer selon les procédures standard de sécurité.
- Porter des vêtements protecteurs, des gants jetables stériles en latex, et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et de la réalisation du test. Se laver les mains après l'utilisation des réactifs.
- Ne pas pipeter avec la bouche, et ne jamais manger ou boire à la paille de laboratoire.

PROCEDURE

- Pour les projets d'étude clinique, Argutus Medical recommande aux utilisateurs d'analyser tous les échantillons en utilisant le même numéro de lot de kit pour une uniformité optimale de l'étude.
- Ne pas utiliser de kit ou de réactif après la date de péremption.
- Ne pas utiliser ensemble des réactifs de lots différents.
- Des modifications du protocole peuvent conduire à des résultats erronés.
- La réalisation du test sans le respect des températures et temps indiqués peut conduire à des résultats erronés. Dans ce cas, le dosage devra impérativement être répété.
- L'ajout de réactif doit se faire au centre du puits, en prenant soin de ne pas érafler les côtés du puits avec le cône.
- Ne jamais laisser les puits se dessécher durant la manipulation.
- Eviter toute contamination inter-réactifs ou inter-puits et changer de cône à usage unique pour chaque échantillon et composant.
- Ne pas utiliser une solution trouble ou présentant un précipité.

- De l'eau distillée ou désionisée de bonne qualité est nécessaire pour obtenir un bon tampon de lavage. L'utilisation d'eau de mauvaise qualité ou présentant une contamination peut conduire à un bruit de fond élevé pour le dosage.
- Laisser les réactifs atteindre la température ambiante (20-25°C) et bien mélanger avant l'usage.
- Eviter de laisser les réactifs sous une lumière forte et/ou à une température >2-8°C pendant une longue période.
- N'utiliser que des tubes et pipettes de laboratoire propres, et de préférence à usage unique pour chaque préparation de réactif.
- Eviter la formation de gouttelettes à la surface des puits. Les gouttes doivent être soigneusement essuyées à la fin de la procédure.
- S'assurer que le fond de la plaque est propre et sec avant lecture des résultats.
- Etablir un plan d'identification et de distribution avant de commencer la manipulation.

STABILITE ET CONSERVATION

1. L'ensemble des réactifs doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.
2. La gamme d'étalonnage d' α GST doit être utilisée dans les 30 minutes suivant sa préparation.
3. La solution de lavage préparée (PBST) est stable pendant deux semaines à température ambiante ou pendant un mois à 2-8°C.
4. Eviter la conservation prolongée du conjugué dilué à la température ambiante. Il doit être utilisé dans les 15 minutes suivant sa préparation.
5. Microplaque Les micropuits doivent toujours être conservés dans le sachet étanche, avec le dessicatif à 2-8°C. Remettre rapidement au réfrigérateur les micropuits non utilisés dans leur sachet de conservation avec le dessicatif.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Pipettes automatiques (5-50 μ L ; 50-200 μ L ; 200-1000 μ L) et une multipipette (50-200mL).
2. Laveur automatique ou matériel de lavage manuel adapté.
3. Lecteur de microplaques à 450nm avec longueur d'onde de référence à 630nm.
4. Bécher de 1 litre.
5. Chronomètre.
6. Bain - marie
7. Eau désionisée ou distillée de bonne qualité.
8. Agitateur pour microplaques.
9. Eprouvettes graduées.
10. Tubes à essais.

PREPARATION DES REACTIFS

1. Solution de lavage/dilution (PBST)

Diluer la solution (PBST) concentrée au 1/20. Ajouter, par exemple, 10mL de la solution (PBST) concentrée dans 190mL d'eau désionisée. Préparer seulement le volume nécessaire pour le dosage. **S'assurer de l'absence de cristaux avant la dilution** (réchauffer le flacon à 37°C en cas de présence de cristaux).

2. STANDARDS

Préparer le Standard (A) à partir de la solution mère d'αGST de la manière suivante :

Solution mère :	25μL
Solution de lavage :	<u>2500μL</u>
Total :	2525μL (A)

Utiliser des tubes numérotés pour préparer la gamme d'étalonnage selon le protocole décrit ci-dessous :

Concentration correspondant au standard	Volume du standard (μL)	Volume de la solution lavage (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. CONJUGUE

Diluer extemporanément le conjugué enzymatique concentré au 1/51ème en ajoutant 20μL dans 1mL de la solution de lavage pour chaque microbarrette. Utiliser pour chaque bande 1 020μL de conjugué préparé.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Pour une conservation prolongée, les échantillons de sérum sont à stocker à -20°C. Aucun changement du taux d'αGST n'a été observé dans le sérum après 15 mois de conservation à -20°C. Eviter les congélations/décongélations répétées des échantillons pour prévenir la perte en αGST. Aucune différence significative n'a été observée entre la récupération d'αGST dans le plasma sur tube d'héparinate de sodium et le sérum.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Diluer chaque échantillon au 1/5 immédiatement avant le dosage. Par exemple, ajouter 50µL d'échantillon dans 200µL de tampon PBST. Si les échantillons à doser sont nombreux (>10 en double exemplaire), pour faciliter le transfert de ceux-ci sur la plaque de dosage, la dilution des échantillons peut être effectuée sur une microplaque vierge. La dilution n'est pas requise pour le contrôle positif.

MODE OPERATOIRE COMPLET (1)

REMARQUE: Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante avant le dosage.

1. INCUBATION DES ECHANTILLONS ET DES STANDARDS

- 1.1 Préparer la solution de lavage et les standards (Voir § Préparation des réactifs).
- 1.2 Préparer les échantillons (Voir § Préparation des échantillons).
- 1.3 Placer le nombre nécessaire de micropuits sur la plaque de dosage (14 pour les standards et 2 pour chacun des contrôles et des échantillons) et remplir les espaces dans les colonnes avec les micropuits vierges. Ajouter les standards (**G-A ; concentrations de 0 à 40µg/L**), le contrôle positif et les échantillons dilués (**100µL/puits**), en double exemplaire, sur la microplaque.
- 1.4 Couvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **60 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.
Remarque: un agitateur de microplaque Lab-Line "Titer-Plate" a été utilisé à la vitesse 2-3.

2. INCUBATION DU CONJUGUE

- 2.1 Après 55 minutes, préparer le conjugué (Voir § Préparation du conjugué).
- 2.2 Vider la plaque par retournement et laver 4 fois chaque barrette avec la solution de lavage (**250-350µL/puits**). Puis taper fermement la plaque retournée contre un papier absorbant pour éliminer complètement la solution de lavage.
Note: Le lavage peut être automatique ou manuel.
- 2.3 Ajouter le conjugué (**100µL/puits**) sur la plaque.
- 2.4 Recouvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **30 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.
Remarque: un agitateur de microplaque "Titer-Plate" a été utilisé à la vitesse 2-3.
- 2.5 Laver la plaque comme indiqué § 2.2.

3. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1 Avec une pipette multi-canaux, Ajouter **100µL** de substrat dans chaque cupule, puis faire incuber à la température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes exactement.

4. ARRÊT

- 4.1 Arrêter la réaction en déposant avec une pipette multicanaux **100µL** de solution d'arrêt dans chaque puits. S'assurer du parfait mélange du substrat avec la solution d'arrêt.
- 4.2 Lire **immédiatement** la densité optique à 450nm en utilisant 630nm comme longueur d'onde de référence.

CALCUL DES RESULTATS (1)

1. Calculer la densité optique (D.O.) moyenne pour chaque standard, échantillon et contrôle.
2. Tracer la courbe-standard des concentrations [α GST] en $\mu\text{g/L}$ en fonction des D.O._{.450/630nm}. La courbe doit avoir un aspect similaire à celle de la Figure 1.
3. Lire sur la courbe la valeur de [α GST] en $\mu\text{g/L}$ pour chaque échantillon, en fonction de la moyenne des D.O. mesurées.
4. Multiplier la valeur de [α GST] ainsi obtenue par le facteur de la prédilution réalisée pour chaque échantillon afin d'obtenir la valeur réelle de [α GST].
5. La concentration du contrôle positif est lue directement sur la courbe.
6. Les concentrations d'échantillons dont les valeurs sont situées en dehors de la courbe standard ne sont pas valables et doivent être à nouveau effectuées avec un facteur de dilution plus élevé. Aucune donnée ne doit être extrapolée.

DOSAGES REPETITIFS : CONDITIONS PARTICULIERES

Une fois la courbe-standard établie en utilisant le procédé précédemment décrit, il est possible d'effectuer l'analyse d' autres échantillons sans tracer à chaque fois une nouvelle courbe-standard (Voir § Mode opératoire abrégé), en utilisant les mêmes composants du kit. Afin d'assurer une reproductibilité optimale entre les différents essais respecter les instructions suivantes :

1. Les essais successifs doivent être réalisés avec la même plaque et les mêmes composants du kit que ceux utilisés pour faire la courbe de calibration.
2. Les essais successifs doivent être réalisés dans les 21 jours qui suivent la date de la courbe de calibration. Au delà, refaire une courbe de calibration.
3. La **température** et les **temps d'incubation** pour ces dosages doivent être identiques à ceux utilisés lors de l'établissement de la courbe-standard [Voir § Mode opératoire complet (1)].
4. Le contrôle positif fourni dans le coffret de HEPKIT®-Alpha doit être inclus dans tous les dosages afin de pouvoir surveiller la reproductibilité de différents dosages.
5. Il est recommandé d'effectuer le dosage de tous les échantillons, y compris les contrôles positifs, en double exemplaire. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans l'intervalle indiqué à l'intérieur du couvercle du coffret.
6. Une fois tous les dosages effectués, les valeurs de [α GST] des échantillons doivent être calculées suivant le paragraphe Calcul des résultats (2).

MODE OPERATOIRE ABREGE (2)

Remarque : (1) *Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante avant le dosage.* (2) *Les **températures** et les **temps d'incubation** pour le dosage des échantillons doivent être identiques à ceux utilisés lors de l'établissement de la courbe de Calibration [Voir § Mode opératoire complet (1)]. **L'utilisation d'un incubateur est conseillée.***

1. INCUBATION DES ECHANTILLONS

- 1.1. Préparer la solution de lavage (Voir § Préparation des réactifs).
- 1.2. Préparer les échantillons (Voir § Préparation des échantillons).
- 1.3. Ajouter le contrôle positif et les échantillons dilués (**100µL/puits**) en double exemplaire sur la microplaque.
- 1.4. Couvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **60 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.
Remarque: un agitateur de microplaque "Lab-Line Titer-Plate" a été utilisé à la vitesse 2-3.

2. INCUBATION DU CONJUGUE

- 2.1. Après 55 minutes, préparer le conjugué (Voir § Préparation des réactifs).
- 2.2. Vider la plaque par retournement et laver 4 fois chaque barrette avec la solution de lavage (**250-350µL/puits**). Puis taper fermement la plaque retournée contre un papier absorbant pour éliminer complètement la solution de lavage.
Remarque: Le lavage peut être automatique ou manuel.
- 2.3. Ajouter le conjugué (**100µL/puits**).
- 2.4. Recouvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **30 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.
Remarque: un agitateur de microplaque "Lab-Line Titer-Plate" a été utilisé à la vitesse 2-3.
- 2.5. Laver la plaque comme indiqué §2.2.

3. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1. Ajouter **100µL** du substrat dans chacun des puits en utilisant une multipipette et l'incuber à température ambiante pendant exactement **15 minutes**.

4. ARRET

- 4.1. Arrêter la réaction par addition de **100µL** de la solution d'arrêt dans chacun des puits. S'assurer du parfait mélange du substrat avec la solution d'arrêt.
- 4.2. Lire immédiatement la densité optique à 450nm en utilisant 630nm comme longueur d'onde de référence.

CALCUL DES RESULTATS (2)

1. Calculer la densité optique (DO) moyenne pour chaque échantillon et contrôle.
2. Sur la courbe de calibration obtenue avec la même plaque et les mêmes composants, lire pour chaque échantillon la valeur de [α GST] en $\mu\text{g/L}$ à partir de la moyenne des D.O..
3. Multiplier la valeur de [α GST] ainsi obtenue par le facteur de la prédilution réalisée pour chaque échantillon afin d'obtenir la valeur réelle de [α GST]. La valeur du contrôle positif doit se situer entre les valeurs extrêmes de la gamme de mesure indiquée sur la face interne du couvercle du coffret.
4. La concentration du contrôle positif est lue directement sur la courbe.
5. Les concentrations d'échantillons dont les valeurs sont situées en dehors de la courbe standard ne sont pas valables et doivent être à nouveau effectuées avec un facteur de dilution plus élevé. Aucune donnée ne doit être extrapolée.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le contrôle positif doit toujours être pris en compte pour déterminer la validité des résultats du test. Les résultats sont considérés valides lorsque la valeur du contrôle positif est comprise entre les valeurs extrêmes notées sur la face interne du coffret. Si ces critères ne sont pas satisfaits, le test est considéré invalide et doit être répété.

LIMITES DU TEST

Les résultats doivent être en corrélation avec le profil clinique du patient et avec les autres résultats cliniques du laboratoire.

PERFORMANCE

VALEURS NORMALES

De nombreuses études ont déterminé les valeurs de référence de α GST chez des individus sains. L'étude de Rees G. W *et al*¹¹ porte sur une population de 219 donneurs sains. La valeur de référence supérieure (moyenne logarithmique + 2SD) obtenue est de 11,4 μ g/L. Argutus Medical recommande à tous les laboratoires de déterminer ses propres valeurs de référence.

SENSIBILITE

La limite de détection de Argutus Medical HEPKIT®-Alpha est de 0,05 μ g/L dans les micropuits, soit 0,25 μ g/L pour les échantillons.

GAMME DE MESURE

La courbe-standard couvre une gamme de mesure comprise entre 1,25 et 40 μ g/L, soit entre 6,25 et 200 μ g/L pour les échantillons dilués au 1/5 avec la solution de lavage. Cette gamme peut être élargie par dilution supplémentaire.

SPECIFICITE

HEPKIT®-Alpha est hautement spécifique de l' α GST. Aucune réaction croisée significative avec les isoformes μ ou π GST n'a été observée.

INTERFERENCE

Pour ce test, aucune interférence significative n'a été observée avec des échantillons lipémiques, hémolysés et ictériques. Lipémique* : Moins de 10% d'interférence jusqu'à 1000 IU dans l'échantillon. Hémolytique : Moins de 10% d'interférence jusqu'à 1,17g/L d'hémoglobine dans l'échantillon. Ictérique: Moins de 11% d'interférence jusqu'à 5mg/ml de bilirubine dans l'échantillon. *Realise en utilisant 20% de lipide interne a partir du Fresenius. Une interférence a été observée dans des échantillons de plasma collectés sur tubes EDTA et héparinés lithium. Des études internes ont montrés que les échantillons avec un taux très élevé de Facteur Rhumatoïde peuvent interférer avec ce dosage. Pour plus d'information, veuillez contacter Argutus Medical.

REPRODUCTIBILITE

Table 1: Reproductibilité intra-essais HEPKIT®-Alpha.

Echantillon	[αGST] μg/L	SD	%CV	n
Faible	0,79	0,12	15,3	20
Moyen	56,05	3,6	6,42	20
Fort	154,72	20,26	13,09	20

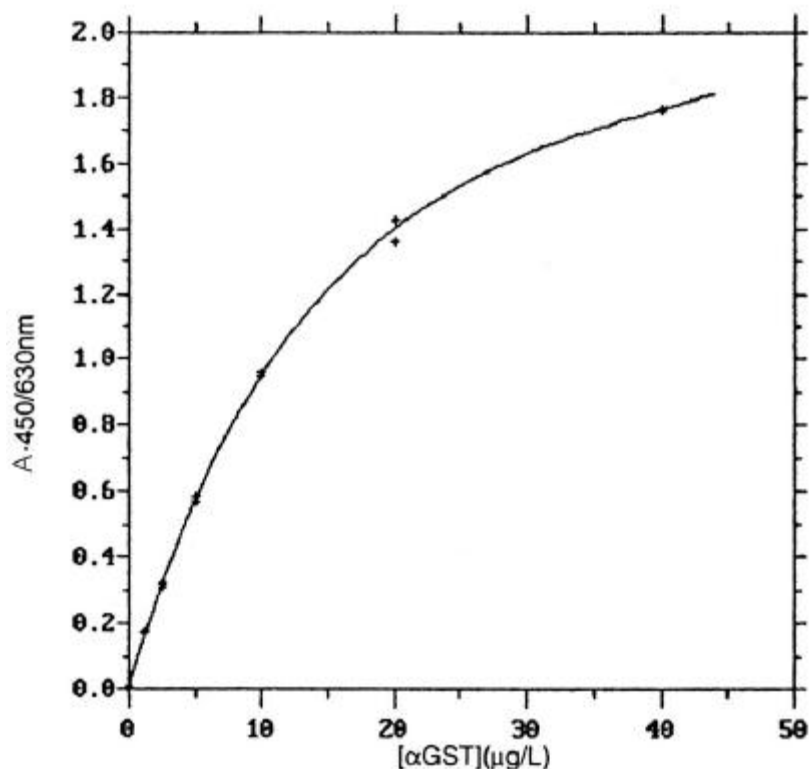
Table 2: Reproductibilité inter-essai HEPKIT®-Alpha obtenue en réalisant le mode opératoire complet pour tous les dosages.

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

Table 3: Reproductibilité inter-lots HEPKIT®-Alpha obtenue à l'aide de trois lots différents.

Echantillon	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Faible	0,94	0,23	24,45	30
Moyen	53,63	5,51	10,27	30
Fort	141,81	25,72	18,14	30

EXEMPLE DE COUBRE DE CALIBRATION

**Figure 1:** Courbe-standard-type obtenue par Argutus Medical HEPKIT®-Alpha. Tracé de D.O._{450/630nm} en fonction de [αGST](µg/L). La gamme de mesure est comprise entre 1,25 et 40µg/L.

RESPONSABILITE

Les performances présentées ici ont été obtenues en suivant le protocole recommandé. Toute modification de procédure non recommandée par Argutus Medical peut perturber les résultats, auquel cas Argutus Medical décline toute responsabilité. Argutus Medical ne peut alors être tenu pour responsable des dommages directs ou indirects subis par l'utilisateur.

RESUME DU MODE OPERATOIRE

1. INCUBATION DES ECHANTILLONS ET DES STANDARDS.

- 1.1 Préparer la solution de lavage et les standards.
- 1.2 Préparer les échantillons.
- 1.3 Placer le nombre nécessaire de micropuits sur le portoir de dosage. Ajouter les standards, le contrôle positif et les échantillons dilués (**100µL/puits**), en double exemplaire, sur la microplaque.
- 1.4 Couvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **60 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.

2. INCUBATION DU CONJUGUE

- 2.1 Après 55 minutes, préparer le conjugué (Voir § Préparation des réactifs).
- 2.2 Vider la plaque par retournement et laver 4 fois chaque barrette avec la solution de lavage (**250-350µL/puits**).
- 2.3 Ajouter le conjugué (**100µL/puits**) sur la plaque.
- 2.4 Recouvrir la microplaque et l'incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **30 ± 2 minutes** sous agitation uniforme.
- 2.5 Laver la plaque comme indiqué §2.2.

3. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1 Ajouter **100µL** de substrat dans chacun des puits en utilisant une multipipette et l'incuber à température ambiante pendant exactement **15 minutes**.

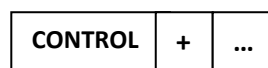
4. ARRET

- 4.1 Arrêter la réaction par addition de **100µL** de solution d'arrêt dans chacun des puits et s'assurer du parfait mélange du substrat avec la solution d'arrêt.
- 4.2 Lire immédiatement la densité optique à 450nm en utilisant 630nm comme longueur d'onde de référence.

5. CALCULER LES RESULTATS

INTERPRÉTATION DES SYMBOLES

Limites du témoin positif



Dispositif médical pour diagnostic *in vitro*



Numéro du lot



Référence Cat



Limitation de la température



A utiliser avant le



Fabricant



Produit biologique dangereux



BIBLIOGRAPHIE

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-FR-09
03/09