

CE

REF BIO66NEPHA
Plat de 96 Puits



ARGUTUS MEDICAL

Nephkit[®] Alpha GST EIA

Technique Immunoenzymatique

FRANÇAIS

Mode D'emploi

TABLE DES MATIÈRES

OBJET	4
CONTEXTE CLINIQUE	4
PRINCIPE DU DOSAGE	4
COMPOSITION DU COFFRET	5
PRÉCAUTIONS D'EMPLOI	6
STABILITÉ ET CONSERVATION	7
MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI	7
PRÉPARATION DES RÉACTIFS	8
PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS	9
MANIPULATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	9
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	9
MODE OPÉRATOIRE	10
CALCUL DES RÉSULTATS	11
CONTRÔLE DE QUALITÉ	11
LIMITES DU TEST	11
PERFORMANCES	12

EXEMPLE DE COURBE D’ETALONNAGE	14
RESPONSABILITÉ	14
ANNEXE 1	14
RÉSUMÉ DU MODE OPÉRATOIRE	15
SIGNIFICATION DES SYMBOLES	16
BIBLIOGRAPHIE	16

OBJET

Le dosage immunoenzymatique Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha permet l'analyse Quantitative de l'Alpha Glutathion S-Transférase (α GST) dans les urines. Pour toute information relative aux autres sousclasses GST ou au dosage de l' α GST en recherche, dans des domaines non cliniques, contacter Argutus Medical.

CONTEXTE CLINIQUE

L'Alpha Glutathion S-Transférase (α GST) est présente dans la région tubulaire proximale du rein, alors que la Pi Glutathion S-Transférase (π -GST) est principalement localisée au niveau tubulaire distal¹. L' α GST est détectable dans l'urine de sujets normaux, comme le confirment le dosage immunologique et l'analyse par la technique Western Blot². En cas de lésion dans la région tubulaire proximale, une augmentation de la concentration d' α GST dans les urines peut se produire et il a été démontré que l'élévation du taux d' α GST urinaire indique une lésion tubulaire proximale. On remarque que la teneur urinaire en α GST est un outil important pour étudier toute lésion de la région tubulaire proximale en cas de néphrotoxicité³⁻⁵, de toxicité environnementale⁶, d'intervention chirurgicale⁷, d'insuffisance rénale grave⁸ et de greffe⁹⁻¹².

Il a également été démontré que la libération de π -GST est liée aux lésions tubulaires distales⁶. Aussi, l'analyse simultanée de la concentration d' α GST et de π -GST peut permettre d'établir la présence d'une lésion tubulaire proximale ou distal^{5,9-11} comme dans les cas de néphrotoxicité⁵, d'insuffisance rénale grave⁸, de rejet d'un greffon⁹⁻¹⁰, d'une ischémie-lésion⁹⁻¹¹ et de diabète¹³.

Les GST urinaires sont des indicateurs sensibles de la présence d'une lésion rénale; elles peuvent révéler des effets rénaux alors que d'autres biomarqueurs, comme la créatinine sérique ou BUN restent inchangés³⁻⁵.

PRINCIPE DU DOSAGE

Argutus Medical NEPHKIT[®] 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

- | | | | | |
|---|--|---------|------|-----|
| 1. Microplaque enduite d'anticorps
12 barrettes x 8 microcupules enduites d'IgG
anti- α GST. Cupules sécables.
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>PLA</td></tr></table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| 2. α GST standard
α GST purifiée dans du tampon stabilisant (200 μ L).
Contient du Thiomérsal et de l'azide de sodium.
SOLUTION MERE | <table border="1"><tr><td>CAL</td></tr></table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| 3. Contrôle positif
α GST dans une solution contenant des
protéines et du stabilisant (4,5mL).
Contient du Thiomérsal et de l'azide de sodium.
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>+</td></tr></table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| 4. Conjugué concentré
IgG anti- α GST conjuguées à la peroxydase
de Raifort (300 μ L), concentré 51x.
Contient du Thiomérsal.
CONCENTRE | <table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>51X</td></tr></table> | CONJ | 51X | |
| CONJ | 51X | | | |
| 5. Tampon de lavage concentré
Solution saline avec tampon phosphate/Tween
20 (PBST 55mL), concentrée 20x.
Contient du Thiomérsal.
CONCENTRE | <table border="1"><tr><td>BUF</td><td>WASH</td><td>20X</td></tr></table> | BUF | WASH | 20X |
| BUF | WASH | 20X | | |
| 6. Substrat TMB
Solution de TMB avec stabilisants (11mL).
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>SUBS</td><td>TMB</td></tr></table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| 7. Solution d'arrêt
Acide sulfurique à 0,5mol/L (11mL).
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>SOLN</td><td>STP</td></tr></table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| 8. Diluant d'échantillon
Solution contenant des protéines (50mL).
Contient de l'azide de sodium.
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> | DIL | SPE | |
| DIL | SPE | | | |
| 9. Tampon stabilisant pour urines.
Contient du Thiomérsal et de l'azide de sodium
(10mL).
PRET A L'EMPLOI | <table border="1"><tr><td>BUF</td><td>NEPH</td></tr></table> | BUF | NEPH | |
| BUF | NEPH | | | |
| 10. Notice d'utilisation
Mode d'emploi | <table border="1"><tr><td>INS</td></tr></table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUTIONS D'EMPLOI

SECURITE

- Pour usage diagnostic *in-vitro* seulement.
- Ce coffret doit être uniquement utilisé par le personnel de laboratoire qualifié.
- Ce kit contient des produits d'origine humaine qui ont été testés négatifs à l'ADN Hépatite B, à l'ARN Hépatite C et à l'ARN VIH. Toutefois, comme aucun test ne peut fournir une garantie totale, ces produits sont considérés comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent du Thiomérsal qui peut se révéler toxique à l'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 à l'eau et consulter un médecin.
- Le substrat contient du TMB (tétraméthylbenzidine) qui irrite la peau et les muqueuses. En cas de contact avec la peau, rincer à 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. Pour les éliminer, ces réactifs devront être rincés avec de grands volumes d'eau pour éviter l'accumulation d'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 et éliminé 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 sur la paillasse 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 interpuits et changer de cône à usage unique pour chaque échantillon et composant.
- Ne pas utiliser une solution trouble ou présentant un précipité.

- S'assurer que le tampon de lavage concentré est bien mélangé et qu'il ne reste pas de cristaux avant la dilution.
- 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 contaminée peut entraîner un bruit de fond élevé à la lecture des résultats.
- 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 supérieure à 2-8°C pendant une longue période.
- Utiliser seulement 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. Après reconstitution, le tampon de lavage (PBST) est stable deux semaines à température ambiante ou pendant un mois entre 2 et 8°C.
4. Eviter la conservation prolongée du conjugué dilué à température ambiante. Il doit être utilisé immédiatement après sa préparation.
5. Les cupules doivent toujours être conservées dans le sachet fermé hermétiquement, avec le dessicatif et entre 2 et 8°C. Remettre rapidement au réfrigérateur les micropuits non utilisés dans le sachet de conservation avec le dessicatif.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Micropipettes (de 5 μ L à 50 μ L, de 50 μ L à 200 μ L et de 200 μ L à 1000 μ L) et une pipette multicanaux (de 50 μ L à 200 μ L).
2. Laveur de plaque automatique.
3. Lecteur de plaque ELISA avec filtre à 450nm avec longueur d'onde de référence à 630nm si disponible.
4. Bécher de 1 litre.
5. Chronomètre.
6. Bain-marie.
7. Eau désionisée/distillée.
8. Agitateur de plaque.
9. Eprouvette graduée.
10. Tubes à essai.

PREPARATION DES REACTIFS

1. SOLUTION DE LAVAGE (PBST)

Diluer le concentré de lavage au 1/20ème en ajoutant, par exemple, 10mL de concentré de lavage à 190mL d'eau désionisée. Préparer seulement le volume de solution nécessaire pour le dosage. S'assurer que les cristaux de sel sont dissous avant de procéder à la dilution. (Si nécessaire, chauffer doucement le concentré de lavage à 37C pendant 30 minutes pour dissoudre les cristaux de sel.)

2. STANDARDS

Préparer le standard (A) à partir de la solution mère d'αGST.

Solution mère :	25µL
Diluant de l'échantillon :	<u>2500µL</u>
Total :	2525µL (A)

A l'aide de tubes à essai étiquetés, préparer la gamme d'étalonnage comme suit:

Concentration du standard	Volume du calibrer (µL)	Voloume de diluant d'échantillon (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

Immédiatement avant l'emploi, diluer le concentré de conjugué au 1/51ème en ajoutant 20µL de conjugué concentré à 1mL de solution de lavage pour chaque barrette. Utiliser pour chaque bande 1 020 µL de conjugué préparé.

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

NEPHKIT[®] Alpha peut être utilisé pour mesurer l' α GST de tout échantillon urinaire. Mais, en raison de la variation diurne de protéinurie¹⁴ et afin d'obtenir des résultats optimaux, les échantillons doivent être prélevés le matin à heure fixe. Il est impératif de relever l'heure exacte et la quantité d'urine prélevée afin d'exprimer la proportion d' α GST excrétée sous forme de taux (ng/min). Voir annexe 1.

Prendre conseil auprès de Argutus Medical si les échantillons doivent être prélevés selon une procédure ou à des moments différents.

Dès que possible après le prélèvement des échantillons, ajouter 200 μ L de tampon stabilisant urinaire NEPHKIT[®] à 800 μ L d'urine (dilution de l'échantillon au 4/5ème) ce, même si les échantillons ne sont pas destinés à être conservés.

MANIPULATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Ne pas conserver d'échantillons sans avoir préalablement ajouté le tampon stabilisant urinaire NEPHKIT[®]. Celui-ci doit être ajouté dans les 12 heures suivant le prélèvement.

Il est recommandé de procéder au dosage des échantillons dès que possible après leur prélèvement. Cependant, après addition du tampon stabilisant urinaire NEPHKIT[®], les échantillons peuvent se conserver une semaine entre 2 et 8°C ou à -20°C pendant 28 jours.

Eviter la répétition des cycles de congélation-décongélation. En l'absence de tampon stabilisant urinaire NEPHKIT[®], la congélation peut réduire jusqu'à 70% le taux de GST urinaire détectable par dosage immunoenzymatique. Cette perte en GST urinaire est très probablement due à la dénaturation qui se produit au cours du cycle de congélation-décongélation.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Immédiatement avant le dosage, diluer les échantillons au 1/2 en ajoutant 200 μ L d'urine stabilisée à 200 μ L de diluant d'échantillon. Si les échantillons à doser sont nombreux (plus de 10 échantillons en double), et afin de faciliter le transfert sur la plaque de dosage, les échantillons peuvent être dilués sur une microplaque vierge en ajustant le volume. Le contrôle positif ne nécessite pas de dilution.

MODE OPERATOIRE

REMARQUE: Tous les réactifs doivent être à 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 Prendre le nombre nécessaire de micropuits sur la plaque de dosage (14 pour les standards et 2 pour chacun des contrôles et des échantillons) et compléter les espaces dans les colonnes avec les micropuits vierges (disponibles chez Argutus Medical). Déposer sur la microplaque, les standards (**G-A ; 0 à 40µg/L**), le contrôle positif et les échantillons dilués (**100µL/puits**) en duplicate.
- 1.4 Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **60+/- 2 minutes** sous agitation uniforme.
Remarque : Un agitateur de microplaque LabLine “ TiterPlate” a été utilisé à vitesse 2-3.

2. INCUBATION DU CONJUGUE

- 2.1 Après 55 minutes, préparer le conjugué (voir Préparation du conjugué).
- 2.2 Oter le couvercle et laver 4 fois chaque barrette avec la solution de lavage (**250-350µL/puits**). Puis taper fermement la plaque retournée sur du papier absorbant pour éliminer complètement la solution de lavage.
Remarque: le lavage peut être automatique ou manuel.
- 2.3 Ajouter **100µL** de conjugué par puits.
- 2.4 Recouvrir la microplaque et incuber à température ambiante (20-25°C) pendant **30+/- 2 minutes** sous agitation uniforme.
- 2.5 Laver la plaque comme indiqué 2.2

3. DÉVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1 Ajouter **100µL** de substrat dans chaque puits en utilisant une pipette multicanaux et incuber à température ambiante et dans l'obscurité pendant exactement **15 minutes**.

4. ARRET

- 4.1 Stopper la réaction par addition de **100µL** de la solution d'arrêt dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux. 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 (si disponible).

CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer l'absorbance moyenne pour chaque standard, contrôle et échantillon.
2. Tracer la courbe standard des absorbances obtenues en fonction de [α GST] en $\mu\text{g/L}$. 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 absorbances mesurées.
4. Multiplier la valeur [α GST] obtenue par le facteur de dilution correspondant afin d'obtenir la valeur réelle [α GST]. Multiplier la valeur obtenue par un facteur de 1,25 pour tenir compte de la dilution des échantillons au tampon stabilisant urinaire NEPHKIT®.
5. La concentration du contrôle positif est directement lue sur la courbe.
6. Se reporter à l'annexe 1 pour exprimer la valeur α GST sous forme de taux (ng/min).
7. 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.

CONTROLE DE QUALITE

Le contrôle positif doit toujours être inclus au test pour déterminer la validité des résultats. Les résultats d'un dosage sont considérés comme valables si la concentration du contrôle positif se trouve dans les valeurs indiquées sur la trousse. Si ce critère n'est pas satisfait, le dosage doit être considéré comme non valable et doit être recommencé

LIMITES DU TEST

Les résultats doivent corrélérer avec le profil Clinique du patient et avec d'autres résultats obtenus au laboratoire.

PERFORMANCES GAMME DE REFERENCE

Des urines de la nuit sont prélevées le matin à heure fixe, sur 38 sujets en bonne santé, âgés de 18 à 46 ans.

L'excrétion d' α GST observée est la suivante :

En taux (ng/min):	
Moyenne	3,0ng/min
Moyenne + 2SD	12,2ng/min
En concentration (μ g/L):	
Moyenne	3,5 μ g/L
Moyenne +2SD	11,1 μ g/L

Nous conseillons aux utilisateurs d'élaborer sa propre gamme de référence en fonction du groupe étudié.

SENSIBILITE

La limite de détection de NEPHKIT®-Alpha est de 0,036 μ g/L dans le puits, soit 0,09 μ g/L pour l'échantillon.

GAMME DE MESURES

La courbe de calibration va de 1,25 à 40 μ g/L, ce qui correspond à une gamme de 3,25-100 μ g/L pour les échantillons dilués au 4/5ème avec le tampon stabilisant pour urines et dilués au avec le diluant d'échantillon. Cette gamme peut être étendue par dilution croissante des échantillons.

SPECIFICITE

NEPHKIT® - Alpha est hautement spécifique de l' α GST. Aucune réactivité croisée significative n'est constatée avec les isoformes Mu ou Pi-GST.

INTERFERENCES

Pour ce dosage, aucune interférence significative n'a été observée avec des échantillons hémolytiques et ictériques. Echantillons hémolytiques : moins de 14% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 1,17 g/L d'hémoglobine. Echantillons ictériques : moins de 11% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 5 mg/mL de bilirubine. Des études internes ont montré que des urines avec un pH entre 4 et 9 n'affectent pas la performance du dosage. Contacter Argutus Medical pour de plus amples informations.

REPRODUCTIBILITE

Tableau 1. Variations intra-dosages de NEPHKIT®-Alpha

Echantillon	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Faible	9,03	0,65	7,18	20
Moyen	33,4	2,48	7,43	20
Fort	59,1	5,47	9,24	20

Tableau 2. Variations inter-dosages de NEPHKIT®-Alpha.

Echantillons	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Faible	8,4	0,49	5,81	10
Moyen	37,9	3,07	8,11	10
Fort	68,7	9,24	13,46	10
PC	10,8	1,35	12,53	10

Tableau 3. Variations inter-lots de NEPHKIT®-Alpha, calculées sur trois lots.

Echantillon	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Faible	8,28	1,01	12,16	30
Moyen	34,7	3,79	10,92	30
Fort	61,6	8,84	14,36	30

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE

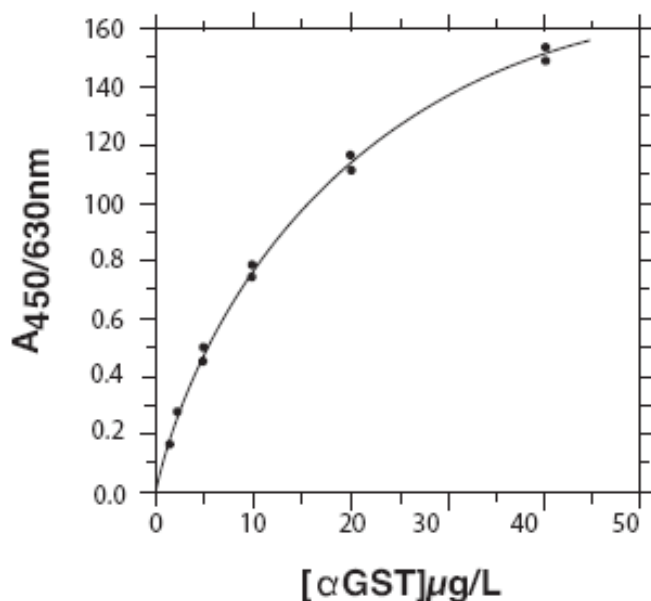


Figure 1: Courbe d'étalonnage type obtenue avec NEPHKIT®-Alpha. Tracé de $A_{450/630nm}$ en fonction de $[\alpha GST]\mu g/L$. La gamme de mesure est comprise entre 1,25 et 40 $\mu g/L$ d' αGST . La limite de détection est de 0,036 $\mu g/L$ par puits.

RESPONSABILITE

Les performances présentées ici ont été obtenues en suivant la procédure décrite. Toute modification de procédure non recommandée par Argutus Medical peut perturber les résultats obtenus. Dans ce cas, Argutus Medical décline toute responsabilité expresse, tacite ou statutaire, y compris la responsabilité pour tacite pour commercialisation et conformité à un usage donné. Argutus Medical ne peut alors être tenu pour responsable des dommages, directs ou indirects, subis par l'utilisateur.

ANNEXE 1

L'αGST URINAIRE EXPRIMEE EN TAUX

La libération d'αGST est constante dans le temps et non par rapport au volume d'urine. Ce qui signifie qu'il est peut-être plus approprié d'exprimer l'excrétion d'αGST sous forme de taux (ng/min) plutôt que de concentration. Ceci peut être important en cas de diurèse inhabituelle (oligo ou polyurie). La vitesse de libération s'obtient comme suit:

RECUEIL DES URINES

Prélever les urines comme décrit dans Prélèvement et Manipulation des échantillons. Noter le moment précis de la miction (T2), le moment de la miction précédente (T1) et le volume total d'urines (V).

CALCUL DU TAUX D'EXCRETION D'αGST

1. Déterminer les concentrations en αGST à l'aide de NEPHKIT® Alpha (µg/L).
2. Calculer la période T = T2 - T1 pendant laquelle l'urine a été recueillie, en minutes.
3. Noter le volume d'urine en mL (V).
4. Calculer le taux d'excrétion comme suit :

$$\text{ng } \alpha\text{GST}/\text{min} = \frac{[\alpha\text{GST}]\mu\text{g}/\text{L} \times V}{T}$$

RESUME DU MODE OPERATOIRE

1. INCUBATION DES ECHANTILLONS / STANDARDS

- 1.1. Préparer la solution de lavage et les standards.
- 1.2. Préparer les échantillons.
- 1.3. Placer les puits sur la microplaque. Ajouter les standards, le contrôle positif et les échantillons dilués (100µL/puits) en duplicate sur la microplaque.
- 1.4. Couvrir la microplaque et 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 du conjugué).
- 2.2. Retirer le couvercle et laver chaque barrette 4 fois avec la solution de lavage (250µL–350µL/puits).
- 2.3. Ajouter 100µL de conjugué/puits.
- 2.4. Recouvrir à nouveau la microplaque et incuber à température ambiante (20-25°C) pendant 30 +/- 2 minutes sous agitation uniforme.
- 2.5. Laver chaque barrette comme dans l'étape 2.2.

3. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1. Ajouter 100µL de substrat dans chaque puits et incuber à température ambiante dans l'obscurité pendant 15 minutes exactement.

4. ARRET

- 4.1. Ajouter 100µL de solution d'arrêt dans chaque puits. Assurez-vous d'un mélange total du substrat et de la solution d'arrêt.
- 4.2. Lire immédiatement les résultats à 450nm en utilisant 630nm comme référence (si possible).

5. CALCULER LES RESULTATS

SIGNIFICATION DES SYMBOLES

Limites du témoin positif	
Matériel médical pour le diagnostic <i>in vitro</i>	
Référence du lot	
Référence Cat	
Limites de température	
Utiliser avant	
Fabricant	

REFERENCES

1. **Campbell, J.A.H. et al.** (1991). Immunohistologic localisation of alpha, mu and pi class glutathione S-transferase in human tissues. *Cancer (Philadelphia)* **67**, 1608-1613.
2. **Hassett, B. and Doyle, S.** (1995). Argutus Medical International internal research.
3. **Goldberg, M.E. et al.** (1999). Dose of compound A, not Sevoflurane, determines changes in the biochemical markers of renal injury in healthy volunteers. *Anesthesia and Analgesia* **88**, 437-445.
4. **Eger II, E.I. et al.** (1996). Nephrotoxicity of Sevoflurane versus Desflurane in volunteers. *Anesthesia and Analgesia* **84**, 160-168.
5. **Kirby K.B. et al.** (1997). Urinary glutathione transferase as an early marker of renal impairment in psoriasis patients treated with Cyclosporin A (CsA). Paper presented at the XIVth International Congress of Nephrology 25-29 May 1997, Sydney, Australia.
6. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1995). Glutathione transferases in the urine. Sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans. *Environmental Health Perspectives* **102 (Suppl 3)**, 293-296.
7. **Cressey G et al.** (2002). Renal tubular injury after infrarenal aortic aneurysm repair. *J Cardiothorac. Vasc. Anesth.* ;**16(3)**:290-3.
8. **Cakalaroski, K. et al.** (1999). α and π - glutathione Stransferases as markers of tubular cell dysfunction in acute renal failure patients. Abstract from the Third Congress of the Balkan Cities Association of Nephrology, Dialysis and Artificial Organs (BANTAO) Belgrade, Yugoslavia, 1998. *Nephrol. Dial. Transplant*; **14**: 2978.
9. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1994). Quantitation of glutathione S-transferase pi in the urine by radioimmunoassay. *Nephron* **66**, 162-169.
10. **Stegeman, C.A. et al.** (1996). Differential diagnosis of early graft dysfunction by urinary excretion of α and π glutathione Stransferases in renal transplantation. *JASN* **7(9)**, 1986.
11. **Kievit, J.K. et al.** (1997). Release of α -glutathione Stransferase (α GST) and π -glutathione S-transferase (π GST) from ischaemic damaged kidneys into the machine perfusate - relevance to viability assessment Transplantation Proceedings **29**, 3591-3593.
12. **Daeman, J.W.H.C. et al.** (1997). Glutathione S-transferase as predictor of functional outcome in transplantation of machine preserved non-heart beating donor kidneys. *Transplantation* **63**, 89-93.
11. **Maxwell, P.R. and Gordon D.** (2002). Concentration of glutathione-S-transferase isoenzymes in urine in patients with diabetes: A pilot study. Proceedings of the ACB National meeting, Glasgow UK 21-24 May 2002, 73-74
14. **Jung, K.** (1994). Urinary enzymes and low molecular weight proteins as markers of tubular dysfunction. *Kidney International* **46 (Suppl 47)**, 29-33.



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>

European Patent no. 787300

US Patent No.: 6,071,706

Document Code: NEPA-127-FR-08

03/09