

CE

**REF** BIO66NEPHA  
96 Vertiefung platte



**ARGUTUS** MEDICAL

# **Nephkit<sup>®</sup> Alpha GST EIA**

**Enzymimmunoassay**

**DEUTSCH**

**Gebrauchsanweisung**

# **INHALT**

VERWENDUNGSZWECK	4
EINLEITUNG	4
TESTPRINZIP	4
BESTANDTEILE DES KITS	5
VORSICHTSMASSNAHMEN	6
STABILITÄT UND LAGERUNG	7
ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN	7
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	9
PROBENENTNAHME	9
PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG	9
VORBEREITUNG DER PROBEN	10
TESTDURCHFÜHRUNG	10
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	11
QUALITÄTSKONTROLLKRITERIEN	12
EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS	12
LEISTUNGSDATEN DES TESTS	
REFERENZBEREICH	12
BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE	14

GARANTIE	14
ANHANG 1	14
KURZ-ARBEITSANLEITUNG	15
ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE	16
LITERATUR	16

## **VERWENDUNGSZWECK**

Der Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha dient dem quantitativen Nachweis der Alpha-Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ GST) im Urin. Zur Bestimmung der  $\alpha$ GST im wissenschaftlichen/ nicht-klinischen Bereich oder anderer GST-Klassen, wenden Sie sich bitte an Argutus Medical.

## **EINLEITUNG**

In der Niere ist die Alpha-Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ GST) in der proximalen Tubuliregion lokalisiert, während sich das Vorkommen der Pi-Glutathion-S-Transferase ( $\pi$ GST) vorwiegend auf die distalen Tubuli beschränkt.<sup>1</sup> Wie Immuntests und Western-Blot-Analysen bestätigen, wird  $\alpha$ GST bei gesunden Personen in den Urin abgegeben<sup>2</sup>. Jedes Ereignis, das eine Schädigung der proximalen Tubuli auslöst, kann zum Anstieg der in den Urin freigesetzten  $\alpha$ GST führen, und ein Anstieg der  $\alpha$ GST-Konzentrationen im Urin ist nachweislich mit proximalen Tubulischädigungen assoziiert. Die Bestimmung der  $\alpha$ GST-Konzentration im Urin hat sich als wertvolles Werkzeug bei der Untersuchung von proximalen Tubuliverletzungen bei Nephrotoxizität<sup>3-5</sup>, umweltbedingten toxischen Schäden<sup>6</sup>, chirurgischen Eingriffen<sup>7</sup>, akutem Nierenversagen<sup>8</sup> und Transplantationen<sup>9-12</sup> erwiesen.

Da die  $\pi$ GST-Freisetzung hingegen nachweislich mit distalen Tubuliverletzungen assoziiert ist<sup>6</sup>, könnte die gleichzeitige Messung der Konzentrationen von  $\alpha$ GST und  $\pi$ GST eine Unterscheidung zwischen proximalen und distalen Tubulischäden erlauben<sup>5,9-11</sup>, beispielsweise bei Nephrotoxizität<sup>5</sup>, akutem Nierenversagen<sup>8</sup>, Transplantat-abstoßung<sup>9-10</sup>, Reperfusionsschäden nach Ischämie<sup>9-11</sup> und Diabetes<sup>13</sup>.

Die GST-Konzentrationen im Urin sind empfindliche Indikatoren für aktuelle Verletzungen des Nierengewebes und können Auswirkungen auf die Nieren anzeigen, während andere Biomarkersubstanzen wie Serumcreatinin oder BUN (Stickstoff aus dem Blut-Harnstoff) unverändert bleiben<sup>3-5</sup>.

## **TESTPRINZIP**

Der Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha ist ein quantitative Enzym-Immuntest. Methodisch basiert der Test auf der schrittweisen Zugabe von Probe, Enzymkonjugat und Substrat in die Wells (Auftragsstellen) einer Mikroassayplatte, die mit anti- $\alpha$ GST-IgG beschichtet sind. Die resultierende Farbintensität ist proportional zur  $\alpha$ GST-Konzentration in der Probe. Nachweisbar sind Konzentrationen im Bereich von 1,25–40 $\mu$ g/L.

## **BEATANDTEILE DES KITS**

1. Mikroassayplatte, beschichtet mit Antikörpern  
12 Mikroassaystreifen mit 8 vereinzelbaren Wells,  
die mit anti- $\alpha$ GST-IgG beschichtet sind.  
GEBRAUCHSFERTIG 

PLA
-----
  
2. GST-Kalibrator  
Gereinigte  $\alpha$ GST in Stabilisierungspuffer (200 $\mu$ L).  
Enthält Thiomersal und Natriumazid.  
STAMMLÖSUNG 

CAL
-----
  
3. Positivkontrolle  
 $\alpha$ GST in proteinhaltiger Lösung mit  
Stabilisatoren (4,5mL).  
Enthält Thiomersal und Natriumazid.  
GEBRAUCHSFERTIG 

CONTROL	+
---------	---
  
4. Konjugat-Konzentrat  
51x anti- $\alpha$ GST-IgG konjugiert an  
Meerrettichperoxidase (HRP) (300 $\mu$ L).  
Enthält Thiomersal.  
KONZENTRAT 

CONJ	51X
------	-----
  
5. Waschkonzentrat  
20x phosphatgepufferte  
Kochsalzlösung/Tween-20 (PBST, 55mL).  
Enthält Thiomersal.  
KONZENTRAT 

BUF	WASH	20X
-----	------	-----
  
6. TMB-Substrat  
Stabilisierte TMB-Lösung (11mL).  
GEBRAUCHSFERTIG 

SUBS	TMB
------	-----
  
7. Stopplösung  
0,5 mol/L Schwefelsäure (11mL).  
GEBRAUCHSFERTIG 

SOLN	STP
------	-----
  
8. Probenverdünnungsmittel  
Proteinhaltige Lösung (50mL).  
Enthält Natriumazid.  
GEBRAUCHSFERTIG 

DIL	SPE
-----	-----
  
9. Urin-Stabilisierungspuffer  
Enthält Thiomersal und Natriumazid (10mL).  
GEBRAUCHSFERTIG 

BUF	NEPH
-----	------
  
10. Packungsbeilage  
Gebrauchsanweisung 

INS
-----

## **VORSICHTSMASSNAHMEN**

### **SICHERHEITSHINWEISE**

- Der Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha ist nur zum *invitro*-Gebrauch vorgesehen.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Dieser Testkit enthält Material humane Ursprungs, das auf Hepatitis B-DNA HCV-RNA 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 betroffene Stellen 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 Ausrüstungslosnummer 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 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 bis 25°C) gebracht und gut gemischt werden.
- Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über 2 bis 8°C aufbewahrt werden.
- Immer saubere Glas- oder Einmalgeräte für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipettierplan mit Plattenschema erstellt werden.
- Die Unterseite der Mikroassayplatte muss vor dem Ablesen der Extinktionswerte sauber und trocken sein.

## **STABILITÄT UND LAGERUNG**

1. Alle Reagenzien des Kits sind bei Lagerung bei 2 bis 8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
2.  $\alpha$ 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 bis 8°C bis zu einem Monat.
4. Eine längere Lagerung von verdünntem Konjugat bei Raumtemperatur sollte vermieden werden; es muss unmittelbar nach der Herstellung verwendet werden.
5. Die Mikroassaystreifen sollten bis zum Gebrauch zusammen mit Trockenmittel im verschlossenen Beutel bei 2 bis 8°C bleiben. Nicht benötigte Wells zusammen mit Trockenmittel in den Aufbewahrungsbeutel zurückgeben.

## **ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN**

1. Mikropipetten (5 $\mu$ L bis 50 $\mu$ L, 50 $\mu$ L bis 200 $\mu$ L und 200 $\mu$ L bis 1000 $\mu$ L) und eine Mehrkanalpipette (50 $\mu$ L bis 200 $\mu$ L).
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 1:20 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  $\alpha$ GST-Stammlösung den Kalibrator (A) wie folgt herstellen:

Stammlösung:	25 $\mu$ L
Probenverdunnungs:	<u>2500<math>\mu</math>L</u>
Gesamtmenge:	2525 $\mu$ L (A)

Mithilfe beschrifteter Röhren werden die weiteren Kalibratoren wie folgt hergestellt:

<b>Äquivalente Kalibrator-Konzentration</b>	<b>Kalibrator (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volumen an Probenverdunnungsmittel (<math>\mu</math>L)</b>
40 $\mu$ g/L (A)	500 (A)	-
20 $\mu$ g/L (B)	500 (A)	500
10 $\mu$ g/L (C)	500 (B)	500
5 $\mu$ g/L (D)	500 (C)	500
2,5 $\mu$ g/L (E)	500 (D)	500
1,25 $\mu$ g/L (F)	500 (E)	500
0 $\mu$ g/L (G)	-	500

### **3. KONJUGAT**

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

## **PROBENENTNAHME**

Der Argutus Medical NEPHKIT®-Alpha kann zwar zur Bestimmung der  $\alpha$ GST-Konzentration in jeder beliebigen Urinprobe verwendet werden, aufgrund der bei einer Proteinurie gegebenen tageszeitlichen Schwankungen<sup>14</sup> ist es zur Erzielung optimaler Ergebnisse aber wichtig, zeitkontrollierte, quantitative Übernacht-Urinproben zu sammeln und sowohl den Sammelzeitraum als auch das entsprechende Volumen genau zu protokollieren, um dann die  $\alpha$ GST-Freisetzung in den Urin als Rate (ng/min) angeben zu können (siehe Anhang 1).

Wenn Sie andere Sammelmethode und -zeiträume verwenden sollten Sie bei Argutus Medical entsprechende Auskünfte einholen.

Geben Sie sobald wie möglich nach der Probenentnahme, auch wenn die Proben nicht gelagert werden sollen, jeweils 200 $\mu$ L NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer zu 800 $\mu$ L Urin (4:5-Verdünnung der Urinprobe).

## **PROBENHANDHABUNG UND LAGERUNG**

Proben nicht ohne Zugabe von NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer aufbewahren. Die Zugabe von NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer muss innerhalb von 12 Stunden nach der Probenentnahme erfolgen.

Die Testdurchführung sollte möglichst rasch nach der Probenentnahme erfolgen. Nach Zugabe des NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer können die Proben allerdings bei 2 bis 8°C eine Woche bzw. bei -20°C bis zu 28 Tage aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Ohne NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer kann sich durch das Einfrieren die GST-Konzentration im Urin laut EIA-Bestimmung um bis zu 70% verringern. Dieser Abfall der GST-Konzentration im Urin ist wahrscheinlich auf die während des Gefrier-Auftau-Zyklus stattfindende Denaturierung zurückzuführen.

## **VORBEREITUNG DER PROBEN**

Unmittelbar vor der Durchführung des Tests müssen die Patientenproben 1:2 verdünnt werden, indem man zu 200 $\mu$ L Probenverdünnungsmittel 200 $\mu$ L stabilisierte Urinlösung 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**

**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 und leere Plätze mit unbeschichteten Wells (erhältlich bei Argutus Medical) aufgefüllt werden. Kalibratoren (**G-A; äquivalente Konzentration 0-40µg/L**), Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) jeweils paarweise in die Mikroassayplatte geben.
- 1.4 Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20 bis 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.
- 2.3 100 µL Konjugat/Well zugeben.
- 2.4 Die Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur (20 bis 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. FARBENTWICKL**

- 3.1 **100µL** Substrat/Well mit einer Mehrkanalpipette zugeben und bei Raumtemperatur genau **15 Minuten** 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. Mittelwerte der Extinktionswerte von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und jeder Probe berechnen.
2. Aus den Kalibratorwerten eine Kalibrationskurve erstellen:  $E_{450/630\text{nm}}$  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  $\alpha\text{GST}$ -Konzentrationen zu erhalten. Die Ergebnisse der Proben sollten mit einem zusätzlichen Faktor von 1,25 multipliziert werden, um die Verdünnung der Proben mit dem NEPHKIT<sup>®</sup> Urin-Stabilisierungspuffer zu berücksichtigen.
5. Die Konzentration der Positivkontrolle kann direkt aus der Kalibrationskurve abgelesen werden.
6. Eine Anleitung, nach der Sie die  $\alpha\text{GST}$  Freisetzung als Rate ( in ng/min) angeben können, finden Sie in Anhang 1.
7. Probenkonzentrationen mit Messwerten außerhalb der Standardkurve sind ungültig und müssen mit einem höheren Verdünnungsfaktor wiederholt werden. Es ist nicht zulässig, Daten zu extrapolieren.

## **QUALITATSKONTROLLKRITERIEN**

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 TEST REFERENZBEREICH**

Zeitkontrollierte, quantitative Übernacht-Urinproben wurden bei 38 gesunden Probanden im Alter zwischen 18 und 46 Jahren entnommen. Die beobachtete Freisetzung von  $\alpha$ GST in den Urin betrug:

Als Rate (ng/min)	
MW	3,0ng/min
MW + 2 SD	12,2ng/min

Als Konzentration ( $\mu$ g/L)	
MW	3,5 $\mu$ g/L
MW + 2 SD	11,1 $\mu$ g/L

Es wird jedem Anwender empfohlen, für seine Untersuchungsgruppe eigene Referenzbereiche festzulegen.

## **NACHWEISGRENZEN**

Die Nachweisgrenze des Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha liegt bei 0,036 $\mu$ g/L pro Mikro-assay-Well bzw. Bei 0,09 $\mu$ g/L pro Probe.

## **MESSBEREICH**

Die Kalibrationskurve umfasst den Bereich 1.25-40 $\mu$ g/L, d.h. in den 4:5 mit Urin-Stabilisierungspuffer und 1:2 mit Probenverdünnungsmittel verdünnten Proben können Konzentrationen im Bereich 3.25–100 $\mu$ g/l  $\alpha$ GST bestimmt werden. Dieser Bereich kann durch eine höhere Probenverdünnung erweitert werden.

## **SPEZIFITÄT**

Der NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha besitzt eine hohe Spezifität für den Nachweis von  $\alpha$ GST. Mit den Isoforme mu- oder pi-GST wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet.

## STÖRUNG DES TESTS

Mit hämolytischen und ikterischen Proben wurde keine wesentliche Beeinflussung dieses Tests beobachtet. Hämolytische Proben: Weniger als 14% Beeinflussung bei Konzentrationen von bis zu 1,17g/ L Hämoglobin in der Probe. Ikterische Proben: Weniger als 11% Beeinflussung bei Konzentrationen bis zu 5mg/mL Bilirubin in der Probe. Interne Studien haben gezeigt, dass Urinproben in einem pH-Bereich von pH 4-9 die Testleistung nicht beeinträchtigen. Wenden Sie sich bitte zwecks weiterer Informationen an Argutus Medical.

## REPRODUZIERBARKEIT

**Tabelle 1.** Intra-assay-Variation des Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha.

Probe	[αGST] µg/L	SD	%VK	n
Niedrig	9,03	0,65	7,18	20
Mittel	33,4	2,48	7,43	20
Hoch	59,1	5,47	9,24	20

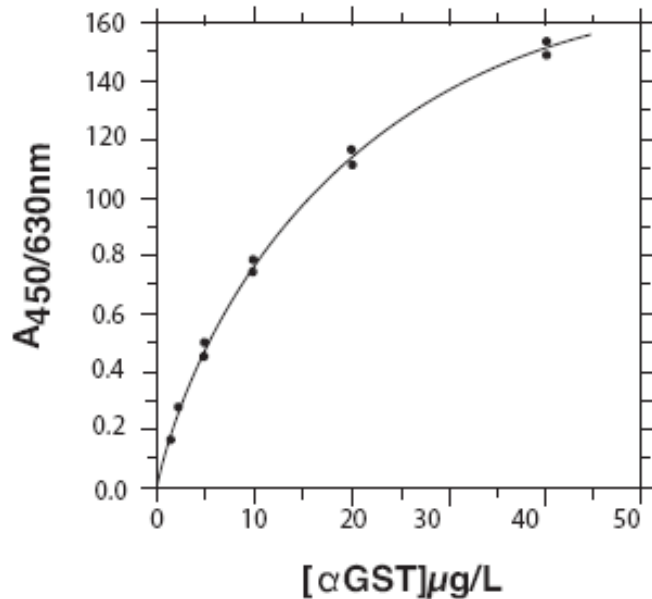
**Tabelle 2.** Inter-assay-Variation des Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha.

Probe	[αGST] µg/L	SD	%VK	n
Niedrig	8,4	0,49	5,81	10
Mittel	37,9	3,07	8,11	10
Hoch	68,7	9,24	13,46	10
PK	10,8	1,35	12,53	10

**Tabelle 3.** Variationsbreite zwischen einzelnen Chargen des NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha, berechnet anhand von drei verschiedenen Chargen des Kits.

Probe	[αGST] µg/L	SD	%VK	n
Niedrig	8,28	1,01	12,16	30
Mittel	34,7	3,79	10,92	30
Hoch	61,6	8,84	14,36	30

## **BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE**



**Abbildung 1:** Typische Kalibrationskurve des Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alpha. Auftragung der Extinktion  $E_{450/630nm}$  versus  $[\alpha\text{GST}]$  in  $\mu\text{g/L}$ , Messbereich 1,25 - 40  $\mu\text{g/L}$   $\alpha\text{GST}$ . Die Nachweisgrenze des Tests beträgt 0,036  $\mu\text{g/L}$  pro Well.

## **GARANTIE**

Die hier präsentierten Leistungsdaten wurden mit der hier beschriebenen Testdurchführung 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.

## **ANHANG 1**

### **Angabe der in das urin Freigesetzten**

Die Freisetzung von  $\alpha\text{GST}$  ist über die Zeit, nicht aber über das Urinvolumen konstant. Daher kann es unter Umständen sachdienlicher sein, die Freisetzung der  $\alpha\text{GST}$  statt als Konzentration ( $\mu\text{g/L}$ ) als Rate ( $\text{ng/min}$ ) anzugeben, z.B. in Situationen mit ungewöhnlicher Diurese wie Oligo- oder Polyurie. Die Freisetzungsrates wird wie folgt ermittelt:

### **Urinsammlung**

Sammeln Sie die Urinproben wie unter "Probenentnahme" beschrieben. Notieren Sie dabei den Zeitpunkt des Harnlassens ( $T_2$ ), den Zeitpunkt des vorherigen Harnlassens ( $T_1$ ) und das Gesamtharnvolumen ( $V$ ).

### **Berechnung Der Freisetzungsrates von $\alpha$ GST:**

1. Bestimmen Sie unter Verwendung des Argutus Medical NEPHKIT<sup>®</sup>-Alphas die  $\alpha$ GST- Konzentration im Urin ( $\mu\text{g/L}$ ).
2. Berechnen Sie den Zeitraum  $T = T_2 - T_1$ , über den der Harn gesammelt wurde, in Minuten.
3. Notieren Sie das Harnvolumen ( $V$ ) in mL.
4. Berechnen Sie daraus die Freisetzungsrates wie folgt:

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

### **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 ( $100\mu\text{L/Well}$ ) in die Wells geben; jeweils Duplikate ansetzen.
- 1.4 Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur ( $20$  bis  $25^\circ\text{C}$ )  $60 \pm 2$  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 ( $250\mu\text{L}$ - $350\mu\text{L/Well}$ ) waschen.
- 2.3  $100\mu\text{L}$  Konjugat/Well zugeben.
- 2.4 Die Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur ( $20$  bis  $25^\circ\text{C}$ )  $30 \pm 2$  Minuten bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
- 2.5 Streifen wie unter Punkt 2.2 beschrieben waschen.

#### **3. Farbentwicklung**




- 3.1 Je  $100\mu\text{L}$  Substrat/Well zugeben und bei Raumtemperatur genau 15 Minuten inkubieren.

#### **4. Stopp**

- 4.1 Die Reaktion mit  $100\mu\text{L}$  Stopplösung/Well abstoppen. Substrat und Stopplösung müssen sich vollständig vermischen
- 4.2 Sofort Extinktion bei  $450\text{nm}$  und (sofern vorhanden) bei einer Referenzwellenlänge von  $630\text{nm}$  messen.

#### **5. Berechnung der Ergebnisse**

## ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE

Bereich der Positivkontrolle	
<i>In vitro</i> -Diagnostikum	
Charge	
Katalog-Nr	
Temperaturbegrenzungen	
Verwendbar Bis	
Hersteller	

## LITERATEUR

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.** and  $\alpha$ - glutathione(1999).  $\alpha$  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 and  $\pi$ diagnosis of early graft dysfunction by urinary excretion of  $\alpha$  glutathione Stransferases in renal transplantation. *JASN* **7(9)**, 1986.
11. **Kievit, J.K. et. al.** (1997). Release of  $\alpha$ -glutathione Stransferase ( $\alpha$ GST) and  $\pi$ -glutathione S-transferase ( $\pi$ 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.
13. **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  $\epsilon$ nzymes 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](mailto:info@argutusmed.com)**

**<http://www.argutusmed.com>**

European Patent no. 787300  
US Patent No.: 6,071,706  
Document Code: NEPA-127-DE-08  
03/09