

CE

REF BIO66NEPHA
Piastra a 96 Pozzetti



ARGUTUS MEDICAL

Nephkit[®] Alpha GST EIA

Dosaggio Immunoenzimatico

ITALIANO

Istruzioni per l'uso

INDICE

INDICAZIONI D'USO	4
INFORMAZIONI PRELIMINARI	4
PRINCIPIO DEL TEST	4
COMPONENTI DEL KIT	5
PRECAUZIONI	6
STABILITÀ E CONSERVAZIONE	7
ULTERIORI MATERIALI RICHIESTI	8
PREPARAZIONE DEI REAGENTI	8
RACCOLTA DEI CAMPIONI	9
TRATTAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	9
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	10
PROCEDURA DEL TEST	10
CALCOLO DEI RISULTATI	11
CRITERI DEL CONTROLLO DI QUALITÀ	12
RESTRIZIONI NELL'USO	12
PRESTAZIONI DEL TEST	12
ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE	14
GARANZIA	14

APPENDICE 1	15
INTERPRETAZIONE DEI SIMBOLI	16
BIBLIOGRAFIA	16

INDICAZIONI D'USO

Il kit Argutus Medical NEPHKIT® Alpha fornisce un metodo per la determinazione quantitativa dell' α -glutathione-S-transferasi (α GST) nell'urina. Per ulteriori informazioni sul dosaggio dell' α GST nella ricerca o in campo non clinico, oppure sul dosaggio di altre classi di GST, contattare Argutus Medical.

INFORMAZIONI PRELIMINARI

Alpha-glutathione-S-transferasi (α GST) si trova nella zona del tubulo prossimale del rene, mentre la presenza della π -glutathione-S-transferasi (π GST) è limitata principalmente ai tubuli distali¹. Negli individui normali l' α GST viene rilasciata nell'urina, come confermato dalle analisi immunoenzimatiche e dal western blot². Qualsiasi evento che danneggi il tubulo prossimale, può provocare un aumento del rilascio di α -GST nell'urina, ed è stato dimostrato che l'aumento dei livelli di α GST nell'urina è associato a un danno al tubulo prossimale. L' α GST presente nell'urina si è dimostrato un valido strumento per valutare le lesioni del tubulo prossimale nei casi di nefrotossicità³⁻⁵, di tossicità ambientale⁶, di chirurgia, di insufficienza renale acuta⁸ e di trapianto⁹⁻¹².

Poiché è stato dimostrato che il rilascio della π -GST è associato con danni al tubulo distale⁶, la misura simultanea di α - e π -GST consente di appurare se il danno in questione riguarda il tubulo prossimale o quello distale^{5,9-11}, ad esempio nei casi di nefrotossicità⁵, insufficienza renale acuta⁸, rigetto del trapianto⁹⁻¹⁰, lesioni da ischemia/riperfusion⁹⁻¹¹ e diabete¹³.

Le GST presenti nell'urina sono indicatori sensibili delle lesioni renali in corso e possono presentare effetti renali, mentre altri biomarcatori (come la creatinina serica o il BUN (azoto ureico ematico) restano invariati³⁻⁵.

PRINCIPIO DEL TEST

Il kit Argutus Medical NEPHKIT® Alpha è un test immunoenzimatico quantitativo. La procedura del test si basa sull'aggiunta in sequenza dei campioni, dell'enzima coniugato e del substrato ai pozzetti della micropiastra rivestiti di IgG anti- α GST. L'intensità del colore risultante è proporzionale alla quantità di α GST presente nel campione. Il range di dosaggio è compreso tra 1,25 e 40 μ g/L.

COMPONENTI DEL KIT

- | | | | | |
|---|--|---------|------|-----|
| 1. Micropiastra rivestita con anticorpo
12x8 microstrip con pozzetti rivestiti con IgG anti- α GST.
Pozzetti separabili.
PRONTA PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">PLA</td></tr></table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| 2. Calibratore della GST
α GST purificata in diluente stabilizzante (200 μ L).
Contiene timerosal e sodio azide.
SOLUZIONE STOCK | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">CAL</td></tr></table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| 3. Controllo positivo
α GST in soluzione contenente proteine con
aggiunta di stabilizzanti (4,5mL).
Contiene timerosal e sodio azide.
PRONTO PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">CONTROL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr></table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| 4. Coniugato concentrato
51x IgG anti- α GST coniugata con
perossidasi di rafano (300 μ L).
Contiene timerosal.
CONCENTRATO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">CONJ</td><td style="text-align: center;">51X</td></tr></table> | CONJ | 51X | |
| CONJ | 51X | | | |
| 5. Tampone per il lavaggio concentrato
20x tampone fosfato salino Tween-20
(PBST 55mL).
Contiene timerosal.
CONCENTRATO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">BUF</td><td style="text-align: center;">WASH</td><td style="text-align: center;">20X</td></tr></table> | BUF | WASH | 20X |
| BUF | WASH | 20X | | |
| 6. Substrato TMB (tetrametilbenzidina)
Soluzione liquida stabilizzata di TMB (11mL).
PRONTO PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">SUBS</td><td style="text-align: center;">TMB</td></tr></table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| 7. Soluzione di arresto
0,5 mol/L di acido solforico (11mL).
PRONTA PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">SOLN</td><td style="text-align: center;">STP</td></tr></table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| 8. Diluente per il campione
Soluzione contenente proteina (50mL).
Contiene sodio azide.
PRONTO PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">DIL</td><td style="text-align: center;">SPE</td></tr></table> | DIL | SPE | |
| DIL | SPE | | | |
| 9. Tampone stabilizzante per l'urina
Contiene timerosal e sodio azide (10mL).
PRONTO PER L'USO | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">BUF</td><td style="text-align: center;">NEPH</td></tr></table> | BUF | NEPH | |
| BUF | NEPH | | | |
| 10. Foglio illustrativo del prodotto Istruzioni per l'uso | <table border="1"><tr><td style="text-align: center;">INS</td></tr></table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUZIONI

SICUREZZA

- Il kit EIA Alpha GST Urinario di Argutus Medical è destinato esclusivamente all'uso diagnostico invitro.
- Il kit EIA Alpha GST Urinario di Argutus Medical deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.
- Il kit contiene materiale di origine umana, testato e risultato negativo al DNA dell'epatite B, all'RNA dell'HCV e all'RNA dell'HIV. Tuttavia, poiché nessun test può essere interamente affidabile, si consiglia di trattare tutti i materiali come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono timerosal, una sostanza la cui ingestione ha effetti tossici.
- Anche la soluzione di arresto contiene acido solforico, una sostanza corrosiva. Evitare il contatto con la cute e gli occhi. In caso di contatto, sciacquare immediatamente con acqua e consultare un medico.
- Il substrato contiene TMB, una sostanza che può irritare la cute e le membrane mucose. Se una qualsiasi quantità di substrato viene a contatto con la cute, deve essere sciacquata con acqua.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide, una sostanza in grado di formare azidi metallici al contatto con tubature di piombo o di rame. Per smaltire i reagenti, sciacquare con un abbondante volume di acqua, in modo da evitare la formazione di azidi.
- Nello smaltimento dei campioni clinici, del materiale infetto o potenzialmente infetto, procedere in conformità con la buona pratica di laboratorio. I suddetti materiali devono essere trattati e smaltiti come potenzialmente infetti.
- Sostanze chimiche residue, preparati e componenti del kit sono generalmente considerati pericolosi. Tali materiali devono essere smaltiti in conformità con le procedure di sicurezza riconosciute.
- Durante il trattamento dei campioni e l'esecuzione del test, indossare indumenti protettivi, guanti di lattice monouso e una mascherina di protezione per gli occhi. Lavarsi accuratamente le mani alla fine dell'operazione.
- Non pipettare i materiali a bocca ed evitare sempre di mangiare o bere sulle superfici di lavoro di laboratorio.

PROCEDURA

- Per i progetti di studi clinici, Argutus Medical consiglia agli utenti di analizzare tutti i campioni con kit dello stesso numero di lotto per la massima coerenza dello studio.
- Non utilizzare né il kit, né i singoli reagenti dopo la data di scadenza.
- Non mescolare o sostituire reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Qualsiasi modifica rispetto al protocollo fornito può dare luogo a risultati erranei.
- Se l'esecuzione del dosaggio non rientra nei range di tempo e di temperatura indicati, i risultati ottenuti possono non essere validi. I dosaggi che non rientrano nei range di tempo e di temperatura indicati devono essere ripetuti.

- Pipettare il reagente a metà della parete del pozzetto, facendo attenzione a non graffiare la parete con il puntale della pipetta.
- Non lasciare asciugare i pozzetti in nessuna fase della procedura di dosaggio.
- Fare attenzione a non contaminare i componenti e utilizzare sempre nuovi puntali per la pipetta ad ogni campione e componente.
- Non utilizzare i reagenti che appaiono torbidi o che sono precipitati dalla soluzione.
- Assicurarsi che il tampone per il lavaggio concentrato sia ben mescolato e che non restino cristalli prima della ricostituzione.
- La soluzione di lavaggio richiede acqua distillata o deionizzata di alta qualità. L'impiego di acqua di scarsa qualità o contaminata può dare luogo alla presenza di un colore di fondo nel dosaggio.
- Portare tutti reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non lasciare i reagenti a contatto diretto con la luce e/o a una temperatura superiore ai 2-8°C per periodi prolungati.
- Per la preparazione dei reagenti, utilizzare sempre recipienti di vetro puliti, preferibilmente monouso.
- Eliminare costantemente le goccioline dalla superficie superiore dei pozzetti. Asciugarle delicatamente al termine di ogni fase della procedura.
- Prima della lettura, assicurarsi che la superficie inferiore della piastra sia pulita e asciutta.
- Prima di iniziare il dosaggio, definire uno schema di identificazione e distribuzione.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

1. Tutti i reagenti del kit devono essere conservati a 2-8°C e si mantengono stabili nelle condizioni di fornitura fino alla data di scadenza indicata.
2. I calibratori dell' α GST devono essere utilizzati entro 30 minuti dalla preparazione.
3. Una volta preparata, la soluzione per il lavaggio (PBST) rimane stabile fino a due settimane a temperatura ambiente e fino a un mese a 2-8°C.
4. Evitare la conservazione prolungata del coniugato diluito a temperatura ambiente. Utilizzare subito dopo la preparazione.
5. Le microstrip della piastra devono essere conservate in buste sigillate con essiccante a 2-8°C fino al momento dell'utilizzo. Reinserire i pozzetti inutilizzati nella busta insieme all'essiccante.

ULTERIORI MATERIALI RICHIESTI

1. Micropipette (da 5µL a 50µL, da 50µL a 200µL e da 200µL a 1000µL) e una pipette multicanale (da 50µL a 200µL).
2. Dispositivo di lavaggio per le microstrip.
3. Lettore per piastra ELISA dotato di filtro a 450nm e filtro di riferimento a 630nm, se disponibile.
4. Beaker da 1L.
5. Timer.
6. Vaschetta per liquid.
7. Acqua deionizzata/distillate.
8. Agitatore per piastra.
9. Cilindro graduato.
10. Provette da tes.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. SOLUZIONE DI LAVAGGIO (PBST)

Diluire 1:20 il tampone di lavaggio concentrato, aggiungendo, ad esempio, 10mL di tampone di lavaggio concentrato a 190mL di acqua deionizzata, come richiesto. Preparare solo il volume di soluzione di lavaggio necessario per il dosaggio.

Prima di procedere alla diluizione, assicurarsi che i cristalli di sali siano disciolti (riscaldare delicatamente il concentrato per il lavaggio a 37°C per 30 minuti favorirà la dissoluzione dei cristalli di sali.)

2. CALIBRATORI

Preparare il calibratore (A) a partire dalla soluzione stock di αGST.

Stock:	25µL
Diluyente per il campione:	<u>2500µL</u>
Totale:	2525µL (A)

Preparare gli altri calibratori utilizzando delle provette etichettate come riportato di seguito:

Equivalent Calibratore Concentration	Volume Calibratore (µL)	Volume di Diluyente per il Campione (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. CONIUGATO

Immediatamente prima dell'uso, diluire il coniugato concentrato 1:51, aggiungendo 20µL di coniugato a 1mL di soluzione per il lavaggio per ogni microstrip. Per ogni striscia sono necessari 1020 µL di coniugato preparato.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha può essere utilizzato per misurare l'αGST in qualsiasi campione di urina; tuttavia, a causa della variazione diurna della proteinuria¹⁴, per ottenere dei risultati ottimali è necessario raccogliere dei campioni notturni quantitativi ad orari prefissati, registrando il momento della raccolta e il volume. Ciò consentirà di esprimere in termini di tasso (ng/min) il rilascio dell'αGST nell'urina. Vedere appendice 1.

Per l'impiego di altri metodi e momenti di raccolta, contattare Argutus Medical.

Nel più breve tempo possibile dopo la raccolta del campione, aggiungere 200µL di tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®] a 800µL di urina (diluizione del campione 4:5), anche se i campioni non devono essere conservati.

TRATTAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Non conservare i campioni senza aver aggiunto il tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®]. Il tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®] deve essere aggiunto entro 12 ore dalla raccolta del campione.

Si raccomanda di eseguire il dosaggio dei campioni nel più breve tempo possibile dopo la raccolta. Tuttavia, dopo l'aggiunta del tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®], i campioni possono essere conservati a 2-8°C per una settimana o a -20°C fino a 28 giorni. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo. Senza l'aggiunta del tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®], il congelamento può ridurre fino al 70% i livelli di GST nell'urina (in base alla misurazione mediante EIA). Tale calo delle GST presenti nell'urina è dovuto molto probabilmente alla denaturazione durante il ciclo congelamento-scongelo.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Immediatamente prima di eseguire il dosaggio, diluire i campioni 1:2, aggiungendo 200µL di soluzione di urina stabilizzata a 200µL di diluente per il campione. Nel caso in cui occorra eseguire un'aggiunta multipla di campioni (campioni in duplicato >10), per facilitarne il trasferimento nella piastra per il dosaggio, è possibile diluire i campioni in una micropiastra vuota, con un'adeguata correzione del volume. Per il controllo positivo non richiede diluizione.

PROCEDURA DEL TEST

N.B.: prima di iniziare il dosaggio, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

1. INCUBAZIONE DEL CAMPIONE /CALIBRATORE

- 1.1 Preparare la soluzione di lavaggio e i calibratori come indicato nella sezione "Preparazione dei reagenti".
- 1.2 Preparare i campioni come indicato nella sezione "Preparazione dei campioni".
- 1.3 Inserire nella piastra il numero di pozzetti necessari per il dosaggio (14 per i calibratori, più due per ogni controllo e campione). Alloggiarli in file da 8 e riempire gli spazi tra le file con pozzetti da vuoti. Aggiungere nei pozzetti della piastra i calibratori (**G-A; concentrazione equivalente a 0-40µg/L**), il controllo positivo e i campioni diluiti (**100µL/pozzetto**), in duplicato.
- 1.4 Coprire la piastra e incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per 60 +/- 2 minuti, agitando uniformemente.
N.B.: è stato utilizzato un agitatore Titer-Plate della Lab-line Instruments, a velocità 2-3.

2. INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

- 2.1 Dopo 55 minuti preparare il coniugato come indicato nella sezione "Preparazione dei reagenti".
- 2.2 Rimuovere il coperchio e lavare 4 volte ogni microstrip con la soluzione di lavaggio (**250µL– 350µL/pozzetto**). Al termine dell'operazione, sbattere la piastra sulla carta assorbente, in modo da rimuovere completamente dai pozzetti la soluzione di lavaggio.
N.B.: è possibile eseguire sia il lavaggio automatico, sia quello manuale.
- 2.3 Aggiungere **100µL** di coniugato in ogni pozzetto.
- 2.4 Coprire nuovamente la piastra e incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per **30 +/- 2 minuti**, agitando uniformemente.
N.B.: è stato utilizzato un agitatore Titer-Plate della Lab-line Instruments, a velocità 2-3.
- 2.5 Lavare le strip come indicato al punto 2.2.

3. SVILUPPO DEL COLORE

- 3.1 Aggiungere **100µL** di substrato in ogni pozzetto utilizzando una pipetta multicanale e incubare al buio a temperatura ambiente per 15 minuti esatti.

4. ARRESTO

- 4.1 Aggiungere **100 μ L** di soluzione di arresto in ogni pozzetto utilizzando una pipette multicanale. Assicurarsi che il substrato e la soluzione di arresto siano ben esclusati.
- 4.2 Leggere **immediatamente** a 450nm, utilizzando come riferimento la lunghezza d'onda di 630nm (se disponibile).

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare l'assorbanza media di ciascun calibratore, controllo e campione.
2. Tracciare una curva di calibrazione con $A_{450/630nm}$ versus $[\alpha\text{GST}] \mu\text{g/L}$. La curva deve avere un andamento simile a quello della Figura 1.
3. Leggere l' $[\alpha\text{-GST}] (\mu\text{g/L})$ indicata dalle assorbanze medie dei campioni in base alla curva di calibrazione.
4. Moltiplicare l' $[\alpha\text{-GST}]$ calcolata per il fattore di diluizione appropriato, in modo da ottenere l' $[\alpha\text{-GST}]$ effettiva. Per compensare la diluizione del campione mediante il tampone stabilizzante dell'urina NEPHKIT[®], i risultati relativi ai campioni devono essere moltiplicati per un valore aggiuntivo di 1,25.
5. La concentrazione del controllo positivo deve essere letta direttamente dalla curva.
6. Per le istruzioni relative all'espressione del rilascio dell' αGST in termini di tasso (ng/min), si rimanda all'appendice 1.
7. Le concentrazioni di campioni con valori al di fuori della curva standard non sono valide e devono essere ripetute con un fattore di diluizione più elevato. L'estrapolazione dei dati non è accettabile.

CRITERI DEL CONTROLLO DI QUALITÀ

Per accertare la validità dei risultati, il controllo positivo deve essere sempre incluso. I risultati possono essere considerati validi se il valore del controllo positivo è compreso nel range indicato all'interno del coperchio della scatola. Se tale criterio non è soddisfatto, il dosaggio deve essere considerato come non valido ed essere ripetuto.

RESTRIZIONI NELL'USO

I risultati devono essere correlati al profilo clinic del paziente e ad altri risultati clinici di laboratorio.

PRESTAZIONI DEL TEST RANGE DI RIFERIMENTO

La raccolta di campioni di urina notturni quantitative e ad orari prefissati a eseguita su 38 individui sani, con un'età compresa tra i 18 e i 46 anni.

Il rilascio di α GST nell'urina osservato è stato il seguente:

In termini di tasso (ng/min)	
Medio	3,0ng/min
Medio + 2SD (deviazione standard)	12,2ng/min
In termini di concentrazione (μ g/L)	
Medio	3,5 μ g/ L
Medio + 2SD	11,1 μ g/ L

Si raccomanda a ciascun utilizzatore di sviluppare un range di riferimento specifico per ogni gruppo di studio.

LIMITE DI RILEVAMENTO

Il limite di rilevamento del kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha è di 0,036 μ g/L misurato nel pozzetto, equivalente a 0,09 μ g/L nel campione.

RANGE DI MISURA

La curva standard copre da 1,25-40 μ g/L, equivalent a 3,25-100 μ g/L nei campioni stabilizzati 4:5 con il tampone stabilizzante e diluiti 1:2 con il diluente del campione. Tale range può essere esteso aumentando la diluizione del campione.

SPECIFICITÀ

Il kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha è altamente specific nella determinazione di α GST. Non è stata osservata alcuna reattività crociata significativa né con la Mu GST, né con gli isomeri Pi della GST.

INTERFERENZE

Nel presente dosaggio non è stata osservata alcuna interferenza significativa con i campioni emolitici o itterici. Campioni emolitici: meno del 14% di interferenza, con dosi di emoglobina nel campione fino a 1,17g/L. Campioni itterici: meno dell'11% di interferenza, con dosi di bilirubina nel campione fino a 5mg/mL. Studi interni hanno dimostrato che i campioni di urina con un pH compreso tra 4-9 non influiscono sulle prestazioni del dosaggio. Per ulteriori informazioni contattare Argutus Medical.

RIPRODUCIBILITÀ

Tabella 1. Variazione intradosaggio del kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha

Campione	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Bassa	9,03	0,65	7,18	20
Media	33,4	2,48	7,43	20
Alta	59,1	5,47	9,24	20

Tabella 2. Variazione interdosaggio del kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha

Campione	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Bassa	8,4	0,49	5,81	10
Media	37,9	3,07	8,11	10
Alta	68,7	9,24	1,46	10
PC (controllo positivo)	10,8	1,35	12,53	10

Tabella 3. Variazione lotto/lotto del kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha calcolata in base a tre lotti di kit.

Campione	[αGST] µg/L	SD	%CV	n
Bassa	8,28	1,01	12,16	30
Media	34,7	3,79	10,92	30
Alta	61,6	8,84	14,36	30

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE

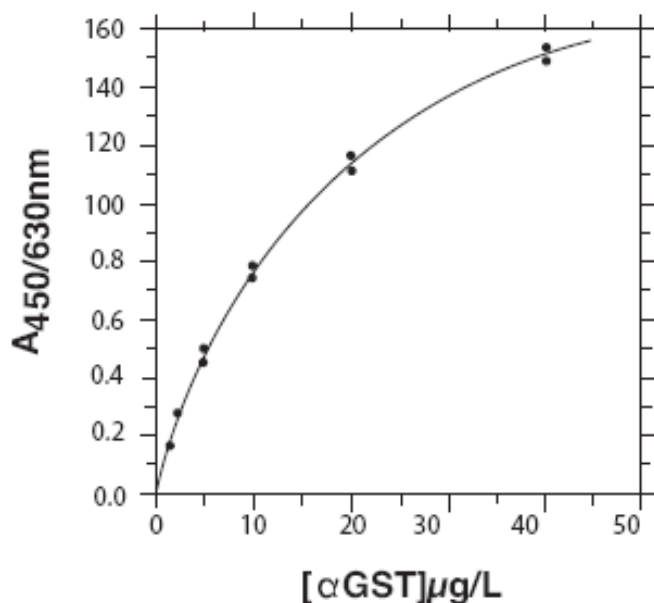


Figura 1: Tipica curva di calibrazione ottenuta utilizzando il kit Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha. Tracciato di A_{450/630nm} versus [α-GST] μg/L. Il range di dosaggio è di 1,25-40μg/L di α-GST. Il limite di rilevamento del dosaggio è di 0,036μg/L misurato nel pozzetto.

GARANZIA

I dati relativi alle prestazioni qui presentati sono stati ottenuti seguendo la procedura descritta. Qualsiasi variazione o modifica della procedura non raccomandata da Argutus Medical può influenzare il risultato; in tal caso Argutus Medical non riconosce alcuna garanzia, espressa, implicita o ufficiale, inclusa la commerciabilità implicita e l'idoneità all'uso. In tal caso la Argutus Medical non sarà responsabile per i danni, diretti o derivanti.

APPENDICE 1

ESPRESSIONE IN TERMINI DI TASSO DEL RILASCIO DELL'αGST NELL' URINA

Il rilascio dell'αGST è costante rispetto al tempo di escrezione, e non al volume dell'urina. Ciò significa che può essere più rilevante esprimere il rilascio dell'αGST in termini di tasso (ng/min), piuttosto che in termini di concentrazione. Tale valutazione può essere importante nei casi di diuresi atipica, come l'oliguria o la poliuria. Il tasso di rilascio si ottiene nel seguente modo:

RACCOLTA DELL'URINA

Raccogliere l'urina come indicato nella sezione "Trattamento e raccolta dei campioni". Registrare l'ora della minzione (T2), l'ora della minzione precedente (T1) e il volume di urina totale (V).

CALCOLO DEL TASSO DI RILASCIO DELL'α-GST:

1. Determinare i livelli di αGST presente nell'urina mediante il kit Argutus Medical NEPHKIT® Alpha (µg/L).
2. Calcolare in minuti il periodo durante il quale è stata raccolta l'urina $T = T2 - T1$.
3. Registrare il volume di urina in mL (V).
4. Calcolare il tasso di rilascio nel seguente modo:

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

RIASSUNTO DELLA PROCEDURA DEL TEST

1. INCUBAZIONE DEL CAMPIONE/CALIBRATORE

- 1.1 Preparare la soluzione di lavaggio e i calibratori.
- 1.2 Preparare i campioni.
- 1.3 Inserire nella piastra i pozzetti per il dosaggio. Aggiungere nella piastra i calibratori, il controllo positivo e i campioni diluiti (100µL/pozzetto), in duplicato.
- 1.4 Coprire la piastra e incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per 60 +/- 2 minuti agitando uniformemente.

2. INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

- 2.1 Dopo 55 minuti, preparare il coniugato come indicato nella sezione "Preparazione dei reagenti"
- 2.2 Rimuovere il coperchio e lavare 4 volte ogni strip con la soluzione di lavaggio (250µL-350µL/pozzetto).
- 2.3 Aggiungere 100 µL di coniugato in ogni pozzetto.
- 2.4 Coprire nuovamente la piastra e incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 +/- 2 minuti agitando uniformemente.
- 2.5 Lavare ogni strip come indicato al punto.

3. SVILUPPO DEL COLORE

- 3.1 Aggiungere 100µL di substrato in ogni pozzetto e incubare al buio a temperatura ambiente per 15 minuti esatti.

4. ARRESTO

- 4.1 Aggiungere 100µL di soluzione di arresto in ogni pozzetto. Assicurarsi che il substrato e la soluzione di arresto siano ben mescolati.
- 4.2 Leggere immediatamente a 450nm, usando come riferimento la lunghezza d'onda di 630 nm (se disponibile)

5. CALCOLO DEI RISULTATI

INTERPRETAZIONE DEI SIMBOLI

Range del controllo positivo



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*



Codice del lotto



Numero di catalogo



Limite di temperatura



Usare entro



Produttore



BIBLIOGRAFIA

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 S-transferases 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 S-transferases in renal transplantation. *JASN* **7(9)**, 1986.
11. **Kievit, J.K. et al.** (1997). Release of α -glutathione S-transferase (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.
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 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-IT-08
03/09