

CE

REF BIO66NEPHA
Placa de 96 Pocos



ARGUTUS MEDICAL

Nephkit[®] Alpha GST EIA

Imunoensaio Enzimático

PORTUGUÊS

Instruções de utilização

ÍNDICE

INDICAÇÕES DE UTILIZAÇÃO	4
FUNDAMENTAÇÃO	4
PRINCÍPIO DO ENSAIO	4
COMPONENTES	5
PRECAUÇÕES	6
ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO	7
OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS	7
PREPARAÇÃO DOS REAGENTES	8
COLHEITA DE AMOSTRAS	9
MANIPULAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS	9
PREPARAÇÃO DOS AMOSTRAS	9
PROCEDIMENTO DE ENSAIO	10
CÁLCULO DOS RESULTADOS	11
CRITÉRIOS DE CONTROLO DE QUALIDADE (CQ)	11
LIMITAÇÕES DA UTILIZAÇÃO	11
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	12
EXEMPLO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	14
GARANTIA	14

APÊNDICE 1	14
RESUMO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO	15
INTERPRETAÇÃO DOS SÍMBOLOS	16
BIBLIOGRAFIA	16

INDICAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Argutus Medical NEPHKIT® Alpha proporciona um método para a determinação quantitativa da alfa-glutationa S-transferase (α GST) na urina. Queira contactar a Argutus Medical para mais informações no que respeita ao ensaio da α GST nos campos de investigação/campos não clínicos ou ao ensaio de outras classes de GST.

FUNDAMENTAÇÃO

A alfa-glutationa S-transferase (α GST) é detectada na zona dos túbulos proximais dos rins, enquanto que a pi-glutationa S-transferase (π GST) é libertada principalmente aos túbulos distais¹. A α GST é libertada na urina, em indivíduos normais, tal como confirmado por imunoensaio e western blot². Qualquer reacção que provoque a lesão dos túbulos proximais pode causar o aumento da libertação da α GST na urina e demonstrou-se que o aumento dos níveis urinários de α GST está associado a lesão dos túbulos proximais. Verificouse que o α GST urinária é uma ferramenta valiosa para estudar a lesão tubular proximal na nefrotoxicidade³⁻⁵, toxicidade ambiental⁶, cirurgia⁷, insuficiência renal aguda⁸ e transplantação⁹⁻¹².

Demonstrou-se que a libertação de π GST está associada a lesão tubular distal⁶ e, portanto, a determinação simultânea das α e π GST pode permitir a discriminação entre lesão tubular proximal e distal^{5,9-11} na nefrotoxicidade⁵, insuficiência renal aguda⁸, rejeição de transplante⁹⁻¹⁰, lesão por isquemia-reperfusão⁹⁻¹¹ e diabetes¹³.

As GSTs urinárias são indicadores sensíveis de lesão renal corrente e podem revelar efeitos renais enquanto outros biomarcadores, como a creatinina sérica e o azoto da ureia sanguínea (BUN), permanecem inalterados³⁻⁵.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Argutus Medical NEPHKIT® Alpha é um ensaio imunoenzimático quantitativo. O procedimento de ensaio baseia-se na adição sequencial de amostra, enzima-conjugado e substrato a poços de Microensaio revestidos com IgG anti- α GST. A intensidade da cor resultante é proporcional à quantidade de α GST presente na amostra. O intervalo do ensaio é de 1,25-40 μ g/L.

COMPONENTES

- | | | | | |
|--|--|---------|------|-----|
| 1. Placa de Microensaio revestida com anticorpo
12 x 8 tiras de poços revestidos com IgG anti α GST.
Poços quebráveis.
PRONTO A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">PLA</td></tr></table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| 2. Calibrador de GST
α GST purificada em diluente estabilizador (200 μ L).
Contém tiomersal e azida sódica.
SOLUÇÃO BASE | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">CAL</td></tr></table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| 3. Controlo Positivo
α GST em solução contendo
proteínas às quais se adicionaram
estabilizadores (4,5mL).
Contém tiomersal e azida sódica.
PRONTO A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">CONTROL</td><td style="padding: 2px;">+</td></tr></table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| 4. Concentrado Conjugado
51 x IgG anti- α GST conjugada com
peroxidase de rábano (300 μ L).
Contém tiomersal.
CONCENTRADO | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">CONJ</td><td style="padding: 2px;">51X</td></tr></table> | CONJ | 51X | |
| CONJ | 51X | | | |
| 5. Concentrado de Lavagem
20x Solução salina com tampão
fosfato/Tween-20 (PBST 55mL).
Contém tiomersal.
CONCENTRADO | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">BUF</td><td style="padding: 2px;">WASH</td><td style="padding: 2px;">20X</td></tr></table> | BUF | WASH | 20X |
| BUF | WASH | 20X | | |
| 6. Substrato de TMB
Solução estabilizada de TMB líquido (11mL).
PRONTA A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">SUBS</td><td style="padding: 2px;">TMB</td></tr></table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| 7. Solução de paragem
Ácido sulfúrico a 0,5 mol/L (11mL).
PRONTA A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">SOLN</td><td style="padding: 2px;">STP</td></tr></table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| 8. Diluente da Amostra
Solução contendo proteínas (50mL).
Contém azida sódica.
PRONTO A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">DIL</td><td style="padding: 2px;">SPE</td></tr></table> | DIL | SPE | |
| DIL | SPE | | | |
| 9. Tampão Estabilizador da Urina
Contém tiomersal e azida sódica (10mL).
PRONTO A USAR | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">BUF</td><td style="padding: 2px;">NEPH</td></tr></table> | BUF | NEPH | |
| BUF | NEPH | | | |
| 10. Instruções de utilização | <table border="1"><tr><td style="padding: 2px;">INS</td></tr></table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUÇÕES

DE SEGURANÇA

- O kit do Argutus Medical NEPHKIT® Alpha está indicado apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- O kit do Argutus Medical NEPHKIT® Alpha destina-se a ser utilizado apenas por pessoal de laboratório qualificado.
- O kit contém material de origem humana que foi analisado, tendo-se verificado que é negativo para o DNA da hepatite B, o RNA do HCV e o RNA do HIV. Contudo, como nenhum teste pode fornecer uma garantia total, devem tratar-se todos os materiais como potencialmente infecciosos.
- Alguns reagentes contêm tiomersal, que pode ser tóxico se ingerido.
- A Solução de Paragem contém ácido sulfúrico que é corrosivo. Evite o contacto com a pele e os olhos. Se este ocorrer, lave imediatamente com água e consulte um médico.
- O substrato contém TMB, que pode irritar a pele e as membranas mucosas. Todo o substrato que entrar em contacto com a pele deve ser eliminado por lavagem com água.
- Alguns reagentes contêm azida sódica, que pode formar azidas metálicas com o chumbo e cobre dos tubos, as quais são potencialmente explosivas. Os reagentes, para serem eliminados, devem ser lavados com grandes volumes de água para impedir a acumulação de azidas.
- Elimine todos os espécimes clínicos, material infectado ou potencialmente infectado de acordo com as boas práticas de laboratório. Todos estes materiais devem ser manipulados e eliminados como sendo potencialmente infecciosos.
- Os resíduos de produtos químicos, preparações e componentes do kit devem ser geralmente considerados como lixos perigosos. Todos estes materiais devem ser eliminados de acordo com os procedimentos de segurança estabelecidos.
- Use vestuário protector, luvas de latex descartáveis e protecção ocular quando estiver a manipular os espécimes e a efectuar o ensaio. Lave muito bem as mãos quando tiver terminado.
- Não pipete materiais com a boca e nunca coma ou beba na bancada do laboratório.

DURANTE O PROCEDIMENTO

- A Argutus Medical recomenda que, nos projectos de ensaios clínicos, os utilizadores analisem todas as amostras com o mesmo número de lote do kit para se obter a máxima consistência no estudo.
- Não utilize um kit ou reagentes individuais cujo prazo de validade tenha expirado.
- Não misture ou substitua reagentes de kits com números de lote diferentes.
- O desvio do protocolo fornecido pode produzir resultados errados.
- Arealização do ensaio fora dos limites de tempo e temperatura dados pode produzir resultados inválidos. Os ensaios que não estejam dentro dos limites de tempo e temperatura estabelecidos devem ser repetidos.
- Adistribuição dos reagentes deve ser dirigida para o ponto médio do lado dos poços, tendo o cuidado de não riscar os lados com a ponta da pipeta.
- Nunca deixe que os poços sequem durante o procedimento do ensaio.

- Deve ter-se o cuidado de não contaminar os componentes e de utilizar sempre pontas de pipeta novas para cada amostra e componente.
- Não utilize reagentes que estejam turvos ou cuja solução tenha precipitado.
- Certifique-se de que o Concentrado de Lavagem é muito bem misturado e que não existem cristais, antes da reconstituição.
- É necessária água destilada ou desionizada de alta qualidade para a Solução de Lavagem. A utilização de água de má qualidade ou contaminada pode produzir uma coloração de fundo no ensaio.
- Deixe que os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C) e misture bem antes de utilizar.
- Evite deixar os reagentes à luz solar directa e/ou acima de 2-8°C durante períodos prolongados.
- Utilize sempre material de vidro limpo, de preferência descartável, para a preparação de todos os reagentes.
- Certifique-se de que a superfície inferior da placa está limpa e seca antes da leitura.
- Antes de iniciar o ensaio, deve ser estabelecido um plano de identificação e de distribuição.

ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO

1. Todos os reagentes do kit devem ser conservados a 2-8°C e são estáveis na forma fornecida até ao prazo de validade indicado.
2. Os Calibradores de α GST devem ser utilizados decorridos 30 minutos após a preparação.
3. A Solução de Lavagem preparada (PBST) é estável à temperatura ambiente durante um período até duas semanas e até um mês a 2-8°C.
4. Deve evitar-se conservação prolongada do Conjugado diluído à temperatura ambiente. Utilize imediatamente após a preparação.
5. Os poços de ensaio das placas devem ser conservados em sacos vedados com exsiccantes a 2-8°C até ser necessário utilizá-los. Torne a colocar os poços não utilizados no saco de conservação com o exsiccante.

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

1. Micropipetas (5 μ L a 50 μ L, 50 μ L a 200 μ L e 200 μ L a 1000 μ L) e uma pipeta multicanal (50 μ L a 200 μ L).
2. Sistema de lavagem das tiras de microensaio.
3. Leitor de placas ELISA capaz de ler a 450nm com referência a 630nm, se disponível.
4. Copo graduado de 1L.
5. Cronómetro.
6. Tina de líquido.
7. Água desionizada/destilada.
8. Agitador de placas.
9. Proveta graduada.
10. Tubos de ensaio.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. SOLUÇÃO DE LAVAGEM (PBST)

Faça uma diluição de 1/20 do Concentrado de Lavagem adicionando, por exemplo, 10mL de Concentrado de Lavagem a 190mL de água desionizada conforme necessário. Prepare apenas o volume de Solução de Lavagem necessário para o ensaio. Antes da diluição certifique-se de que os cristais de sal estão dissolvidos. (O aquecimento cuidadoso de Concentrado de Lavagem a 37°C durante 30 minutos ajuda a dissolver os cristais de sal.)

2. CALIBRADORES

Prepare o Calibrador (A) a partir da solução mãe de α GST.

Solução base:	25 μ L
Diluyente da amostra:	<u>2500μL</u>
Total:	2525 μ L (A)

Utilizando tubos de ensaio rotulados, prepare outros calibradores como se segue

Concentração equivalente do Calibrador	Volume de Calibrador (μL)	Volume do Solução da Amostra (mL)
40 μ g/L (A)	500 (A)	-
20 μ g/L (B)	500 (A)	500
10 μ g/L (C)	500 (B)	500
5 μ g/L (D)	500 (C)	500
2.5 μ g/L (E)	500 (D)	500
1.25 μ g/L (F)	500 (E)	500
0 μ g/L (G)	-	500

3. CONJUGADO

Imediatamente antes de utilizar, dilua o Concentrado do Conjugado a 1/51 adicionando 20 μ L de Conjugado a 1 mL de Solução de Lavagem por tira de Microensaio. Cada tira requer 1020 μ L de conjugado preparado.

COLHEITA DE AMOSTRAS

O Ensaio Imunoenzimático da Alfa-GST Urinária da Argutus Medical pode ser utilizado para determinar a α GST em qualquer amostra de urina, mas, devido à variação diurna da proteinúria¹⁴, é importante para se obterem os melhores resultados proceder-se à colheita de amostras de urina quantitativas, em intervalos definidos durante a noite. Deste modo é possível exprimir a libertação urinária de α GST como taxa (ng/min). Ver o Apêndice 1.

No que respeita à utilização de outros métodos e períodos de colheita, contacte a Argutus Medical International para informações.

Assim que for possível, após a colheita de urina, adicione 200 μ l do Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®] a 800 μ l de urina (diluição da amostra de 4/5) mesmo que não esteja planeado conservar as amostras.

MANIPULAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Não conserve amostras sem ter adicionado o Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®]. O Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®] deve ser adicionado no período de 12 horas após colheita da urina.

Recomenda-se que as amostras sejam analisadas logo que for possível após a colheita. Contudo, após a adição de Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®], as amostras podem ser conservadas a 2-8°C durante uma semana ou a -20°C durante um período até 28 dias.

Deve evitar-se a congelação-descongelação repetida. Na ausência de Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®], a congelação pode reduzir os níveis de GST na urina até 70% de acordo com as determinações por EIA. Esta diminuição da GST urinária é mais provavelmente causada por desnaturação durante o ciclo de congelação-descongelação.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Imediatamente antes do ensaio, dilua as amostras a 1/2 adicionando 200 μ L de solução de urina estabilizada a 200 μ L de Diluente da Amostra. Se tiverem de ser efectuadas adições múltiplas da amostra (>10 amostras repetidas), de modo a facilitar a transferência para a placa do ensaio, podem diluir-se as amostras numa placa de Microensaio de branco efectuando-se o ajuste apropriado do volume. O Controlo Positivo não necessita de diluição.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

NOTA: Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes do início do ensaio.

1. INCUBAÇÃO DA AMOSTRA / CALIBRADOR

- 1.1 Prepare a Solução de Lavagem e os Calibradores conforme descrito em "Preparação de Reagentes".
- 1.2 Prepare as amostras conforme descrito em "Preparação da amostra".
- 1.3 Coloque o número necessário de poços de Microensaio na placa do ensaio (14 para os Calibradores mais dois para cada Controlo e amostras). Disponha em colunas de 8 e preencha os espaços entre as colunas com poços não revestidos. Adicione em duplicado os Calibradores (**G-A; concentração equivalente de 0-40µg/L**), os controlos e as amostras (100µL/poço) na placa de Microensaio.
- 1.4 Cubra a placa de Microensaio e incube à temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 +/- 2 minutos** com uma agitação uniforme.
Nota: Utilizou-se o Agitador Titer-Plate da Labline Instruments – Velocidade 2-3.

2. INCUBAÇÃO DO CONJUGADO

- 2.1 Decorridos 55 minutos, prepare o Conjugado como se descreve na "Preparação dos Reagentes".
- 2.2 Retire a tampa e lave 4 vezes cada tira com a Solução de lavagem (**250µL – 350 µL/poço**). Quando tiver terminado, bata com firmeza a placa contra uma toalha de papel para se assegurar de que toda a solução de lavagem é removida dos poços. Nota: É aceitável efectuar-se uma lavagem automática ou uma lavagem manual.
- 2.3 Adicione **100µL** de Conjugado/poço.
- 2.4 Cubra novamente a placa de Microensaio e incube à temperatura ambiente (20-25°C) durante **30 +/- 2 minutos** com uma agitação uniforme.
Nota: Utilizou-se o Agitador Titer-Plate da Labline Instruments-Velocidade 2-3
- 2.5 Lave cada tira como no Passo 2.2.

3. DESENVOLVIMENTO DA COR

- 3.1 Adicione **100µL** de Substrato/poço utilizando uma pipeta multicanal e incube à temperatura ambiente no escuro durante exactamente **15 minutos**.

4. PARAGEM

- 4.1 Adicione **100µL/poço** de Solução de Paragem utilizando uma pipeta multicanal. Certifique-se que o Substrato e a Solução de Paragem se misturaram completamente.
- 4.2 Leia **imediatamente** a 450nm utilizando 630nm como referência (se disponível).

CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a absorbância média de cada Calibrador, Controlo e amostra.
2. Trace a curva de Calibração de $A_{450/630nm}$ em relação a $[\alpha\text{GST}] \mu\text{g/L}$. A curva deverá ter uma forma semelhante à da Figura 1.
3. Leia a concentração $[\alpha\text{GST}] (\mu\text{g/L})$ indicada pelas absorbâncias médias das amostras da curva de calibração.
4. Multiplique a concentração $[\alpha\text{GST}]$ calculada pelo factor de diluição apropriado a fim de obter a concentração $[\alpha\text{GST}]$ real. Os resultados devem ser multiplicados novamente por 1,25 para compensar a diluição da amostra resultante do Tampão Estabilizador da Urina NEPHKIT[®].
5. A concentração do Controlo Positivo é lida directamente na curva.
6. Veja o Apêndice 1 para as instruções sobre como exprimir a libertação de αGST como taxa (ng/min).
7. Concentrações de amostras com leituras fora da curva padrão são inválidas e devem ser repetidas com um factor de diluição superior. A extrapolação de dados não é aceitável.

CRITÉRIOS DO CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo positivo deve ser sempre incluído para avaliar a validade dos resultados do ensaio. Considera-se que os resultados são válidos se o valor do controlo positivo estiver dentro do intervalo indicado no interior da tampa da caixa. Se este critério não for satisfeito, o ensaio deve ser considerado inválido e deve ser repetido.

LIMITAÇÕES DA UTILIZAÇÃO

Os resultados devem ser correlacionados com o perfil clínico do doente e com outros resultados clínicos laboratoriais.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO INTERVALO DE REFERÊNCIA

Amostras de urina quantitativas, em intervalos definidos, durante a noite foram colhidas de 38 indivíduos saudáveis com idades entre 18-46 anos. A libertação urinária observada de α GST foi a seguinte:

Como taxa (ng/min)	
Média	3,0ng/min
Média + 2DP	12,2ng/min
Como concentração (μ g/L)	
Média	3,5 μ g/L
Média + 2DP	11,1 μ g/L

Recomenda-se que cada utilizador desenvolva um intervalo de referência aplicável a este grupo de estudo.

LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção das amostras do Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha é de 0,036 μ g/L no poço de Microensaio; é equivalente a 0,09 μ g/L na amostra.

INTERVALO DE DETERMINAÇÃO

A curva normalizada abrange 1,25-40 μ g/L, equivalente a 3,25-100 μ g/L em amostras estabilizadas a 4/5 em tampão estabilizador e diluídas a 1/2 em diluente da amostra. Este intervalo pode ser alargado aumentando a diluição da amostra.

ESPECIFICIDADE

O Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha é altamente específico para a detecção da α GST. Não se observou uma reactividade cruzada significativa com as isoformas μ ou π da GST.

INTERFERÊNCIAS

Neste ensaio não se observou uma interferência significativa com amostras hemolíticas e ictéricas. Amostras hemolíticas: Interferência inferior a 14% com hemoglobina na amostra até 1,17g/L. Amostras ictéricas: Interferência inferior a 11% com bilirrubina na amostra até 5mg/mL. Estudos efectuados pela empresa demonstraram que amostras de urina com um pH no intervalo de 4-9 não afectam o desempenho do ensaio. Queira contactar a Argutus Medical para mais informações.

REPRODUCIBILIDADE

Quadro 1. Variação intra-ensaio do Argutus Medical NEPHKIT® Alpha.

Amostra	[αGST] µg/L	DP	%CV	n
Baixa	9,03	0,65	7,18	20
Média	33,4	2,48	7,43	20
Alta	59,1	5,47	9,24	20

Quadro 2. Variação entre ensaios do Argutus Medical NEPHKIT® Alpha.

Amostra	[αGST] µg/L	DP	%CV	n
Baixa	8,4	0,49	5,81	10
Média	37,9	3,07	8,11	10
Alta	68,7	9,24	13,46	10
PC	10,8	1,35	12,53	10

Quadro 3. Variação entre lotes do Argutus Medical NEPHKIT® Alpha calculada em três lotes de kits.

Amostra	[αGST] µg/L	DP	%CV	n
Baixa	8,28	1,01	12,16	30
Média	34,7	3,79	10,92	30
Alta	61,6	8,84	14,36	30

EXEMPLO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

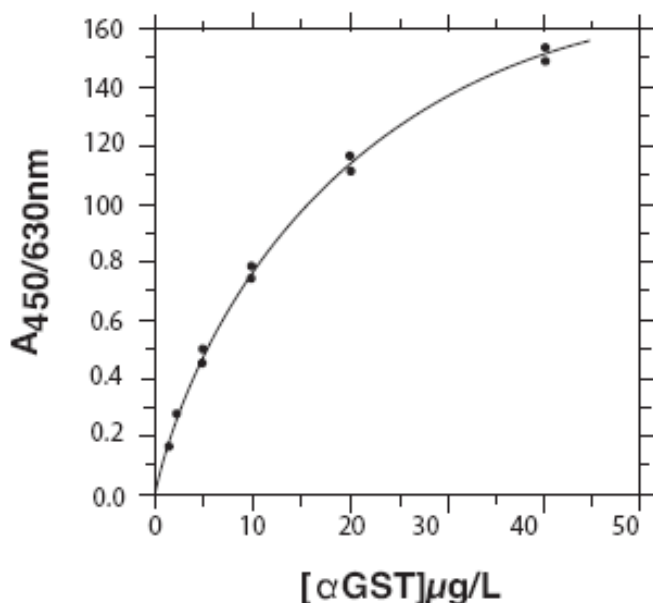


Figura 1: Curva de calibração típica obtida utilizando o Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha. Traçado de A_{450/630nm} em relação a [αGST] μg/L. O intervalo do ensaio é de 1,25–40 μg/L de GST. O limite de detecção do ensaio é de 0,036 μg/L no poço do Microensaio.

GARANTIA

Os dados do desempenho apresentados foram obtidos utilizando o procedimento descrito. Qualquer alteração ou modificação do procedimento, não recomendadas pela Argutus Medical, podem afectar os resultados, caso em que a Argutus Medical invalida todas as garantias, expressas, implícitas ou estatutárias, incluindo comercialização ou adequação de utilização implícitas. Nestas circunstâncias, a Argutus Medical não será responsável por danos, directos ou indirectos.

APÊNDICE 1

EXPRESSÃO DA LIBERTAÇÃO DA αGST URINÁRIA COMO TAXA

A libertação da αGST é constante em função do tempo mas não em função do volume. Isto significa que pode ser mais apropriado exprimir a libertação de αGST em termos da taxa (ng/min) do que da concentração. Isto pode ser importante em situações de diurese anormal como oligúria ou poliúria. A taxa de libertação é obtida como se descreve a seguir:

COLHEITA DE URINA

Efectue a colheita das amostras de urina como se descreve em "Colheita e manipulação de amostras". Registe a hora de micção (T2), a hora da micção anterior (T1) e o volume total de urina (V).

CÁLCULO DA TAXA DE LIBERTAÇÃO DE α GST:

1. Determine os níveis da α GST urinária utilizando o Argutus Medical NEPHKIT[®] Alpha (μ g/L).
2. Calcule o período durante o qual é feita a colheita da urina $T = T2 - T1$ em minutos.
3. Registe o volume de urina em ml (V).
4. Calcule a taxa de libertação como se segue:

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

RESUMO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO

1. INCUBAÇÃO DA AMOSTRA/CALIBRADOR

- 1.1 Prepare a Solução de Lavagem e os Calibradores.
- 1.2 Prepare as amostras.
- 1.3 Coloque os poços de Microensaio nas places do ensaio. Adicione os Calibradores, Controlo Positivo e amostras diluídas (100~~0~~ poço), em duplicado, na placa de Microensaio.
- 1.4 Cubra a placa de Microensaio e incube à temperatura ambiente (20-25°C) durante 60 +/- 2 minutos com uma agitação uniforme.

2. INCUBAÇÃO DO CONJUGADO

- 2.1 Decorridos 55 minutos, prepare o Conjugado como se descreve na "Preparação dos Reagentes".
- 2.2 Retire a tampa e lave 4 vezes cada tira com a Solução de Lavagem (250 μ L – 350 μ L/poço).
- 2.3 Adicione 100 μ L de Conjugado/poço.
- 2.4 Cubra novamente a placa de Microensaio e incube à temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 +/- 2 minutos com uma agitação uniforme.
- 2.5 Lave cada tira como no Passo 2.2.

3. DESENVOLVIMENTO DA COR


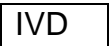





- 3.1 Adicione 100 μ L de Substrato/poço e incube à temperatura ambiente no escuro durante exactamente 15 minutos.

4. PARAGEM

- 4.1 Adicione 100 μ L/poço de Solução de Paragem. Certifique -se que o Substrato e a Solução de Paragem se misturaram completamente.
- 4.2 Leia imediatamente a 450nm utilizando 630nm como referência (se disponível).

5. CALCULE OS RESULTADOS

INTERPRETAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Intervalo do Controlo Positivo	
Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	
Código do lote	
Número de catálogo	
Limitação da temperatura	
Prazo de validade	
Fabricante	

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 α - 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.
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-PT-08
03/09