

CE

REF **BIO85**
Piastra a 96 Pozzetti



ARGUTUS **MEDICAL**

Pi GST EIA

Dosaggio Immunoenzimatico

ITALIANO

Istruzioni per l'uso

INDICE

| | |
|---|----|
| USO PREVISTO | 3 |
| PREMESSE | 3 |
| PRINCIPIO DEL TEST | 3 |
| CONTENUTO DEL KIT | 4 |
| PRECAUZIONI | 5 |
| CONSERVAZIONE E STABILITÀ | 6 |
| MATERIALE ADDIZIONALE NON CONTENUTO NEL KIT | 7 |
| PREPARAZIONE DEI REAGENTI | 7 |
| RACCOLTA DEI CAMPIONI | 8 |
| CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI | 9 |
| PREPARAZIONE DEI CAMPIONI | 9 |
| PROCEDURA DEL TEST | 10 |
| CALCOLO DEI RISULTATI | 11 |
| CRITERIA PER CONTROLLO DI QUALITÀ | 11 |
| LIMITI DI UTILIZZO | 11 |
| PERFORMANCE DEL TEST | 12 |
| ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE | 13 |
| GARANZIA | 14 |
| APPENDICE 1 | 14 |
| SINTESI DELLA PROCEDURA | 15 |
| INTERPRETAZIONE DEI SIMBOLI | 16 |
| RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | 17 |

USO PREVISTO

Argutus Medical Pi GST EIA rappresenta un metodo per la determinazione quantitativa della Pi glutatione Stransferasi (π GST) nel plasma e nell'urina umani. Prima di procedere all'analisi della π GST su altro materiale e in altre sottoclassi di GST, contattare gli Specialisti Argutus Medical. Argutus Medical Pi GST EIA viene utilizzato negli Stati Uniti a solo scopo di ricerca.

PREMESSE

STUDI SULL'URINA

π GST è situata nei tubuli distali del rene umano, mentre l'alfa GST (α GST) è limitata principalmente al tubulo prossimale^{1,2}. π GST è rilasciata nell'urina di individui normali come confermato dal test immunoenzimatico^{3,4}. Qualsiasi evento che provochi danno ai tubuli distali può causare un rilascio anormale di π GST nell'urina ed è stato dimostrato che l'innalzamento dei livelli di π GST urinaria è indicativo di danni del tubulo distal nel rigetto del trapianto renale^{5,6}, nefrotossicità⁵⁻⁷, infezione⁸, diabete⁹ e lesione renale cronica¹⁰. E' stato dimostrato che il rilascio di α GST è direttamente connesso a un danno ai tubuli prossimali, cosicché la rilevazione contemporanea di α GST e π GST può consentire la distinzione fra danno ai tubuli prossimali e distali⁵⁻⁷.

STUDI SUL PLASMA

E' stato inoltre notato che i livelli plasmatici di π GST risultano essere elevati in malattie colostatiche croniche e colangiocarcinoma¹¹. Elevati livelli di plasma e tessuto π GST possono essere rinvenuti in un'ampia gamma di patologie maligne¹².

PRINCIPIO DEL TEST

Argutus Medical Pi GST è un test immunoenzimatico quantitativo. La procedura del test si basa sull'aggiunta sequenziale di campione, coniugato anticorpo-enzima e substrato ai micropozzetti rivestiti di anti- π GST IgG. L'intensità di colore risultante è proporzionale alla quantità di π GST presente. L'intervallo di sensibilità del test è 1,25-40 μ g/L.

CONTENUTO DEL KIT

- | | | | | |
|---|---|---------|------|-----|
| <p>1. Piastra da microdosaggio rivestita con anticorpo Strisce di pozzetti 12 x 8 rivestiti con IgG diretto contro πGST. Pozzetti frazionabili. PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">PLA</td> </tr> </table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| <p>2. Calibratore πGST purificato in glicerolo al 50% (v/v). (5mg/L, 100μL). Contiene Thiomersal. CONCENTRATO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CAL</td> </tr> </table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| <p>3. Diluente del campione proteina contenente soluzione con stabilizzanti aggiunti. (50mL). Contiene Sodio Azide PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">DIL</td> <td style="padding: 5px;">SPE</td> <td style="padding: 5px;">1X</td> </tr> </table> | DIL | SPE | 1X |
| DIL | SPE | 1X | | |
| <p>4. Tampone di lavaggio 20x fosfato tamponato con soluzione salina/Tween-20 (PBST, 55mL). Contiene Thiomersal. CONCENTRATO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">BUF</td> <td style="padding: 5px;">WASH</td> <td style="padding: 5px;">20X</td> </tr> </table> | BUF | WASH | 20X |
| BUF | WASH | 20X | | |
| <p>5. Controllo positivo πGST in soluzione contenente protein con stabilizzanti aggiunti (4,5mL). Contiene Thiomersal e Sodio azide. PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONTROL</td> <td style="padding: 5px;">+</td> </tr> </table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| <p>6. Coniugato Anti- πGST IgG coniugato con perossidasi di rafano (11mL) Contiene Thiomersal PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONJ</td> <td style="padding: 5px;">ENZ</td> <td style="padding: 5px;">1X</td> </tr> </table> | CONJ | ENZ | 1X |
| CONJ | ENZ | 1X | | |
| <p>7. Substrato: Soluzione TMB liquida stabilizzata (11mL). PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SUBS</td> <td style="padding: 5px;">TMB</td> </tr> </table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| <p>8. Soluzione d'arresto 0,5M Acido solforico (11mL). PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SOLN</td> <td style="padding: 5px;">STP</td> </tr> </table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| <p>9. Tampone stabilizzante per urina NEPHKIT® (10mL) Contiene Thiomersal e Sodio azide. PRONTO ALL'USO</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">BUF</td> <td style="padding: 5px;">NEPH</td> </tr> </table> | BUF | NEPH | |
| BUF | NEPH | | | |
| <p>10. Inserto del prodotto</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">INS</td> </tr> </table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUZIONI

SICUREZZA

- Il kit EIA PiGST di Argutus Medical è destinato esclusivamente all'uso diagnostico invitro.
- Il kit EIA PiGST 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' π 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. 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.

MATERIALE ADDIZIONALE NON CONTENUTO NEL KIT

1. Micropipette (5-50 μ L, 50-200 μ L e 200-1000 μ L) e una pipetta multicanale (50-200 μ L)
2. Sistema di lavaggio per micropiastre
3. Lettore di micropiastre ELISA per misurazioni a 450nm con lunghezza d'onda di riferimento a 630nm, se disponibile
4. Contenitore da 1L
5. Contaminuti
6. Aspiratore per liquidi
7. Acqua deionizzata/distillata
8. Agitatore per piastre
9. Cilindri graduati
10. Provette
11. Incubatore a temperatura ambiente

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. SOLUZIONE DI LAVAGGIO (PBST)

Diluire 10mL di soluzione di lavaggio concentrata 1:20 con 190mL di acqua deionizzata come richiesto. Preparare soltanto il volume della soluzione di lavaggio richiesto per il test.

Assicurarsi che gli eventuali cristalli si siano disciolti prima della diluizione.

Un leggero riscaldamento della soluzione di lavaggio concentrata a 37°C per 15-30 minuti aiuterà lo scioglimento dei cristalli di sale. Ogni striscia da 8 pozzetti richiede 25mL di soluzione di lavaggio.

2. CALBRATORI

Preparare il calibratore (A) da 40 μ g/L a partire dalla soluzione standard di π GST come segue:

Soluzione standard: 20 μ L
Diluyente campione: 2480 μ L
Totale: 2500 μ L @ 40 μ g/L (A)

Preparare ulteriori calibratori utilizzando provette marcate, come segue:

| Calibratore (μg/L) | Volume Calibratore (μL) | Volume diluyente Calibratore (μL) |
|--|---|---|
| 40(A) | 500 (A) | 0 |
| 20 (B) | 500 (A) | 500 |
| 10 (C) | 500 (B) | 500 |
| 5 (D) | 500 (C) | 500 |
| 2,5 (E) | 500 (D) | 500 |
| 1,25 (F) | 500 (E) | 500 |
| 0 (G) | 0 | 500 |

RACCOLTA DEI CAMPIONI

URINA

Argutus Medical Pi GST EIA può essere impiegato per misurare la π GST in qualsiasi campione di urina ma, a causa della variazione giornaliera di proteinuria¹⁵, per ottenere risultati ottimali è importante che vengano raccolti quantitative campione di urina ad orari programmati e che sia l'orario che il volume di raccolta vengano registrati. Ciò permetterà di esprimere l'escrezione di π GST come velocità di escrezione (ng/min) (v. Appendice 1). Si raccomanda l'utilizzo di campioni di urina dell'intera notte o delle 24 ore. Prima di procedere con altri metodi e periodi di raccolta, contattare gli Specialisti Argutus Medical. Immediatamente dopo la raccolta del campione aggiungere 200 μ L di NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina a 800 μ L di urina (diluizione del campione 4:5), anche se i campioni non devono essere conservati. Se al controllo visivo il campione sembrasse contenere sangue, deve essere immediatamente centrifugato a 10000g per 5 minuti. Dopo la centrifugazione, se il campione dovesse mostrare un surnatante limpido senza segni di emolisi si potrà raccogliergli e testarne un'aliquota per verificare la presenza di π GST. **Se, tuttavia, tracce di sangue dovessero essere ancora presenti nel surnatante, il campione deve essere considerato inadatto alla rilevazione di π GST.** Viceversa, la presenza di sangue non inficia la rilevazione di α GST. Procedere alla centrifugazione del campione e alla raccolta del surnatante prima dell'aggiunta di NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina.

PLASMA

Mantenere il plasma a 2-8°C durante tutto il periodo di trattamento. Raccogliere i campioni in provette con eparina di litio o EDTA e centrifugare a 2500g per 10 minuti a 2-8°C entro le 6 ore successive alla raccolta. Lasciar decantare attentamente il surnatante e centrifugare di nuovo il plasma a 6000g per 10 minuti a 2-8°C per assicurare la completa eliminazione delle piastrine. Raccogliere con attenzione il plasma mediante aspirazione avendo cura di non muovere il precipitato. L'enzima glutatione-S-transferasi pi (GST-pi) è presente nelle piastrine, per cui è importante rimuoverle.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

URINA

Non conservare i campioni senza l'aggiunta di NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina. Il NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina deve essere aggiunto entro le 12 ore successive alla raccolta del campione. Si raccomanda di analizzare i campioni subito dopo la raccolta. Tuttavia, dopo l'aggiunta di NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina, i campioni possono essere conservati a 2-8°C per una settimana o a -20°C per almeno 12 mesi. Evitare ripetuti congelamenti / scongelamenti. In assenza di NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina, il congelamento può ridurre fino al 70% i livelli di GST nell'urina come rilevato col metodo EIA. Questo calo di GST urinario è molto probabilmente dovuto a denaturazione durante il ciclo di congelamento/scongelamento.

PLASMA

Congelare i campioni a -20°C subito dopo la raccolta. Nessuna variazione nei livelli di π GST è stata riscontrata in campioni conservati fino a 3 mesi a -20°C. Evitare ripetuti congelamenti / scongelamenti dei campioni.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

URINA

Immediatamente prima del test, diluire i campioni 1:2 aggiungendo fino a 200 μ L di campione a 200 μ L di diluente campione.

PLASMA

Immediatamente prima del test, diluire i campioni 1:5 aggiungendo 50 μ L di campione a 200 μ L di diluente campione. Se si procede con l'aggiunta del campione in parallelo (> 10 campioni duplicati), per facilitare il trasferimento sulla micropiastra i campioni possono essere diluiti in una micropiastra non sensibilizzata aggiustando adeguatamente il volume.

Il controllo positivo non richiede diluizione.

Non conservare i campioni diluiti di nessun genere.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: assicurarsi che tutti i reagenti siano portati a temperatura ambiente prima di iniziare il test.

1. INCUBAZIONE DEL CAMPIONE / CALIBRATORE

1.1 Preparare la soluzione di lavaggio e i calibratori come descritto nella "Preparazione dei reagenti".

1.2 Preparare i campioni come descritto nella "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 (forniti da Argutus Medical). Aggiungere **nei pozzetti della piastra** i calibratori (**G-A; concentrazione equivalente a 0-40µg/L**), il controllo positive e i campioni diluiti (100µL/pozzetto), in duplicato.

1.4 Coprire la micropiastra ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per **60 ± 2 minuti** agitando uniformemente.

Nota: è stato utilizzato un agitatore Lab-line Interments Titer-Plate a velocità 2-3

1.5 Rimuovere il coperchio e lavare ogni striscia 4 volte con la soluzione di lavaggio (**250 – 350µL/pozzetto**). Dopo il lavaggio, picchiettare energicamente la piastra su un tovagliolo di carta assorbente per assicurare la completa rimozione della soluzione di lavaggio dai pozzetti.

Nota: è possibile effettuare sia il lavaggio automatizzato che manuale.

2. INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

2.1 Aggiungere **100µL** di coniugato / pozzetto alla micropiastra.

2.2 Coprire nuovamente la micropiastra ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per **60 ± 2 minuti** agitando uniformemente.

Nota: è stato utilizzato un agitatore Lab-line Interments Titer-Plate a velocità 2-3.

2.3 Lavare ogni striscia come indicato al punto 1.5.

3. SVILUPPO DEL COLORE

3.1 Aggiungere **100µL** di substrato / pozzetto per mezzo di una pipetta multicanale ed incubare a temperatura ambiente per 15 minuti esatti.

4. BLOCCAGGIO

- 4.1 Bloccare la reazione aggiungendo **100µL** di soluzione bloccante / pozzetto. Assicurare la completa miscelazione del substrato con la soluzione bloccante.
- 4.2 Leggere immediatamente a 450nm utilizzando 630 nm come lunghezza d'onda di riferimento (se disponibile).

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle assorbanze per ogni campione.
2. Tracciare una curva di calibrazione di $A_{450/630nm}$ contro $[\pi\text{GST}] \mu\text{g/L}$ (diagramma lineare) (v. Figura 1).
3. Dalla curva di calibrazione rilevare $[\pi\text{GST}] (\mu\text{g/L})$ indicato dalla media delle assorbanze dei campioni.
4. Moltiplicare $[\pi\text{GST}]$ calcolato per il fattore di diluizione appropriato per ottenere l'effettivo $[\pi\text{GST}]$. I risultati per i campioni di urina devono essere moltiplicati per un ulteriore 1,25 per compensare la diluizione del campione ottenuta con NEPHKIT® Tampone stabilizzante dell'urina.
5. La concentrazione per il controllo positivo è letta direttamente dalla curva. Il relativo valore dovrebbe essere compreso nel range indicato all'interno del coperchio della scatola.
6. Per sapere come esprimere l'escrezione urinaria di πGST come velocità di escrezione (ng/min), v. 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 PER CONTROLLO DI QUALITÀ

Il controllo positivo deve essere sempre inserito in ogni serie di test per determinare la validità dei risultati. I risultati di un test sono considerati validi se il valore del controllo positivo è compreso nel range indicato all'interno del coperchio della scatola. Se questo criterio non è rispettato, l'analisi deve essere considerata non valida e quindi ripetuta.

LIMITI DI UTILIZZO

I risultati devono essere correlati con il profilo clinic del paziente ed altri risultati clinici di laboratorio.

PERFORMANCE DEL TEST

RANGE DI RIFERIMENTO

Si raccomanda ad ogni laboratorio di calcolare il proprio range di riferimento compatibile con il proprio gruppo di pazienti.

SPECIFICITA

Argutus Medical Pi GST EIA è altamente specifico per π GST. Non si osserva nessuna significativa cross reattività con isoforme alfa o mu di GST.

RANGE DI MISURA

Il range della curva di calibrazione è compreso fra 1,25-40 μ g/L che corrisponde a 3,12-100 μ g/L nel caso di campioni di urina diluita 1:2 con diluente campione oppure a 6,25-200 μ g/L nel caso di campioni di plasma diluito 1:5 con diluente campione. Questo range può essere esteso aumentando la diluizione del campione.

LIMITI DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del kit Argutus Medical Pi GST EIA è 0,7 μ g/L. Il limite di rilevazione in un campione stabilizzato di urina diluito 1/2 è di 1,75 μ g/L o di 3,5 μ g/L in un campione di plasma diluito 1/5.

INTERFERENZE

Non è stata riscontrata nessuna interferenza significativa nel test con campioni lipemici o itterici.

Lipemia *: interferenza <10% fino a 1000IU nel campione di plasma.

Bilirubina: interferenza <10% a 5mg/mL nel campione di plasma e <10% a 5mg/mL nel campione di urina.

I campioni che contengono sangue emolizzato sono inadatti per la rilevazione di π GST e non devono essere usati.

* Eseguito usando intralipid 20% da Fresenius.

Studi interni hanno dimostrato che i campioni che presentano livelli di fattore reumatoide molto elevate, possono generare delle interferenze con il presente dosaggio. Per ulteriori informazioni, contattare la Argutus Medical

RIPRODUCIBILITA'

Tabella 1: Variazione intra-serie di Argutus Medical Pi GST EIA determinata in 2 campioni; 1 di plasma e 1 di urina con n = 24 replicati in una singola serie di test.

| Campione | π GST ($\mu\text{g/L}$) | SD | %CV | N |
|--------------|-------------------------------|------|-----|----|
| Plasma basso | 210,1 | 4,65 | 2 | 24 |
| Urina bassa | 3,8 | 0,09 | 2 | 24 |

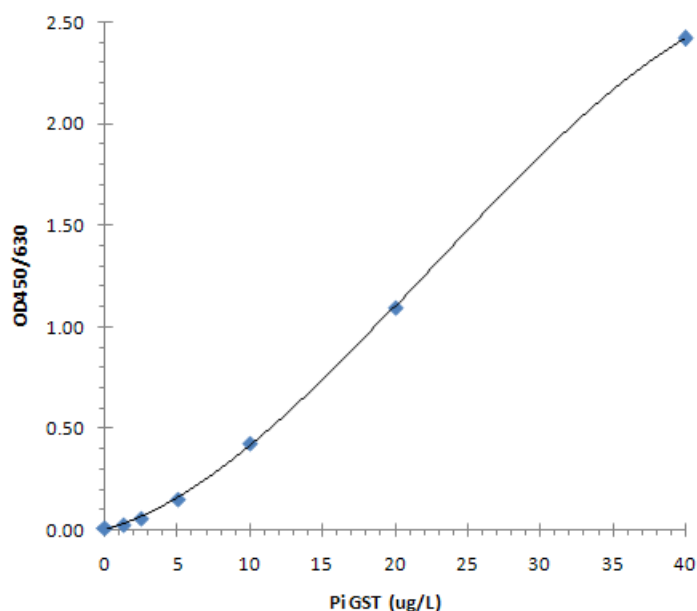
Tabella 2: Variazione inter-serie di Argutus Medical Pi GST EIA determinata in 4 campioni per oltre 25 test per un unico lotto seguendo la procedura completa di analisi per ogni test.

| Campione | π GST ($\mu\text{g/L}$) | SD | %CV | N |
|-------------------|-------------------------------|-------|-----|----|
| Plasma basso | 218,2 | 14,72 | 7 | 25 |
| Plasma medio | 315,9 | 22,36 | 7 | 25 |
| Urina bassa | 5,4 | 0,52 | 9 | 25 |
| Urina bassa/media | 61,5 | 3,56 | 6 | 25 |

Tabella 3: Variazione inter-lotto di Argutus Medical Pi GST EIA determinata in 3 campioni per oltre 10 test calcolata con 3 lotti di kit.

| Campione | π GST ($\mu\text{g/L}$) | SD | %CV | N |
|--------------|-------------------------------|-------|-----|----|
| Plasma basso | 222,4 | 13,35 | 6 | 30 |
| Plasma medio | 326,4 | 25,49 | 8 | 30 |
| Urina bassa | 6,1 | 1,00 | 16 | 30 |

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE



"Figura 1. Curva di calibrazione tipica ottenuta usando il Argutus Medical Pi GST EIA. Diagramma lineare di $A_{450/630\text{nm}}$ contro $[\pi\text{-GST}] \mu\text{g/L}$.

GARANZIA

I dati presentati relativi alle performance sono state ottenute seguendo la procedura descritta. Qualsiasi cambiamento o modifica della procedura non suggerita da Argutus Medical può inficiare i risultati, e in tal caso Argutus Medical disconosce tutte le garanzie, espresse, implicite o statutarie, compreso la implicita commercializzazione ed idoneità all'uso. In questa eventualità Argutus Medical non sarà responsabile per danni, diretti o conseguenti.

APPENDICE 1

ESPRESSIONE π GST ESCREZIONE COME VELOCITA'

L'escrezione di π GST è costante nel tempo, non dipende dal volume dell'urina. Ciò significa che può essere più rilevante esprimere l'escrezione di π GST in termini di velocità di escrezione (ng/min) piuttosto che come concentrazione. Ciò può essere importante nelle situazioni di diuresi insolita, quail oligo o poliuria. La velocità di escrezione si ottiene come segue:

RACCOLTA DELLE URINE

Raccogliere i campioni di urina come descritto nella "Raccolta e manipolazione dei campioni".

Annotare l'ora dell'emissione delle urine (T2), l'ora dell'emissione precedente (T1) ed il volume totale di urina (V).

CALCOLO DELLA VELOCITA' DI ESCREZIONE DI π GST

1. Determinare i livelli urinari di π GST usando Argutus Medical Pi GST EIA (μ g/L).
2. Calcolare in minuti il periodo durante il quale l'urina è stata raccolta (T) (T2-T1).
3. Annotare il volume dell'urina in mL(v).
4. Calcolare la velocità di escrezione come segue:

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

SINTESI DELLA PROCEDURA

1. INCUBAZIONE DEL CAMPIONE / CALIBRATORE

- 1.1. Preparare la soluzione di lavaggio ed i calibratori.
- 1.2. Preparare i campioni
- 1.3. Disporre i pozzetti nella micropiastra. Aggiungere i calibratori, il controllo positivo ed i campioni diluiti (**100µL/pozzetto**) in duplicato, ai micropozzetti.
- 1.4. Coprire la micropiastra ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per **60 ± 2 minuti** agitando uniformemente.
- 1.5. Rimuovere il coperchio e lavare ogni striscia 4 volte con la soluzione di lavaggio (**250 – 350µL/pozzetto**).

2. INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

- 2.1. Aggiungere **100µL** di coniugato /pozzetto.
- 2.2. Coprire nuovamente la micropiastra ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per **60 ± 2 minuti** agitando uniformemente.
- 2.3. Lavare ogni striscia come indicato al punto 1,5.

3. SVILUPPO DEL COLORE

- 3.1. Aggiungere **100µL** di substrato/pozzetto ed incubare a temperatura ambiente per 15 minuti esatti.

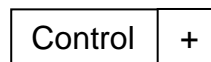
4. BLOCCAGGIO

- 4.1. Bloccare la reazione aggiungendo **100µL** di soluzione bloccante/pozzetto. Assicurare la completa miscelazione del substrato con la soluzione bloccante.
- 4.2. Leggere immediatamente a 450nm utilizzando la lunghezza d'onda di 630nm come lunghezza d'onda di riferimento (se disponibile).

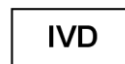
CALCOLO DEI RISULTATI

INTERPRETAZIONE DEI SIMBOLI

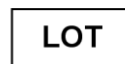
Range del controllo positivo



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*



Codice del lotto



Numero di catalogo



Limite di temperature



Usare entro



Produttore



Rischio biologico



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Campbell, J.A.H. et al.** (1991). Immunohistologic localisation of alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in human tissue. *Cancer (Philadelphia)* **67**, **1608-1613**.
2. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1993). Immunohistochemical localisation of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacology and Toxicology*, **72**, **321-331**.
3. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1994). Quantitation of glutathione S-Transferase-pi in the urine by radioimmunoassay. *Nephron* **66**, **162-169**
4. **Manning, F. et al.** (1994). Biotrin International internal research.
5. **Sundberg, A.G.M. et al.** (1994). Urinary π -glutathione S-transferase as an indicator of tubular injury in the human kidney. *Nephron* **67**, **308-316**.
6. **Stegeman, C.A. et al.** (1996). Differential diagnosis of early graft dysfunction by urinary excretion of α and π glutathione S-transferase in renal transplantation (RT). Presented at the Congress of the American Society of Nephrology, **3-6. Nov 1996**.
7. **Eger II, E.I. et al.** (1997). Nephrotoxicity of Sevoflurane® versus Desflurane® in volunteers. *Anesthesia and Analgesia* **84**, **160-168**.
8. **Bouissou, F. et al.** (1998). Urinary glutathione-S-transferase: excretion in normal children and children with pyelonephritis. Poster presented at the meeting of the French Society of Infectious Diseases in Paediatrics. Limoges, France - **May 1998**.
9. **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**.
10. **Branten, A et al.** (2000). Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. *Nephron* **85(2): 120-6**.
11. **Vaubourdolle, M et al.** (1996). Plasma π glutathione S-transferase as a marker of biliary cell damage. *Hepatology* **24(4pt2) p 593A**.
12. **Beckett, G.J. and Hayes, J.D.** (1993). Glutathione S-transferase: Biomedical applications. *Advances in Clinical Chemistry* **30**, **281-380**.
13. **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>

Document Code: PI-284-IT-08
03/09