

CE

REF BIO85

Placa de 96 pocillos



ARGUTUS MEDICAL

Pi GST EIA

Enzimoimmunoanálisis

ESPAÑOL

Instrucciones de uso

ÍNDICE

USO	3
ANTECEDENTES	3
FUNDAMENTO DEL ENSAYO	3
COMPONENTES DEL KIT	4
PRECAUCIONES	5
ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO	6
MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS	7
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	7
TOMA DE MUESTRA	8
ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	9
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	9
DESARROLLO DEL TEST	10
CÁLCULO DE RESULTADOS	11
CRITERIOS DE CONTROL DE CALIDAD	11
LIMITACIONES DE USO	11
CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO	12
EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACION	13
GARANTÍA	14
APÉNDICE 1	14
RESUMEN DEL PROTOCOLO DEL ENSAYO	15
INTERPRETACION DE LOS SIMBOLOS	16
REFERENCIAS	17

USO

El kit de Argutus Medical Pi GST EIA proporciona un método para la determinación cuantitativa de Pi Glutation S-transferasa (π GST) en plasma humano y orina. Para calcular la π GST en otros medios y otras subclases de GST, contactar con Argutus Medical. El kit de Argutus Medical Pi GST EIA es para investigación sólo en USA.

ANTECEDENTES

ESTUDIOS EN ORINA

La π GST se localiza en los túbulos distales del riñón humano mientras que la alfa GST (α GST) se localiza principalmente en los tubules proximales^{1,2}. La π GST es liberada a la orina en individuos normales como se ha confirmado por enzimoimmunoensayo^{3,4}. Cualquier situación que provoque daño en el túbulo distal puede causar un incremento en la liberación de π GST a la orina y se ha demostrado que el aumento de los niveles de π GST urinario es indicativo de daño en el túbulo distal en rechazo^{5,6} en trasplante renal, nefrotoxicidad⁵⁻⁷, infección⁸, diabetes⁹ y daño renal crónico¹⁰. Se ha demostrado que la liberación de α GST está asociada con daño en el túbulo proximal, así la medida simultánea de α GST y π GST permite discriminar entre daño en el túbulo proximal y distal⁵⁻⁷.

ESTUDIOS EN PLASMA

Los niveles en plasma de la π GST se han encontrado elevados en enfermedades colestáticas crónicas y colangiocarcinoma¹¹. Niveles elevados de π GST en plasma y tejidos pueden encontrarse en variedad de enfermedades malignas¹².

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El kit Argutus Medical Pi GST es un enzimoimmunoensayo cuantitativo. El fundamento del test se basa en adición secuencial de muestra, conjugado anticuerpo-enzimático y sustrato a los pocillos de la microplaca cubiertos con anti- π GST IgG. La intensidad de color resultante es proporcional a la cantidad de π GST. El rango del ensayo es 1,25-40 μ g/L.

COMPONENTES DEL KIT

- | | | | | |
|---|---|---------|------|-----|
| <p>1. Placa de microtiter
12 x 8 pocillos en tiras separables, los pocillos están cubiertos de anticuerpos IgG contra la πGST.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">PLA</td> </tr> </table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| <p>2. Calibrador
πGST purificada al 50% (v/v) en glicerol. (5mg/L, 100μL).
Contiene timerosal.
CONCENTRADA</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CAL</td> </tr> </table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| <p>3. Diluyente de Muestras
Solución de proteínas con estabilizadores. (50mL).
Contiene azida sódica.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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. Solución Concentrada de Lavado 20x buffer fosfato salino/Tween-20 (PBST, 55mL).
Contiene timerosal.
CONCENTRADA</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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. Control Positivo Solución de πGST de proteínas con estabilizadores (4,5mL).
Contiene timerosal y azida sódica.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CONTROL</td> <td style="padding: 5px;">+</td> </tr> </table> | CONTROL | + | |
| CONTROL | + | | | |
| <p>6. Conjugado
Conjugado Anti- πGST IgG con horseradish peroxidasa (11 mL). Contiene timerosal.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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
Solución de TMB líquido estabilizada.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SUBS</td> <td style="padding: 5px;">TMB</td> </tr> </table> | SUBS | TMB | |
| SUBS | TMB | | | |
| <p>8. Solución de Parada
Ácido sulfúrico 0,5M (11 mL).
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">SOLN</td> <td style="padding: 5px;">STP</td> </tr> </table> | SOLN | STP | |
| SOLN | STP | | | |
| <p>9. Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT® (10mL)
Contiene timerosal y azida sódica.
LISTO PARA USAR</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">BUF</td> <td style="padding: 5px;">NEPH</td> </tr> </table> | BUF | NEPH | |
| BUF | NEPH | | | |
| <p>10. Prospecto del producto/Instrucciones de uso</p> | <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;">INS</td> </tr> </table> | INS | | |
| INS | | | | |

PRECAUCIONES

SEGURIDAD

- El Argutus Medical Pi GST EIA se destina exclusivamente al uso diagnóstico *in vitro*.
- El Argutus Medical Pi GST EIA se destina exclusivamente al uso por personal de laboratorio cualificado.
- Este kit contiene material de origen humano, que ha sido sometido a pruebas y ha resultado negativo para DNA de hepatitis B, RNA de VHC y RNA de VIH. Sin embargo, dado que ninguna prueba puede proporcionar la completa seguridad de la ausencia de virus, todos los materiales deben tratarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen timerosal, que puede resultar tóxico por ingestión.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es corrosivo. Evítese el contacto con la piel y los ojos. Si se produjese el contacto, aclarar inmediatamente con agua y consultar con un médico.
- El substrato contiene TMB, que podría causar irritaciones de la piel y las membranas mucosas. Si el substrato entra en contacto con la piel, ésta deberá enjuagarse con agua.
- Algunos reactivos contienen azida sódica, que puede reaccionar con las tuberías de cobre y plomo para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Para su eliminación, los reactivos se enjuagarán con grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida.
- Eliminar todas las muestras clínicas, el material infectado o potencialmente infectado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Todos estos materiales deberán manipularse y eliminarse como si se tratase de materiales potencialmente infecciosos.
- Los residuos de productos químicos, preparados y componentes del kit se consideran por lo general desechos peligrosos.
- Estos materiales deben desecharse de acuerdo con procedimientos de seguridad establecidos.
- Durante la manipulación de las muestras, usar ropas protectoras, guantes desechables de látex y protección para los ojos. Una vez finalizadas las manipulaciones, lavarse concienzudamente las manos.
- No pipetar con la boca y nunca comer ni beber en la superficie de trabajo del laboratorio.

PROCEDIMIENTO

- La Medicina Argustus lo recomienda para ensayos clínicos, los usuarios prueban todas las muestras utilizando el mismo número de equipo para obtener resultados consistentes.
- No utilice el kit ni los reactivos pasada su fecha de caducidad.
- No mezcle ni sustituya los reactivos con otros provenientes de kits con diferente número de lote.

- Desviarse del protocolo proporcionado puede conducir a resultados erróneos.
- Realizar el ensayo fuera de los límites de tiempo y temperatura puede provocar resultados erróneos. Los ensayos que no se mantengan dentro de los límites de tiempo y temperatura establecidos deberán repetirse.
- El reactivo debe depositarse en el punto medio del lateral de los pocillos, con cuidado de no tocar el lateral con la punta de la pipeta.
- No deje que los pocillos se sequen en ningún momento del ensayo.
- Debe tenerse cuidado de no contaminar los componentes y usar siempre puntas de pipeta nuevas para cada muestra y cada componente.
- No use reactivos turbios o que se han precipitado fuera de la solución.
- Cerciorarse de que el concentrado de lavado se mezcla completamente y de que no queden cristales tras su reconstitución.
- La solución de lavado precisa agua de alta calidad, destilada o desionizada. El uso de agua de baja calidad o contaminada puede conducir a la aparición de coloración de fondo.
- Dejar que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente (20-25°C) antes de usarlos.
- Evite exponer los reactivos directamente a la luz solar y/o a temperaturas superiores a 2-8°C durante períodos de tiempo prolongados.
- Use siempre recipientes de vidrio limpios, de preferencia desechables, para cualquier preparación de reactivos.
- Mantenga siempre la superficie superior de los pocillos libre de gotas. Las gotas deberán retirarse cuidadosamente una vez completado el procedimiento.
- Asegúrese de que la superficie inferior de la placa esté limpia y seca antes de la lectura.
- Antes de iniciar el ensayo, deberá establecerse un plan de identificación y distribución.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

1. Todos los reactivos del kit deben ser almacenados a 2-8°C y son estables hasta la fecha de caducidad.
2. La placa de microtiter debe ser guardada en su bolsa con desecante a 2-8°C hasta que vaya a ser usada. Devolver los pocillos sin usar a su bolsa con desecante.
3. Los calibradores π GST deben ser usados en los 30 minutos siguientes a su preparación.
4. La Solución de Lavado preparada (PBST) es estable a temperatura ambiente hasta dos semanas y hasta un mes a 2-8°C.

MATERIALES ADICIONAL ES NECESARIO

1. Micropipetas (de 5µL-50µL, de 50µL-200µL y de 200µL-1000µL) y una pipeta multicanal (de 50µL a 200µL)
2. Sistema de Lavado de microplacas
3. Lector de placas ELISA para longitud de onda de 450nm con una longitud de onda de referencia de 630nm, si es posible
4. Recipiente de 1L
5. Reloj
6. Pila para desagüe de líquidos
7. Agua desionizada/destilada
8. Agitador de placas
9. Probeta graduada
10. Tubos de test
11. Incubador a temperatura ambiente

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

1. SOLUCIÓN DE LAVADO (PBST)

Realizar una dilución 1/20 del Concentrado de Lavado añadiendo, por ejemplo, 10 mL del Concentrado a 190mL de agua desionizada.

Preparar sólo el volumen de Solución de Lavado necesario para el test.

Asegurarse de que los cristales de sales están disueltos antes de la dilución. Agitar suavemente el Concentrado de Lavado a 37°C durante 15-30 minutos, ayudará a la disolución de los cristales de sales. Cada tira de 8 pocillos necesita 25mL de Solución de Lavado.

2. CALIBRADORES

Preparar el Calibrador (A) de 40µg/L a partir de la Solución Stock de πGST como sigue:

Stock : 20µL
Diluyente de Muestra: 2480µL
Total: 2500µL @ 40µg/L (A)

Usando tubos etiquetados, preparar una serie de Calibradores como sigue

Calibrador (µg/L)	Volumen de Calibrador (µL)	Volumen Diluyente de Muestra (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

TOMA DE MUESTRA

ORINA

El kit Argutus Medical Pi GST EIA puede ser usado para medir la π GST en cualquier muestra de orina, pero debido a la variación diurna de la proteinuria¹³, es importante para obtener óptimos resultados que sean anotados la hora, cantidad, las muestras de orina recogidas, el periodo de recogida y el volumen. Esto permite expresar la excreción de π GST como ratio (ng/min). Ver Apéndice 1. Se recomiendan las muestras de orina de toda la noche o de 24 horas. Para otros métodos de recogida y periodos, contactar con Argutus Medical Internacional. Después de la recogida de la muestra y tan pronto como sea posible, añadir 200 μ L de Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT® a 800 μ L de orina (dilución 4/5 de la muestra), incluso si éstas no van a ser almacenadas. Si en una inspección visual, la muestra parece contener sangre, debe ser centrifugada inmediatamente a 10000g durante 5 minutos. **Después de centrifugar, si la muestra tiene un sobrenadante claro sin signos de hemólisis, se puede tomar una alícuota y testar la π GST.** Sin embargo, si los signos visuales de sangre están presentes en el sobrenadante, la muestra no es adecuada para la medida de π GST. La presencia de sangre no afectará a la medida de α GST. La muestra debe ser centrifugada y el sobrenadante recogido, antes de añadir el Buffer Estabilizante de Orina.

PLASMA

Mantener el plasma de 2-8°C durante todo el tratamiento. Recoger las muestras en tubos con heparina de litio o EDTA y centrifugar a 2500g durante 10 minutos a 2-8°C dentro de las 6 horas tras la recogida. Decantar el plasma sobrenadante con cuidado y recentrifugar este plasma a 6000g durante 10 minutos a 2-8°C para asegurar la total eliminación de plaquetas. Retirar cuidadosamente el plasma aspirando para no arrastrar el sedimento.

La enzima glutatión-sulfhidrilo-transferasa-pi (GST-pi) se encuentra en los trombocitos y, por lo tanto, su eliminación es esencial

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

ORINA

No almacenar las muestras sin añadir el Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT®. Este Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT® debe ser añadido dentro de las 12 horas tras la recogida de la muestra. Se recomienda que las muestras sean testadas tan pronto como sea posible tras la recogida. Sin embargo, tras la adición del Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT® las muestras pueden ser almacenadas durante una semana a 2-8°C o a -20°C durante al menos 12 meses. Evitar sucesivas congelaciones y descongelaciones. En la ausencia del Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT®, la congelación puede reducir los niveles de GST en orina hasta el 70% en medidas por EIA. Este descenso en la GST urinaria es principalmente debido a la desnaturalización durante el ciclo de congelación-descongelación.

PLASMA

Las muestras deberían ser congeladas a -20°C lo antes posible tras la recogida. No se observan cambios en los niveles de π GST en muestras que han sido almacenadas durante más de 3 meses a -20°C. Se deben evitar las congelaciones-descongelaciones repetidas.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

ORINA

Inmediatamente antes de realizar el test, diluir las muestras 1/2 añadiendo a 200 μ L de muestra 200 μ L de Diluyente de Muestras.

PLASMA

Inmediatamente antes de realizar el test, diluir las muestras 1/5 añadiendo a 50 μ L de muestra 200 μ L de Diluyente de Muestras. Si hay que realizar adiciones múltiples de muestra (>10 muestras duplicadas), para facilitar la transferencia a la placa de análisis, hay que diluir las muestras en una placa de blanco del microanálisis. El control positivo no requiere dilución.

El Control Positivo no necesita dilución

No almacenar muestras diluidas

DESARROLLO DEL TEST

NOTA: Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente antes de comenzar el desarrollo del test.

1. INCUBACIÓN DE MUESTRAS/CALIBRADOR

- 1.1 Preparar la Solución de Lavado y los Calibradores como se ha descrito en el apartado "Preparación de los Reactivos"
- 1.2 Preparar las muestras como se describe en el apartado "Preparación de la Muestra"
- 1.3 Colocar el número necesario de pocillos de microensayo en la placa de ensayo (14 para los calibradores más dos para los controles y dos para las muestras). Disponerlos en columnas de ocho y llenar los espacios sobrantes en las columnas con pocillos de microensayo en blanco (disponibles en Argutus Medical).
Añadir calibradores (**G-A concentración equivalente 0-40µg/L**), control positivo y muestras diluidas (**100µL/pocillo**), por duplicado, a la placa de microensayo.
- 1.4 Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 ± 2 minutos** con agitación uniforme.
Nota: Se usó un Lab-line Instruments Titer- Plate Shaker a velocidad 2-3.
- 1.5 Retirar la cubierta de la placa y lavar cada tira 4 veces con Solución de Lavado (**250µL - 350µL pocillo**). Cuando se complete el lavado, sacudir firmemente la placa sobre una toallita de papel para asegurar la total eliminación de Solución de Lavado de los pocillos.
Nota: Es válido tanto un lavado automático como manual.

2. INCUBACIÓN CON CONJUGADO

- 2.1 Añadir **100µL** conjugado / pocillos a la placa de microtiter.
- 2.2 Otra vez, cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 ± 2 minutos** con agitación uniforme.
Nota: Se usó un Lab-line Instruments Titer- Plate Shaker a velocidad 2-3.
- 2.3 Lavar cada tira como en el paso 1,5.

3. DESARROLLO DE COLOR

- 3.1 Añadir **100µL** Substrato / pocillo usando una pipeta multicanal e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos exactamente.

4. PARADA

- 4.1 Parar la reacción añadiendo **100µL** de Solución de Parada / pocillo. Asegurarse de la mezcla completa del sustrato y la solución de parada.
- 4.2 Leer inmediatamente a 450nm usando la longitud de onda de 630nm como referencia (si fuese posible).

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de la absorbancia para cada muestra.
2. Dibujar la curva de calibrado de $A_{450/630nm}$ frente a $[\pi\text{GST}]\mu\text{g/L}$ (representación lineal). (Ver Figura 1).
3. Leer la $[\pi\text{GST}]$ ($\mu\text{g/L}$) indicada por la media de las absorbancias de las Muestras a partir de la curva de calibrado.
4. Multiplicar la $[\pi\text{GST}]$ calculada por el factor de dilución adecuado para obtener la actual $[\pi\text{GST}]$. Los resultados para las muestras de orina deben ser multiplicadas por el factor adicional de 1,25 para compensar la dilución de la muestra por el Buffer Estabilizante de Orina NEPHKIT®.
5. La concentración del Control Positivo se lee directamente de la curva. Su valor debe estar dentro del rango indicado.
6. Para instrucciones sobre como expresar la excreción urinaria de πGST como ratio (ng/min), ver Apéndice 1.
7. Los valores de las concentraciones de las muestras que estén fuera de la curva estándar no son válidos y se deben repetir con un factor de dilución mayor. No se debe extrapolar ningún dato.

CRITERIOS DE CONTROL DE CALIDAD

Siempre es incluido el control positivo para asegurar la validez de los resultados del test. Los resultados se consideran válidos si el valor del control positivo está dentro del rango expresado para ese lote. Si no se ajusta a ese rango, el test se considera no válido y debe ser repetido.

LIMITACIONES DE USO

Los resultados deben correlacionarse con el perfil de síntomas clínicos y otros resultados de laboratorio.

CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO

RANGO DE REFERENCIA

Se recomienda que cada laboratorio desarrolle su rango de referencia para su grupo de estudio.

ESPECIFICIDAD

El kit Argutus Medical Pi GST EIA es altamente específico para π GST. No se observan reacciones cruzadas con las isoformas mu o alfa de GST.

RANGO DE MEDIDA

La curva de calibrado cubre 1,25 - 40 μ g/L. que se corresponde con 3,12-100 μ g/L en muestras de orina diluidas 1/2 con Diluyente de Muestras o 6,25-200 μ g/L en muestras de plasma diluidas 1/5 con Diluyente de Muestras. Este rango puede ser ampliado aumentando la dilución de la muestra.

LIMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del kit Argutus Medical Pi GST EIA es de 0,7 μ g/L. El límite de detección es de 1,75 μ g/L en una muestra de orina diluida estabilizada 1/2 o 3,5 μ g/L en una muestra de plasma diluida 1/5.

INTERFERENCIAS

En este test no se observaron interferencias significativas con muestras lipémicas o ictericas.

Lipemia*: Menos del 10% de interferencias en más de 1000UI de muestras de plasma.

Ictericia: Menos del 10% de interferencias a 5mg/mL en muestras de plasma y menos del 10% a 5mg/mL en muestras de orina.

Las muestras que contienen sangre hemolizada no son válidas para medidas de π GST y no deben ser usadas.

*Usando intralípidos al 20% de Fresenius.

Estudios internos han mostrado que las muestras con valores extremadamente altos de factor reumatoide pueden causar interferencias con este análisis. Por favour, contactar con Argutus Medical para obtener información adicional.

REPRODUCIBILIDAD

Tabla 1 Variación intra ensayo del kit Argutus Medical Pi GST EIA determinada a partir de 2 muestras; 1 plasma y 1 orina con n= 20 replicados usando un test sencillo.

Muestra	πGST (μg/L)	DS	%CV	N
Plasma Inferior	210,1	4,65	2	24
Orina Inferior	3,8	0,09	2	24

Tabla 2 Variación inter ensayo del kit of the Argutus Medical Pi GST EIA determinada a partir de 4 muestras sobre 25 para cada lote realizando el protocolo completo para cada ensayo.

Muestra	π GST ($\mu\text{g/L}$)	DS	%CV	N
Plasma Inferior	218,2	14,72	7	25
Plasma Medio	315,9	22,36	7	25
Orina Inferior	5,4	0,52	9	25
Orina Media - Inferior	61,5	3,56	6	25

Tabla 3 Variación inter lote del kit Argutus Medical Pi GST EIA determinada con 5 muestras en 10 ensayos usando 3 lotes distintos del kit.

Muestra	π GST ($\mu\text{g/L}$)	DS	%CV	N
Plasma Inferior	222,4	13,35	6	30
Plasma Medio	326,4	25,49	8	30
Orina Inferior	6,1	1,00	16	30

EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACION

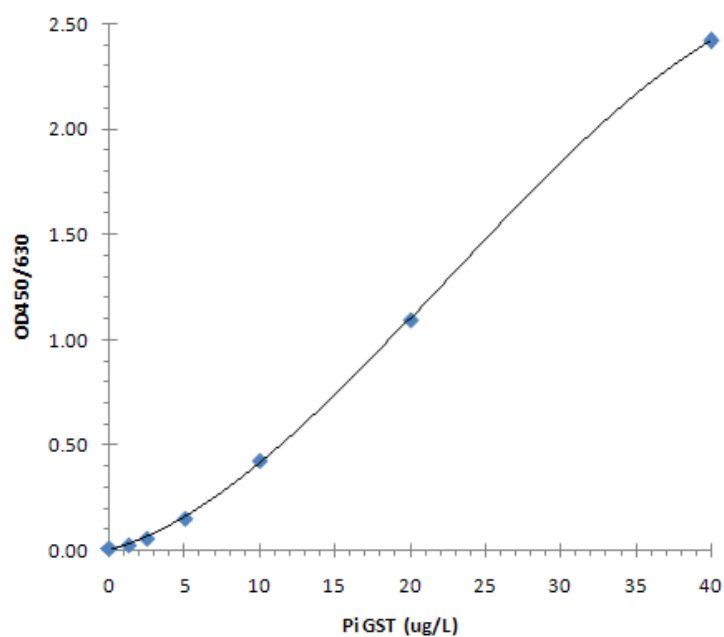


Figura 1: Curva de calibración típica obtenida usando el Argutus Medical Pi GST EIA. Trazado de $A_{450/630\text{nm}}$ con respecto a $[\pi\text{GST}] \mu\text{g/L}$.

GARANTÍA

Los datos aquí presentados se obtuvieron usando el protocolo descrito. Cualquier cambio o modificación del protocolo, no recomendada por Argutus Medical Internacional, puede afectar a los resultados. En ese caso Argutus Medical no sera responsable de los daños directos o indirectos.

APÉNDICE 1

EXPRESIÓN DE π GST COMO RATIO

La excreción de π GST es constante con el tiempo, no con el volumen de orina. Esto significa que puede ser más relevante expresar la excreción de π GST en términos de ratio (ng/min) mejor que en concentración. Esto puede ser importante en situaciones de diuresis anormal como oligo o poliuria. El ratio de excreción se obtiene como sigue:

RECOGIDA DE ORINA

La recogida de las muestras de orina es descrita en "Recogida y Manejo de las muestras". Anotar la hora de micción (T2), hora de la micción anterior (T1) y el volumen total de orina (V).

CÁLCULO DEL RATIO DE EXCRECIÓN DE π GST

1. Determinar los niveles urinarios de π GST usando el kit Argutus Medical Pi GST EIA (μ g/L):
2. Calcular el periodo durante el cual es recogida la orina (T) (T2-T1) en minutos.
3. Anotar el volumen de orina en mL (V).
4. Calcular el ratio de excreción como sigue:

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

RESUMEN DEL PROTOCOLO DEL ENSAYO

1. INCUBACIÓN MUESTRA / CALIBRADORES

- 1.1 Preparar Solución de Lavado y Calibradores.
- 1.2 Preparar las Muestras.
- 1.3 Poner los pocillos de ensayo en la placa. Añadir, por duplicado, Calibradores, Control Positivo y Muestras diluidas (**100µL / pocillo**).
- 1.4 Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 ± 2 minutos** con agitación uniforme.
- 1.5 Retirar la cubierta y lavar cada tira 4 veces con Solución de Lavado. (**250-350µL / pocillo**).

2. INCUBACIÓN CON CONJUGADO

- 2.1 Añadir **100µL** Conjugado/pocillo.
- 2.2 Otra vez, cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 ± 2 minutos** con agitación uniforme.
- 2.3 Lavar cada tira como en el Paso 1,5

3. DESARROLLO DE COLOR

- 3.1 Añadir **100µL** Substrato/pocillo e incubar a temperatura ambiente durante **15 minutos** exactamente.

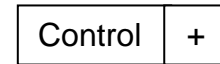
4. PARADA

- 4.1 Parar la reacción añadiendo **100µL** Solución de Parada/pocillo. Asegurarse de que la Solución Substrato y la de Parada se mezclan bien.
- 4.2 Leer inmediatamente a 450nm usando una longitud de onda de 630nm como referencia (si es posible)

CALCULO DE RESULTADOS

INTERPRETACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

Límites del control positivo



Reactivo para diagnóstico *in vitro*



Número de lote



Número de catálogo



Rango de temperatura



Usar antes del final de



Fabricante



Peligro biológico



REFERENCIAS

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-ES-08
03/09