

CE

REF **BIO85**
96 Vertiefung platte



ARGUTUS **MEDICAL**

Pi GST EIA

Enzymimmunoassay

DEUTSCH

Gebrauchsanweisung

INHALT

VERWENDUNGSZWECK	3
EINLEITUNG	3
TESTPRINZIP	3
BESTANDTEILE DES KITS	4
VORSICHTSMAßNAHMEN	5
STABILITÄT UND LAGERUNG	6
ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN	7
HERSTELLUNG DER REAGENZIEN	7
PROBENGEWINNUNG	8
PROBENLAGERUNG	8
PROBENVORBEREITUNG	9
TESTDURCHFÜHRUNG	10
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	11
QUALITÄTSKONTROLLKRITERIEN	11
EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS	11
LEISTUNGSDATEN DES TESTS	12
BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE	13
GARANTIE	14
ANHANG 1	14
KURZ-ARBEITSANLEITUNG	15
ERLÄUTUNG DER SYMBOLE	16
LITERATUR	17

VERWENDUNGSZWECK

Der Argutus Medical Pi-GST-EIA dient der quantitative Bestimmung der Pi-Glutathion-S-Transferase (π GST) in humanem Plasma und Urin. Wenden Sie sich bitte an Argutus Medical, wenn Sie die π GST in weiteren Flüssigkeiten bzw. andere GST-Subklassen analysieren möchten.

EINLEITUNG

UNTERSUCHUNGEN IM URIN

In der menschlichen Niere ist die π GST in den distalen Tubuli lokalisiert, während die Alpha-GST (α GST) vorwiegend in den proximalen Tubuli vorkommt^{1,2}. Wie Enzymimmuntests bestätigen, wird die π GST bei gesunden Personen in den Urin ausgeschieden^{3,4}. Jedes Ereignis, das eine Schädigung der distalen Tubuli auslöst, kann zum Anstieg der π GST-Freisetzung in den Urin führen und folgerichtig hat sich gezeigt, dass erhöhte π GST-Konzentrationen im Urin auf Verletzungen der distalen Tubuli infolge einer Nierentransplantat-Abstoßung,^{5,6} Nephrotoxizität⁵⁻⁷, Infektion⁸, Diabetes⁹ und chronischer Nierenschädigung¹⁰ hinweisen. Da sich auf der anderen Seite erhöhte α GST-Freisetzungen in den Urin mit Verletzungen der proximalen Nierentubuli assoziieren lassen, kann die gleichzeitige Messung von α GST und π GST eine Unterscheidung zwischen proximalen und distalen Tubuliverletzungen ermöglichen⁵⁻⁷.

UNTERSUCHUNGEN IM PLASMA

Außerdem sind die π GST-Konzentrationen im Plasma bei chronisch cholestatischen Erkrankungen und cholangiozellulären Karzinomen nachweislich erhöht¹¹. Erhöhte Gewebs- und Plasma-Konzentrationen an π GST können bei einer Reihe von Malignomen auftreten¹².

TESTPRINZIP

Bei dem Argutus Medical Pi-GST-Kit handelt es sich um einen quantitativen Enzymimmuntest. Methodisch basiert der Test auf der schrittweisen Zugabe von Probe, Antikörper-Enzymkonjugat und Substrat in die Wells (Auftragsstellen) einer mit anti- π GST-IgG beschichteten Mikroassayplatte. Die resultierende Farbintensität ist proportional zur π GST-Konzentration in der Probe. Nachweisbar sind Konzentrationen im Bereich von 1,25-40 μ g/L.

BESTANDTEILE DES KITS

- | | | | | |
|---|---|---------|------|-----|
| <p>1. Mit Antikörpern beschichtete Mikroassayplatte
12 Mikroassaystreifen mit jeweils 8vereinzelbaren Wells,
die mit anti-πGST-IgG beschichtet sind.
GEBRAUCHSFERTIG</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">PLA</td> </tr> </table> | PLA | | |
| PLA | | | | |
| <p>2. Kalibrator
Gereinigte πGST-Lösung in 50% (v/v) Glycerin (5 mg/L, 100μL). Enthält
Thiomersal.
KONZENTRAT</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CAL</td> </tr> </table> | CAL | | |
| CAL | | | | |
| <p>3. Probenverdünnungslösung
Proteinhaltige Lösung mit Stabilisatoren (50mL).
Enthält Natriumazid.
GEBRAUCHSFERTIG</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. Waschkonzentrat
20x phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit
Tween-20 (PBST, 55mL).
Enthält Thiomersal.
KONZENTRAT</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. Positivkontrolle
πGST in proteinhaltiger Lösung mit Stabilisatoren (4,5mL).
Enthält Thiomersal und Natriumazid.
GEBRAUCHSFERTIG</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. Konjugat
Anti-πGST-IgG konjugiert an HRP
(Meerrettichperoxidase) (11mL). Enthält Thiomersal.
GEBRAUCHSFERTIG</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. Substrat
Stabilisierte TMB-Lösung(11mL).
GEBRAUCHSFERTIG</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. Stopplösung
0,5M Schwefelsäure (11mL).
GEBRAUCHSFERTIG</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. NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer
Enthält Thiomersal und Natriumazid (10mL)
GEBRAUCHSFERTIG</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. Packungsbeilage/Gebrauchsanweisung</p> | <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">INS</td> </tr> </table> | INS | | |
| INS | | | | |

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSHINWEISE

- Der Argutus Medical Pi GST ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch vorgesehen.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Dieser Testkit enthält Material humane Ursprungs, das auf Hepatitis B-DNA HCV-RNA und HIV-RNA getestet und negativ befundet wurde. Da es jedoch keine absolut sicheren Testmethoden zum Ausschluss von Infektionsträgern gibt, müssen alle Patientenproben und Reagenzien als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, das bei Inkorporation Vergiftungen hervorrufen kann.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure, die ätzend ist. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt betroffene Stellen sofort großzügig mit Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
- Das Substrat enthält TMB und kann zu Reizungen der Haut und Schleimhäute führen. Bei Hautkontakt sofort großzügig mit Wasser spülen.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid, das bei Anreicherung in Blei- und Kupferrohrleitungen explosive Salze bilden kann. Bei der Beseitigung flüssiger Azidabfälle sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden.
- Alle klinischen Proben sowie infiziertes oder potentiell infiziertes Material sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) gehandhabt und beseitigt werden.
- Reste an Chemikalien oder an Präparationsbzw. Kitbestandteilen werden grundsätzlich als gefährlicher Abfall angesehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Während der Handhabung der Proben und der Durchführung des Tests müssen Schutzkleidung, Einweg-Latexhandschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nach der Testdurchführung gründlich die Hände waschen.
- Niemals mit dem Mund pipettieren. Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.

ALL GEMEINES ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- Argutus Medical empfiehlt, dass Anwender für eine optimale Studienkontinuität bei klinischen Testprojekten alle Proben unter Verwendung derselben Ausrüstungslosnummer untersuchen.
- Den Kit oder einzelne Reagenzien nicht nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die aktiven Komponenten des Kits sind als Einheit optimiert. Keine Kitkomponenten mit Komponenten anderer Chargen mischen.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Wird der Test nicht entsprechend den vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen durchgeführt, können die Ergebnisse ungültig sein. Alle Tests, die nicht den Vorgaben entsprechen, müssen wiederholt werden.

- Die Reagenzzugabe sollte am seitlichen Innenrand der Wells erfolgen, ohne diese Stelle mit der Pipettenspitze zu zerkratzen.
- Zu keinem Zeitpunkt der Testdurchführung dürfen die Wells austrocknen.
- Um Kontaminationen zu verhindern, muss für jede Patientenprobe und jedes Reagenz eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Keine Reagenzien einsetzen, die sichtbare Schleier oder Präzipitationen aufweisen.
- Das Waschkonzentrat muss vor der Rekonstitution gut durchmischt werden und darf keine Kristalle enthalten.
- Zur Herstellung der Waschlösung wird destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität benötigt. Wasser minderer Qualität oder kontaminiertes Wasser kann zu erhöhten Hintergrundwerten führen.
- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht und gut gemischt werden.
- Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über (2-8°C) aufbewahrt werden.
- Immer saubere Glas- oder Einmalgeräte für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Die Oberfläche der Mikroassaystreifen um die Wells immer tropffrei halten. Nach jedem Arbeitsschritt Streifen rund um die Wells vorsichtig mit Saugpapier trocknen.
- Die Unterseite der Mikroassayplatte muss vor dem Ablesen der Extinktionswerte sauber und trocken sein.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipettierplan mit Plattenschema erstellt werden.

STABILITÄT UND LAGERUNG

1. Alle Reagenzien des Kits sind bei Lagerung bei +2 bis +8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
2. π GST-Kalibratoren müssen innerhalb von 30 Minuten nach der Herstellung verwendet werden.
3. Die Waschlösung (PBST) ist bei Raumtemperatur bis zu zwei Wochen stabil, bei +2 bis +8°C bis zu einem Monat.
4. Die Mikroassaystreifen sollten bis zum Gebrauch zusammen mit Trockenmittel im verschlossenen Beutel bei +2 bis +8°C bleiben. Nicht benötigte Wells zusammen mit Trockenmittel in den Aufbewahrungsbeutel zurückgeben.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

1. Mikropipetten (5µL bis 50µL, 50µL bis 200µL und 200µL bis 1000µL) und eine Mehrkanalpipette (50µL bis 200µL)
2. Waschgerät für die Mikroassaystreifen
3. ELISA-Platten-Reader mit einem Filter der Wellenlänge 450nm und nach Möglichkeit einem 630nm-Filter zur Referenzmessung
4. 1L Becherglas
5. Stoppuhr
6. Flüssigkeitstrog
7. Deionisiertes/Destilliertes Wasser
8. Plattenschüttler
9. Messzylinder
10. Teströhrchen
11. Raumtemperatur-Inkubator

HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

1. WASCHLÖSUNG (PBST)

Waschkonzentrat 1:20 verdünnen, z.B. durch Hinzufügen von 10mL Waschkonzentrat zu 190mL deionisiertem Wasser. Nur das für den Test benötigte Volumen an Waschlösung ansetzen. **Das Konzentrat darf vor der Verdünnung keine Salzkristalle enthalten!** Eventuell vorhandene Kristalle durch vorsichtiges Aufwärmen des Konzentrats bei +37°C für 15-30 Minuten lösen. Für jeden Teststreifen mit 8 Wells werden 25mL Waschlösung benötigt.

2. KALIBRATOREN

Aus der πGST-Stammlösung den 40µg/L Kalibrator (A) wie folgt herstellen:

Stammlösung: 20µL
Probenverdünnungslösung: 2480µL
Gesamtvolumen: 2500µL @ 40µg/L (A)

Unter Verwendung beschrifteter Röhrchen werden die weiteren Kalibratoren wie folgt hergestellt:

Kalibrator (µg/L)	Volumen Kalibrator (µL)	Volumen Probenverdünnungslösung (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

PROBENGEWINNUNG

URIN

Der Argutus Medical Pi-GST-EIA kann zwar zur Bestimmung der π GST-Konzentration in jeder beliebigen Urinprobe verwendet werden, aufgrund der bei einer Proteinurie gegebenen tageszeitlichen Schwankungen¹³ ist es zur Erzielung optimaler Ergebnisse aber wichtig, zeitkontrollierte, quantitative Urinproben zu sammeln und sowohl den Sammelzeitraum als auch das entsprechende Volumen genau zu protokollieren. Dies ermöglicht es dann, die π GST-Ausscheidung in den Urin als Rate (ng/min) angeben zu können. Siehe Anhang Empfohlen wird der Einsatz von Übernacht-Urinproben oder 24-Std. Sammelurinproben in den Test. Wenn Sie andere Sammelmethode und -zeiträume verwenden, sollten Sie bei Argutus Medical entsprechende Auskünfte einholen. Geben Sie möglichst bald nach der Probennahme 200 μ L NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer zu 800 μ L Urin (4:5-Verdünnung der Probe), und zwar auch, wenn die Probe nicht gelagert werden soll. Falls die Probe bei visueller Betrachtung Blut enthalten sollte, muss dies sofort durch eine 5- minütige Zentrifugation bei 10000g abgetrennt werden. Ist der Überstand nach der Zentrifugation klar und ohne Anzeichen auf Hämolyse, kann ein Aliquot entnommen und auf π GST getestet werden. **Falls jedoch im Überstand immer noch Blut sichtbar sein sollte, eignet sich diese Probe nicht für die π GST-Bestimmung.** α GSTBestimmungen werden dagegen durch die Anwesenheit von Blut in der Probe nicht beeinträchtigt. Die Probe muss vor der Zugabe des NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffers zentrifugiert und der Überstand abgenommen werden.

PLASMA

Das Plasma muss während der folgenden Behandlung auf einer Temperatur von +2 bis +8°C gehalten werden. Proben in Lithiumheparin- oder EDTA-Röhrchen sammeln und innerhalb von 6 Stunden nach Entnahme bei +2 bis +8°C 10 Minuten bei 2500g zentrifugieren. Den Plasmahaltigen Überstand vorsichtig dekantieren und bei +2 bis +8°C noch einmal 10 Minuten bei 6000g zentrifugieren, um eine komplette Entfernung der Blutplättchen sicher zu stellen. Dann das Plasma vorsichtig absaugen, ohne das Pellet in irgendeiner Weise zu zerstören. Glutathion-S-Transferase pi (GST pi) ist in den Thrombozyten vorhanden und muss entfernt werden.

PROBENLAGERUNG

URIN

Urinproben dürfen nicht ohne Zusatz des NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffers aufbewahrt werden. Der NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer muss innerhalb von 12 Stunden nach Probengewinnung zugegeben werden. Die Testdurchführung sollte möglichst rasch nach der Probengewinnung erfolgen. Nach Zugabe des NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffers können die Proben allerdings bei +2 bis +8°C eine Woche bzw. eingefroren bei -20°C für mindestens 12 Monate gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Ohne NEPHKIT® Urin-

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

PLASMA

Die Proben sollten möglichst rasch nach der Gewinnung bei -20°C eingefroren werden. Bei Proben, die bis zu 3 Monaten bei -20°C gelagert wurden, ließ sich keine Änderung der π GSTKonzentration feststellen. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist jedoch zu vermeiden.

PROBENVORBEREITUNG

URIN

Die Urinproben müssen unmittelbar vor Einsatz in den Test durch Zugabe von 200 μ L Probe zu 200 μ L Probenverdünnungslösung 1:2 verdünnt werden.

PLASMA

Die Plasmaproben müssen unmittelbar vor Einsatz in den Test durch Zugabe von 50 μ L Probe zu 200 μ L Probenverdünnungslösung 1:5 verdünnt werden.

Müssen zahlreiche Proben verdünnt werden (>10 Doppelbestimmungen), wird zur Vereinfachung des Verfahrens eine unbeschichtete Mikroassayplatte für diese Vorverdünnungsschritte empfohlen. Die Positivkontrolle muss nicht verdünnt werden. Grundsätzlich sollten keine verdünnten Proben aufbewahrt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Alle Reagenzien sollten vor Einsatz in den Test Raumtemperatur erreicht haben.

1. INKUBATION DER PROBEN / KALIBRATOREN

1.1. Waschlösung und Kalibratoren, wie im Abschnitt "Herstellung der Reagenzien" beschrieben, herstellen.

1.2. Proben, wie im Abschnitt "Probenvorbereitung" beschrieben, vorbereiten.

1.3.1 an Wells in die Mikroassayplatte einsetzen (14 für die Kalibratoren plus jeweils zwei pro Kontrolle und Probe). Die Wells sollten immer in 8er Reihen eingesetzt und leere Plätze mit unbeschichteten Wells (erhältlich bei Argutus Medical) aufgefüllt werden.

Kalibratoren (**G-A; äquivalente Konzentration 0-40µg/L**), Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) jeweils paarweise in die Mikroassayplatte geben.

1.4. Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) **60 ± 2 Minuten** unter gleichmäßigem Schütteln inkubieren.

Hinweis: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.

1.5. Abdeckung entfernen und jeden Streifen 4x mit Waschlösung (**250µL - 350µL Well**) waschen. Platte anschließend auf saugfähigem Papier fest ausklopfen, bis die Wells vollkommen frei von Waschlösung sind.

Hinweis: Das Waschen kann automatisch oder manuell durchgeführt werden.

2. INKUBATION MIT KONJUGAT

2.1. In jedes Well der Mikroassayplatte **100µL** Konjugat pipettieren.

2.2. Mikroassayplatte erneut abdecken und bei Raumtemperatur (20-25°C) **60 ± 2 Minuten** unter gleichmäßigem Schütteln inkubieren.

Hinweis: Es wurde ein Plattenschüttler der Firma Lab-line Instruments mit der Geschwindigkeitseinstellung 2-3 verwendet.

2.3. Jeden Streifen wie unter Schritt 1,5 beschrieben waschen.

3. FARBENTWICKLUNG

3.1. Mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well **100µL** Substrat pipettieren und bei Raumtemperatur genau **15 Minuten** inkubieren.

4. STOPP

- 4.1. Reaktion durch Zugabe von **100µL** Stopplösung/Well abstoppen. Sorgen Sie dafür, dass sich Substrat und Stopplösung vollständig miteinander vermischen.
- 4.2. Sofort Extinktion bei 450nm und, falls möglich, bei der Referenzwellenlänge von 630nm ablesen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Mittelwerte der beiden Extinktionen jeder Probe berechnen.
2. Kalibrationskurve E450/630nm gegen [πGST]µg/L (linearer Graph) erstellen. (Siehe Abbildung 1).
3. Aus der Kalibrationskurve anhand der mittleren Extinktionswerte der Proben (s.o.) die jeweils zugehörige Konzentration [πGST] (µg/L) ablesen.
4. Zur Erzielung der tatsächlichen πGSTKonzentration in der jeweiligen Patientenprobe, die abgelesene [πGST] mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren. Die Ergebnisse der Urinproben müssen zur Berücksichtigung der Probenvorverdünnung mit dem NEPHKIT® Urin-Stabilisierungspuffer zusätzlich mit dem Faktor 1,25 multipliziert werden.
5. Die Konzentration der Positivkontrolle kann direkt aus der Kalibrationskurve abgelesen werden. Ihr Wert sollte innerhalb des innen im Packungsdeckel angegebenen Bereichs liegen.
6. Eine Vorschrift, nach der Sie die πGST-Freisetzung in den Urin als Rate (ng/min) berechnen können, finden Sie in Anhang 1.
7. Probenkonzentrationen mit Messwerten außerhalb der Standardkurve sind ungültig und müssen mit einem höheren Verdünnungsfaktor wiederholt werden. Es ist nicht zulässig, Daten zu extrapolieren.

QC-KRITERIEN

Die Positivkontrolle ist bei jedem Test mitzuführen, um die Gültigkeit der Testergebnisse bestimmen zu können. Die Ergebnisse gelten als gültig, wenn der Wert der Positivkontrolle innerhalb des innen im Packungsdeckel angegebenen Bereichs liegt. Wird dieses Kriterium nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

Die Testergebnisse müssen mit dem klinischen Profil des Patienten und weiteren Laborergebnissen in Beziehung gesetzt werden.

LEISTUNGSDATEN DES TESTS

REFERENZBEREICH

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

SPEZIFITÄT

Der Argutus Medical Pi-GST-EIA ist äußerst spezifisch für den Nachweis der π GST. Es wurden keine signifikanten Kreuzreaktionen mit den Isoformen Mu- oder Alpha-GST beobachtet.

MESSBEREICH

Die Kalibrationskurve umfasst den Bereich 1,25 - 40 μ g/L, d.h. in 1/2 mit Probenverdünnungslösung verdünnten Urinproben können Konzentrationen von 3,12 - 100 μ g/L π -GST bzw. in den 1:5 mit Probenverdünnungslösung verdünnten Plasmaproben 6,25-200 μ g/L π -GST nachgewiesen werden. Dieser Nachweisbereich kann durch eine höhere Probenverdünnung erweitert werden.

NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze des Argutus Medical Pi-GST-EIA liegt bei 0,7 μ g/L. Dies heißt, dass sich in einer 1:2 verdünnten stabilisierten Urinprobe minimal 1,75 μ g/L bzw. in einer 1:5 verdünnten Plasmaprobe minimal 3,5 μ g/L nachweisen lassen.

STÖRUNGEN DES TESTS

Weder mit lipämischen noch mit ikterischen Proben wurden signifikante Störungen des Tests beobachtet.

Lipämie*: Weniger als 10% Beeinträchtigung bei bis zu 1000IU in der Plasmaprobe.
Ikterus: Weniger als 10% Beeinträchtigung bei Konzentrationen von 5mg/mL Bilirubin in der Plasmaprobe oder der Urinprobe. Hämolytierte Proben eignen sich nicht für π GSTBestimmungen und dürfen nicht in diesen Test eingesetzt werden.

*Test mit Intralipid 20% der Firma Fresenius.

Interne Studien haben gezeigt, dass Proben mit extrem hoher Konzentration an Rheumafaktoren diesen Test ebenfalls stören können. Wenden Sie sich bitte zwecks weiterer Informationen an Argutus Medical.

REPRODUZIERBARKEIT

Tabelle 1: Intra-assay-Variation des Argutus Medical Pi-GST-EIA Die Bestimmung erfolgte mit 2 Proben (1 Plasma- und 1 Urinproben), die in n=24 Wiederholungen innerhalb eines einzelnen Laufs getestet wurden.

Probe	π GST ($\mu\text{g/L}$)	SD	%VK	N
Plasma, niedrig	21,1	4,65	2	24
Urin, niedrig	3,8	0,09	2	24

Tabelle 2: Inter-assay-Variation des Argutus Medical Pi-GST-EIA Die Bestimmung erfolgte mit 4 Proben, die 25 x unabhängig voneinander mit der gleichen Charge getestet wurden.

Probe	π GST ($\mu\text{g/L}$)	SD	%VK	N
Plasma, niedrig	218,2	14,72	7	25
Plasma, mittel	315,9	22,36	7	25
Urin, niedrig	5,4	0,52	9	25
Urin, niedrig bis mittel	61,5	3,56	6	25

Tabelle 3: Variationsbreite des Argutus Medical Pi-GST-EIA zwischen verschiedenen Chargen des Kits Die Bestimmung erfolgte mit 4 Proben, die jeweils 25 x mit 3 verschiedenen Chargen des Kits getestet wurden.

Probe	π GST ($\mu\text{g/L}$)	SD	%VK	N
Plasma, niedrig	222,4	13,35	6	30
Plasma, mittel	326,4	25,49	8	30
Urin, niedrig	6,1	1,00	16	30

BEISPIEL EINER KALIBRATIONSKURVE

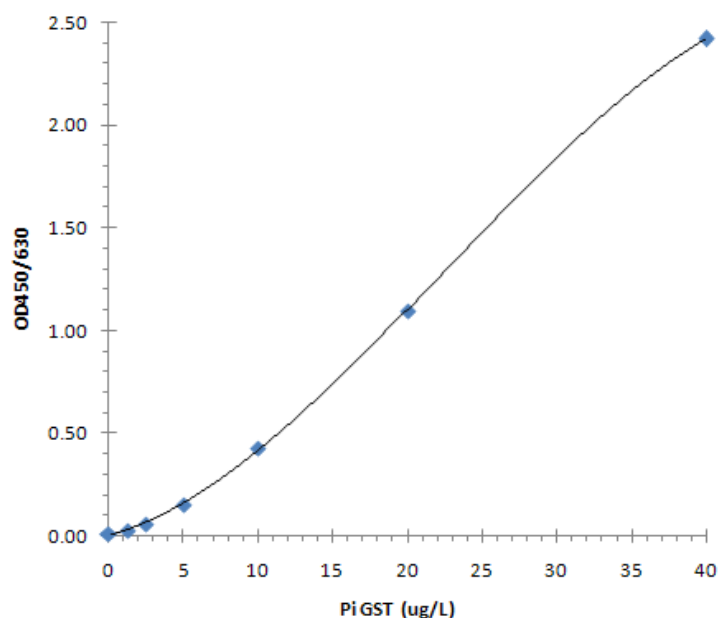


Abbildung 1: Typische Kalibrationskurve des Argutus Medical Pi GST EIA. Lin-lin-Auftragung der Extinktion $E_{450/630\text{nm}}$ gegen $[\pi\text{GST}]$ in $\mu\text{g/L}$,

GARANTIE

Die hier präsentierten Leistungsdaten wurden mit der hier beschriebenen Testdurchführung erhalten. Jede Änderung oder Modifikation der Durchführung, die nicht von Argutus Medical empfohlen wird, kann die Ergebnisse beeinträchtigen. In diesem Falle erkennt Argutus Medical alle erklärten, stillschweigend mit einbegriffenen gesetzlichen Garantien nicht an, einschließlich der Vermarktung und der Tauglichkeit für den Gebrauch. Argutus Medical übernimmt dann für direkte und folgende Schäden keine Haftung.

ANHANG 1

ANGABE DER IN DAS URIN FREIGESETZTEN π GST ALS RATE

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

URINGEWINNUNG

Urinproben, wie unter "Probengewinnung" beschrieben, sammeln. Notieren Sie dabei den Zeitpunkt des Urinlassens (T_2), den Zeitpunkt des vorherigen Urinlassens (T_1) und das Gesamturinvolumen (V).

BERECHNUNG DER π GSTAUSSCHIEDUNGSRATE

1. Bestimmen Sie unter Verwendung des Argutus Medical Pi-GST-EIA die π GST-Konzentrationen im Urin ($\mu\text{g/L}$).
2. Berechnen Sie den Zeitraum T ($T_2 - T_1$), über den das Urin gesammelt wurde, in Minuten.
3. Notieren Sie das Urinvolumen (V) in mL.
4. Berechnen Sie daraus die Freisetzungsrates wie folgt:

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

KURZ-ARBEITSANLEITUNG

1. INKUBATION DER PROBEN / KALIBRATOREN

- 1.1 Herstellung der Waschlösung und der Kalibratoren.
- 1.2 Vorbereitung der Proben.
- 1.3 Wells in die Mikroassayplatte einsetzen. Kalibratoren, Positivkontrolle und verdünnte Proben (**100µL/Well**) in die Wells geben; jeweils Duplikate ansetzen.
- 1.4 Mikroassayplatte abdecken und bei Raumtemperatur (+20 bis +25°C) **60 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
- 1.5 Abdeckplatte entfernen und jeden Streifen 4x mit Waschlösung waschen. (**250-350µL/Well**)

2. INKUBATION MIT KONJUGAT

- 2.1 In jedes Well **100µL** Konjugat pipettieren.
- 2.2 Mikroassayplatte wieder abdecken und bei Raumtemperatur (+20 bis +25°C) **60 ± 2 Minuten** bei gleichmäßigem Schütteln inkubieren.
- 2.3 Jeden Streifen wie unter 1.5 beschrieben waschen.

3. FARBENTWICKLUNG

- 3.1 In jedes Well **100µL** Substrat pipettieren und genau **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

4. STOPP

- 4.1 Reaktion durch Zugabe von **100µL** Stopplösung pro Well abstoppen. Substrat und Stopplösung müssen sich vollständig mischen.
- 4.2 Sofort Extinktion bei 450nm und (sofern vorhanden) bei der Referenzwellenlänge von 630nm ablesen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE

Bereich der Positivkontrolle



In vitro-Diagnostikum



Charge



Katalog-Nr.



Temperaturbegrenzungen



Verwendbar bis



Hersteller



Biologische Gefahren



LITERATUR

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-DE-08
03/09