

For the Quantitative Measurement of Alpha Glutathione S-Transferase ( $\alpha$ GST) in Human serum and plasma

### INTENDED USE

The FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay is a paramagnetic particle immunoassay for the *in-vitro* quantitative determination of  $\alpha$ GST in human serum and plasma. Measurement of  $\alpha$ GST can be used as an aid in the assessment of liver damage. The FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay is designed for use with the FastPack® IP System.

### SUMMARY

In the liver, alpha glutathione S-transferase is located in the hepatocytes whereas pi GST ( $\pi$ GST) is confined to the intrahepatic bile duct cells. This heterogenous GST subclass distribution suggests that the isoenzymes have unique *in vivo* functions in different hepatic regions and that the detection of GST subclass levels in biological fluids would be of significant use in monitoring the integrity of specific hepatic regions.

Currently, liver injury is studied by the measurement of liver enzymes such as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). A disadvantage of these markers is that they are not distributed uniformly throughout the liver, the periportal concentration being greater than the centrilobular. In contrast,  $\alpha$ GST has been found to be equally distributed in both the centrilobular and periportal regions. Since the centrilobular hepatocytes are very susceptible to damage in a variety of clinical conditions including Allograft Rejection, Viral Hepatitis, Chronic Active Hepatitis and Hepatotoxicity,  $\alpha$ GST would be a more sensitive indicator of hepatic status in these and other, clinical situations. Therefore,  $\alpha$ GST quantitation can be used to study the hepatocellular status of individuals at risk for hepatic damage.<sup>1-7</sup>

### TEST PRINCIPLE

The FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay is a chemiluminescence assay based on the “sandwich” principle.

- Primary incubation: Antibody solution (mixture of a biotinylated monoclonal  $\alpha$ GST-specific antibody and a monoclonal  $\alpha$ GST antibody labeled with alkaline phosphatase) [100  $\mu$ L] reacts with  $\alpha$ GST from the patient's sample, control or calibrator [100  $\mu$ L].
- Secondary incubation: Streptavidin-coated paramagnetic particles [150  $\mu$ L] are combined with the reaction mixture. During this incubation, the sandwich complex is bound to the solid-phase via the interaction of biotin and streptavidin.
- Removal of unbound materials: The paramagnetic particles are repeatedly washed with wash buffer [0.2 mL/wash] to remove unbound materials.
- Substrate addition and detection: Chemiluminogenic substrate [140  $\mu$ L] is added to the solid-phase bound complex and results in “glow” chemiluminescence, which is measured using the FastPack® IP System.
- The amount of bound labeled-antibody is directly proportional to the concentration of  $\alpha$ GST in the sample.

### REAGENTS – Content and Concentration

Each FastPack® IP carton contains:

- 30 FastPack® IPs

Each FastPack® IP Contains:

- Paramagnetic Particles, 150  $\mu$ L  
Streptavidin-coated paramagnetic particles in buffer containing 0.1% ProClin® 300 as a preservative.
- $\alpha$ GST Antibody Solution, 100  $\mu$ L  
Antibody solution containing a mixture of a biotinylated mouse monoclonal anti- $\alpha$ GST antibody and a second mouse monoclonal anti- $\alpha$ GST antibody labeled with alkaline phosphatase in a protein matrix containing ProClin® 150 as preservative.
- Wash Buffer, 2.0 mL  
Tris buffer containing surfactants.
- Substrate, 140  $\mu$ L  
ImmuGlow™ Plus: Indoxyl-3-phosphate and lucigenin in buffer containing preservatives.

Materials required but not provided

- FastPack® IP System
- FastPack®  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048
- FastPack®  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049
- FastPack®  $\alpha$ GST Sample Diluent Kit – Cat. No. 25000050

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in-vitro* diagnostic use only.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink or smoke in designated work areas.
- Wash hands thoroughly after handling specimen.
- HAMA Interference: some individuals have antibodies to mouse protein (HAMA), which can cause interference in immunoassays that employ antibodies derived from mice<sup>9</sup>.
- FastPack<sup>®</sup> IP reagents are stable until the expiration date on the label when stored and handled as directed. Do not use FastPack<sup>®</sup> IP reagents beyond the expiration date.
- Discard used FastPacks into a Biohazard container.
- The components containing ProClin<sup>®</sup> are classified per applicable European Economic Community (EEC) Directives as: Irritant (Xi). The following are appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases for ProClin<sup>®</sup>:

R36/38 Irritating to eyes and skin  
R43 May cause sensitization by skin contact  
S24/25 Avoid contact with skin and eyes  
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves  
S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste

## STORAGE INSTRUCTIONS

Store at 2 – 8 °C.

## SPECIMEN COLLECTION/PREPARATION

1. Serum, EDTA or lithium-heparin plasma samples can be used for the FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST IP Immunoassay.
2. The Clinical and Laboratory Standards Institute provides the following recommendations for handling, processing and storing blood.<sup>9,10</sup>
  - A. Collect all blood samples observing routine precautions for venipuncture.
  - B. For plasma samples:
    - Collect samples in an EDTA (lavender top) or heparinized (green top) tube.
    - Mix the tube immediately after collection by gently inverting it several times.
    - Plasma should be separated from the cells by centrifugation within 3 hours from time of collection and stored at 2 – 8 °C. Transfer the plasma from the original tube for storage.
    - If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at –20 °C or colder.
  - C. Samples should be free of red blood cells, or other particulate material for optimal results.
  - D. Samples showing turbidity and particulate matter should be centrifuged prior to use.
  - E. Ensure the samples are free of bubbles.

## ASSAY PROCEDURE

See the FastPack<sup>®</sup> IP System Procedure Manual for detailed instructions for running the FastPack<sup>®</sup> IP assays.

## INSTRUMENTATION

FastPack<sup>®</sup> IP System

## DETAILS OF CALIBRATION

During the FastPack<sup>®</sup> IP production process, Qualigen generates a master standard curve and places this information in the barcode of each FastPack<sup>®</sup> IP label, where it can be read by the FastPack<sup>®</sup> IP System analyzer during the testing sequence. The FastPack<sup>®</sup> IP System analyzer must be calibrated by the end user so that it is properly adjusted for the particular lot of FastPacks that are being used. Separate calibrations must be run for each type of test, i.e. Total PSA, Testosterone or  $\alpha$ GST. The frequency of calibration varies for each test type. For the FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay, the FastPack<sup>®</sup> IP System analyzer must be calibrated once every 30 days or whenever a new lot of  $\alpha$ GST FastPacks are to be used.

Whenever the user performs a calibration for a particular lot of FastPacks or uses a new lot of calibrator, 2 FastPacks must be run for calibration (duplicates). When the calibration expires (30 days after initial calibration) 2 FastPacks must be run for calibration. See FastPack<sup>®</sup> IP System Procedure Manual for "Running a Calibration".

Use FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048

## RESULTS

The FastPack<sup>®</sup> IP System analyzer uses the information from the barcode to construct a lookup table of x,y values that represent the standard curve and estimates the concentration of unknown samples by linear interpolation.

## QUALITY CONTROL

Quality control materials are essential for monitoring the system performance of assays. Good Laboratory Practices (GLP) includes the use of control specimens to ensure that all reagents and protocols are performing properly. See FastPack<sup>®</sup> IP System Procedure Manual for "Control Testing". At least two levels of quality control materials should be used. Users should follow the appropriate national, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.

Controls available: FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049

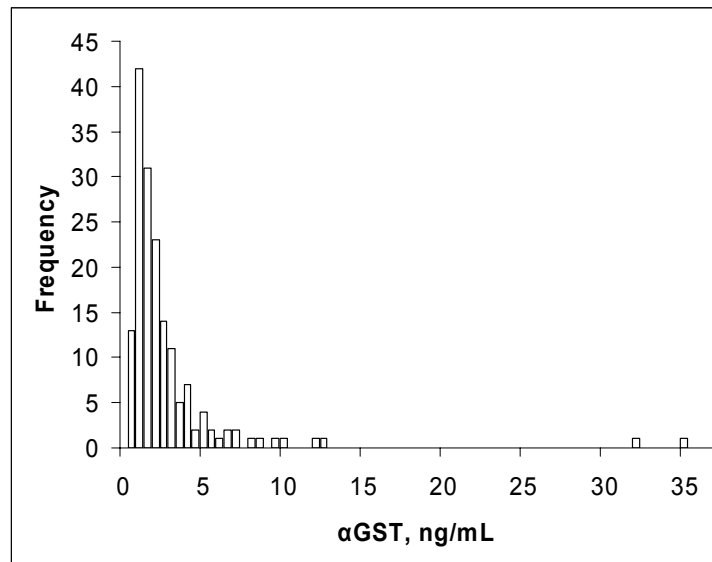
## LIMITATION OF PROCEDURE

- Plasma samples to be collected using EDTA or lithium-heparin as the anticoagulant.
- Specimens can be measured within the reportable range of the limit of quantitation (0.5 ng/mL) and the upper end of the calibration range of 200 ng/mL.
- Samples >200 ng/mL should be reported as such or re-run after dilution. Samples may be diluted using the  $\alpha$ GST Sample Diluent until values within range of the assay are obtained.
- The FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay does not show a high-dose hook effect up to 5,000 ng/mL.
- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits employing mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in a sample have the potential to cause interference in immunoassay systems. Infrequently,  $\alpha$ GST levels may appear depressed due to heterophilic antibodies present in the patient's sample or to nonspecific protein binding. If the  $\alpha$ GST level is inconsistent with clinical evidence, additional  $\alpha$ GST testing is suggested to confirm the result.
- For diagnostic purposes, the FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.
- Performance of this assay has not been established with neonatal specimens.

## EXPECTED VALUES

Samples were obtained from 167 individuals. Samples were obtained from apparently healthy blood donors without any clinically abnormal indications.  $\alpha$ GST levels were determined using the FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay in conjunction with the FastPack<sup>®</sup> IP System in order to establish the  $\alpha$ GST concentration in the normal population. The reference interval (5<sup>th</sup> to 95<sup>th</sup> percentiles) for the FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay is 0.24 – 11.4 ng/mL. The reference intervals reflect the donor population of this study group. Each laboratory should determine their own reference range appropriate for their population. The distribution of the values is presented in the histogram below.

Sample Type	Reference Group	n	Median Age (years)	Age Range	Median Concentration (ng/mL)	95% Reference Interval (ng/mL)
Serum	Males and Females	167	35	18 - 55	1.4	0.24-11.4



## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision

Three control serum pools spiked with varying amounts of  $\alpha$ GST were assayed using three lots of FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST reagents and four FastPack<sup>®</sup> IP instruments. Each control was tested in duplicate determinations per day over a period of 10 days for a total of 80 replicate determinations per control. The data was analyzed using the analysis of variance (ANOVA) technique and within-assay and total imprecision were determined. Mean, standard deviation (SD), and percent coefficient of variation (%CV) were calculated for each control solution.

#### Within-Assay Imprecision

	Control 1	Control 2	Control 3
Mean ng/mL $\alpha$ GST	7.3	37.6	180.5
SD	0.34	1.5	10.4
%CV	4.7	4.0	5.8

#### Total Imprecision

	Control 1	Control 2	Control 3
Mean mIU/mL $\alpha$ GST	7.6	37.6	180.5
SD	0.80	3.0	25.4
%CV	11.1	7.9	14.1

### Range of Linearity.

For  $\alpha$ GST tested by FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST, based on the CLSI EP-6A evaluation, the method has been demonstrated to be linear from 1.3 to 26.7 ng/mL, with 5.0 ng/mL up to 66.8 ng/mL, and 25.0 ng/mL in the interval 66.8 and 267.4 ng/mL  $\alpha$ GST. Linearity determined by diluting of human serum clinical sample spiked with known high endogenous  $\alpha$ GST concentration. The FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST is linear over the range of 0.5 ng/mL (LOQ) to 200 ng/mL. (% Recovery = [Measured value/Expected Value] X 100).

### Linearity Upon Dilution

A serum sample spiked with high endogenous  $\alpha$ GST concentration was diluted 90% to 0.5% with the serum sample and quantified in triplicate determinations with one FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST reagent lot on a single FastPack<sup>®</sup> instrument. Measured values of the dilutions compared to their expected values (determined in the same assay) based on the measured value of the Neat sample and respective dilution. (% Recovery = [Measured value/Expected Value] X 100).

%dilution	Expected $\alpha$ GST, ng/mL	Measured $\alpha$ GST, ng/mL	% Recovery
100.0%	N/A	267.4	N/A
90.0%	240.6	229.2	95.2
75.0%	200.5	173.8	86.7
50.0%	133.7	122.1	91.3
25.0%	66.8	54.8	82.0
12.5%	33.4	29.0	86.8
6.3%	16.7	14.3	85.6
3.0%	8.0	6.8	85.0
1.0%	2.7	2.5	92.6
0.5%	1.3	1.2	92.3

In addition, three serum samples with high endogenous  $\alpha$ GST levels were diluted with  $\alpha$ GST Sample Diluent containing phosphate buffered saline solution and Tween 20. The measured values of the dilutions were compared to their expected values.

Serum 1	Expected (ng/mL)	Measured (ng/mL)	% Recovery
Neat	N/A	>200	N/A
1:160	N/A	68.5	N/A
1:320	34.3	32.9	96.6
1:640	17.1	16.4	95.9
1:1280	8.6	7.9	91.9
1:2560	4.3	4.2	97.7

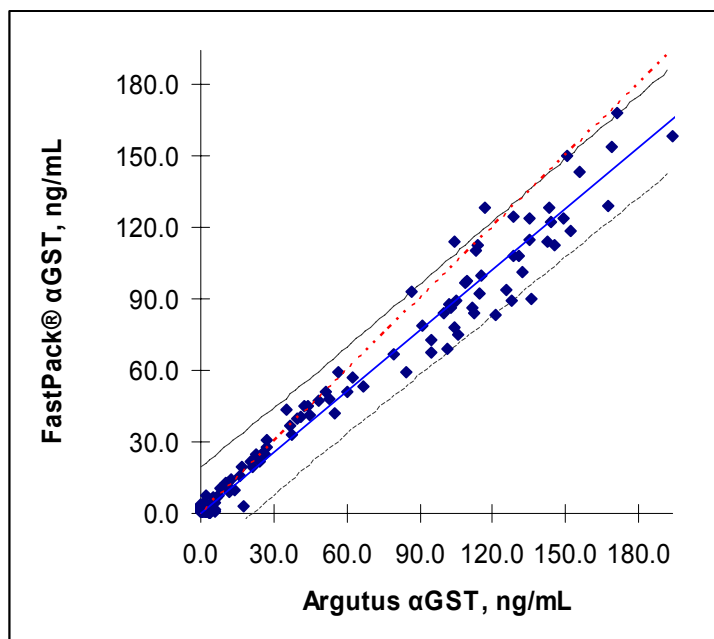
Serum 2	Expected (ng/mL)	Measured (ng/mL)	% Recovery
Neat	N/A	>200	N/A
1:320	N/A	99.9	N/A
1:640	50.0	52.0	104.0
1:1280	25.0	23.9	95.6
1:2560	12.5	12.2	97.6
1:5120	6.25	5.4	86.4

Serum 3	Expected (ng/mL)	Measured (ng/mL)	% Recovery
Neat	N/A	>200	N/A
1:20	N/A	148.9	N/A
1:40	74.4	70.7	95.0
1:80	37.2	35.8	96.2
1:160	18.6	18.2	87.8
1:320	9.3	9.1	97.8

### Method Comparison

Clinical serum samples (n=141) were used to compare the values obtained using the FastPack® IP αGST method and the values obtained using the Argutus Medical HEPKIT® Alpha method. The values were evaluated for agreement using Deming regression analysis, with the associated correlation coefficient.

n	Range of Observation (ng/mL)	Intercept (ng/mL)	Slope	r
141	0.0 – 193.9	1.7	0.85	0.986



### INTERFERING SUBSTANCES

The effect of icteric, lipemic, and hemolyzed serum samples on quantification of αGST was investigated by spiking one serum pool with an αGST concentration of ~60.0 ng/mL with known concentrations of bilirubin, triglycerides, and hemoglobin, and another serum pool with endogenous αGST concentration of ~3.0 ng/mL with the same concentrations of the interfering substances. The values obtained for the serum pools with each interfering substance were compared to the values obtained for the serum pools without the interfering substance and the percentage bias or absolute bias in ng/mL determined. These compounds did not show interference at the levels indicated.

	Interfering Substance		
	Bilirubin (30 mg/dL)	Lipemia (1000 mg/dL)	Hemoglobin (500 mg/dL)
Non-spiked aliquot	3.8 ng/mL	3.0	3.9
Spiked aliquot	3.9 ng/mL	3.2	3.8
Absolute bias, ng/mL	+0.1	+0.2	-0.1

	Interfering Substance		
	Bilirubin (30 mg/dL)	Lipemia (1000 mg/dL)	Hemoglobin (500 mg/dL)
Non-spiked aliquot	66.5 ng/mL	57.7 ng/mL	58.7
Spiked aliquot	66.8 ng/mL	56.2 ng/mL	56.2
% Bias	+0.5%	- 2.6%	- 4.3%

**Cross-reactivity**

No significant cross reactivity (<0.5 ng/mL) was obtained when a FastPack®  $\alpha$ GST sample was spiked with the following cross-reactants: m $\mu$  GST, at 250 ng/mL, and pi GST at 2000 ng/mL.

**Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantitation (LOQ)**

The limit of blank (LOB, the highest measurement likely to be observed for a blank sample), limit of detection (LOD, the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with type I and II error rates set to 5%), and limit of quantitation (LOQ, the lowest amount of analyte in a sample that can be reliably detected and at which the total error meets the pre-specified requirement for accuracy) were determined according to CLSI EP17-A for the FastPack® IP  $\alpha$ GST assay. In this study, the limit of blank was determined from 20 replicate determinations of the FastPack®  $\alpha$ GST sample on each of three different FastPack® IP instruments. Raw RLUs from the assays were converted to apparent ng/mL based on the calibration curve for each assay. The LOB was determined as the maximum observed value. This value was 0.12 ng/mL  $\alpha$ GST.

The LOD was estimated from 60 replicate determinations of a low control sample per the CLSI EP17-A guideline. In this study, the LOD was found to be 0.21 ng/mL  $\alpha$ GST.

For the LOQ analyses, the prospectively defined goals for accuracy of  $\leq 20\%$  CV. In this study, a control sample precision shown to meet this criterion for CV, thus the LOQ was found to be 0.5 ng /mL  $\alpha$ GST.

## REFERENCES

1. Trull, A.K. *et al.* (1994). Serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase- A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 58 (12), 1345-1351.
2. Kobayashi, H. *et al.* (2000).  $\alpha$ -Glutathione-S-Transferase as a new sensitive marker of hepatocellular damage in biliary atresia. *Pediatr. Surg. Int.*, 16: 302-305.
3. Mulder, T. P.J. *et al.* (1999). Variability of Glutathione S-Transferase a in human liver and plasma. *Clinical Chemistry* 45 (3), 355-359.
4. Rees, G.W. *et al.* (1995). Evaluation of an enzyme-immunometric assay for serum  $\alpha$ -Gultathione S-Transferase. *Ann. Clin. Biochem.* 32, 575-583.
5. Hughes, V.F. *et al.* (1997). Randomized Trial to evaluate the clinical benefits of serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* 64 (10), 1446-1452.
6. Beckett, G.J. and Hayes, J.D. (1993). Glutathione S-Transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30, 281-389.
7. Platz K.P. *et al.* (1997). Determination of alpha- and Pi-Glutathione-S-Transferase will improve monitoring after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997 Nov; 29(7):2827-9.
8. Schroff, R.J. *et al.* Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45:879 – 885, 1985.
9. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved Standard – Sixth Edition: H3-A6: 27(26), 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
10. Procedures for the handling and processing of blood specimens; Approved guideline – Third Edition, H18-A3; 23 (38), 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technical Support  
(760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Germany





Für die quantitative Messung von Alpha-Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ GST) in menschlichem Serum und Plasma

### VERWENDUNGSZWECK

Der FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay ist ein paramagnetischer Partikel-Immunoassay für die quantitative *in-vitro* Bestimmung von  $\alpha$ GST in menschlichem Serum und Plasma. Die Messung von  $\alpha$ GST kann unterstützend zur Beurteilung von Leberschäden verwendet werden. Der FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay ist für die Verwendung mit dem FastPack® IP System bestimmt.

### ZUSAMMENFASSUNG

In der Leber befindet sich Alpha-Glutathion-S-Transferase in den Hepatozyten, während pi GST ( $\pi$ GST) auf die intrahepatischen Gallengangzellen beschränkt ist. Diese heterogene Verteilung der GST-Subklasse legt nahe, dass die Isoenzyme über einzigartige *in vivo*-Funktionen in verschiedenen Regionen der Leber verfügen und dass die Erfassung von GST-Subklassenspiegeln in biologischen Flüssigkeiten bei der Überwachung der Integrität spezifischer Leberregionen von signifikantem Nutzen wäre.

Derzeit wird die Schädigung der Leber durch die Messung von Leberenzymen wie Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) erforscht. Ein Nachteil dieser Marker ist, dass sie nicht einheitlich über die Leber verteilt werden, da die periportale Konzentration größer als die zentrilobuläre ist. Dagegen ist die Verteilung von  $\alpha$ GST in den zentrilobulären und periportalen Regionen gleich. Da die zentrilobulären Hepatozyten bei einer Reihe klinischer Krankheitsbilder, einschließlich Allotransplantatabstoßung, viraler Hepatitis, chronisch aktiver Hepatitis und Hepatotoxizität, sehr anfällig auf Schäden sind, wäre  $\alpha$ GST bei verschiedenen klinischen Krankheitsbildern ein sensiblerer Indikator für den Zustand der Leber. Daher kann die Quantifizierung von  $\alpha$ GST zur Erforschung des hepatozellulären Status von Individuen verwendet werden, die einem Risiko für Leberschäden ausgesetzt sind.<sup>1-7</sup>

### TESTPRINZIP

Der FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay ist ein Chemilumineszenz-Test, der auf dem „Sandwich“-Prinzip basiert.

- Primärinkubation: Antikörperlösung (Mischung aus einem biotinylierten monoklonalen  $\alpha$ GST-spezifischen Antikörper und einem monoklonalen mit alkalischer Phosphatase markierten  $\alpha$ GST-Antikörper) [100  $\mu$ l] reagiert mit  $\alpha$ GST aus der Patientenprobe, Kontrolle oder Kalibrator [100  $\mu$ l].
- Sekundärinkubation: Das Reaktionsgemisch wird mit Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln [150  $\mu$ l] versehen. Während der Inkubation wird der Sandwich-Komplex über die Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin an die Festphase gebunden.
- Beseitigung ungebundener Stoffe: Die paramagnetischen Partikel werden wiederholt mit Waschpuffer [0,2 ml/Wäsche] zur Beseitigung ungebundener Stoffe gewaschen.
- Substratzugabe und -erkennung: Dem an die Festphase gebundenen Komplex wird chemilumineszierendes Substrat [140  $\mu$ l] beigefügt und führt zu chemilumineszierendem „Licht“, das mittels des FastPack® IP Systems gemessen wird.
- Die Menge an gebundenem, markiertem Antikörper ist direkt proportional zur Konzentration an  $\alpha$ GST in der Probe.

### REAGENZIEN - Inhalt und Konzentration

Jeder FastPack® IP Karton enthält:

- 30 FastPack® IPs

Jeder FastPack® IP enthält:

- Paramagnetische Partikel, 150  $\mu$ l  
Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel in Puffer mit 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel.
- $\alpha$ GST Antikörperlösung, 100  $\mu$ l  
Antikörperlösung mit einer Mischung aus biotinyliertem Maus-monoklonalen Anti- $\alpha$ GST-Antikörper und einem zweiten Maus-monoklonalen mit alkalischer Phosphatase markierten Anti- $\alpha$ GST-Antikörper in Proteinmatrix mit ProClin® 150 als Konservierungsmittel.
- Waschpuffer, 2,0 ml  
Oberflächenaktive Substanzen mit Tris-Puffer.
- Substrat, 140  $\mu$ l  
ImmuGlow™ Plus: Indoxyl-3-Phosphat und Lucigenin in Puffer mit Konservierungsmittel.

Erforderliche, jedoch nicht gelieferte Materialien

- FastPack® IP System
- FastPack®  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048
- FastPack®  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049
- FastPack®  $\alpha$ GST Sample Diluent Kit - Cat. No. 25000050

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Ausschließlich für die *in vitro*-diagnostische Verwendung.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den betreffenden Arbeitsbereichen weder essen, trinken noch rauchen.
- Die Hände nach dem Arbeiten mit Proben gründlich waschen.
- HAMA-Interferenz: einige Individuen besitzen Antikörper gegen Mausprotein (HAMA), was bei Immunoassays, die von Mäusen stammende Antikörper einsetzen, zu Interferenzen führen kann<sup>9</sup>.
- FastPack<sup>®</sup> IP Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie den Anweisungen gemäß gelagert und gehandhabt werden. Die FastPack<sup>®</sup> IP Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Entsorgen Sie gebrauchte FastPacks in einen Behälter für biologisch gefährlichen Abfall.
- Die ProClin<sup>®</sup> enthaltenden Komponenten sind gemäß den geltenden Richtlinien der europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) klassifiziert als: Reizstoff (Xi). Im Folgenden sind entsprechende Risiko- (R) und Sicherheits- (S) Sätze hinsichtlich ProClin<sup>®</sup> aufgelistet:

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
R43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
S24/25	Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut und Augen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S60	Dieser Stoff und / oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen

## LAGERUNGSANWEISUNGEN

Bei 2 – 8 °C lagern.

## PROBENSAMMLUNG/-VORBEREITUNG

1. Für den FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST IP Immunoassay können Serum, EDTA oder Lithium-Heparin-Plasmaproben verwendet werden.
2. Das Clinical and Laboratory Standards Institute gibt zur Handhabung, Verarbeitung und Lagerung von Blut die folgenden Empfehlungen.<sup>9,10</sup>
  - A. Führen Sie alle Blutentnahmen unter Beachtung der routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion durch.
  - B. Für Plasmaproben:
    - Sammeln Sie die Proben in einem EDTA (mit dem lilafarbenen Deckel) oder heparinisierten (mit dem grünen Deckel) Röhrchen.
    - Mischen Sie den Inhalt der Röhrchen nach der Entnahme durch sanftes Schütteln.
    - Das Plasma muss innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme durch Zentrifugieren von den Zellen getrennt und bei 2 – 8 °C gelagert werden. Nehmen Sie das Plasma zur Lagerung aus dem Originalröhrchen.
    - Wenn die Probe nicht innerhalb von 24 Stunden getestet wird, muss sie bei mindestens -20 °C eingefroren werden.
  - C. Die Proben müssen frei von roten Blutkörperchen oder anderen partikelförmigen Stoffen sein, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.
  - D. Trübe oder partikelförmiges Material aufweisende Proben müssen vor Gebrauch zentrifugiert werden.
  - E. Stellen Sie sicher, dass die Proben frei von Blasen sind.

## DURCHFÜHRUNG DES TESTS

Genaue Anweisungen zur Durchführung der FastPack<sup>®</sup> IP Assays befinden sich im FastPack<sup>®</sup> IP System Bedienungshandbuch.

## GERÄTE

FastPack<sup>®</sup> IP System

## HINWEISE ZUR KALIBRIERUNG

Während des FastPack<sup>®</sup> IP Produktionsverfahrens erzeugt Qualigen eine Standardkurve und versieht den Barcode jedes FastPack<sup>®</sup> IP Etiketts mit dieser Information, die während der Testsequenz vom FastPack<sup>®</sup> IP System Analyzer gelesen werden kann. Der FastPack<sup>®</sup> IP System Analyzer muss vom Endnutzer so kalibriert werden, dass es ordnungsgemäß an die verwendete Charge von FastPacks angepasst ist. Für jeden Testtyp, d. h. gesamtes PSA, Testosteron oder  $\alpha$ GST, müssen separate Kalibrierungen durchgeführt werden. Die Häufigkeit der Kalibrierung variiert von Testtyp zu Testtyp. Für den FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Immunoassay muss der FastPack<sup>®</sup> IP System Analyzer alle 30 Tage oder immer wenn eine neue Charge  $\alpha$ GST FastPacks verwendet werden muss, kalibriert werden.

Immer wenn der Benutzer eine Kalibrierung für eine bestimmte Charge FastPacks durchführt oder eine neue Kalibratorcharge verwendet, müssen 2 FastPacks für die Kalibrierung analysiert werden (Doppelbestimmung). Wenn die Kalibrierung ausläuft (30 Tage nach der anfänglichen Kalibrierung) müssen 2 FastPacks zur Kalibrierung analysiert werden. Siehe hierzu "Kalibrierung" im FastPack<sup>®</sup> IP System Bedienungshandbuch.

Verwenden Sie das FastPack®  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048

## ERGEBNISSE

Der FastPack® IP System Analyzer verwendet die Informationen des Barcodes zum Aufbau einer Lookup-Tabelle aus x-y-Werten, welche die Standardkurve darstellen, und bestimmt die Konzentration unbekannter Proben durch lineare Interpolation.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollmaterialien sind äußerst wichtig für die Überwachung der Leistung der Assays. Die guten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices - GLP) umfassen die Verwendung von Kontrollproben, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Protokolle ordnungsgemäß funktionieren. Siehe hierzu "Kontrolltest" im FastPack® IP System Bedienungshandbuch. Es sollten mindestens zwei Levels des Qualitätskontrollmaterials verwendet werden. Die Benutzer müssen die entsprechenden nationalen, staatlichen und örtlichen Richtlinien hinsichtlich der Durchführung externer Qualitätskontrollen befolgen.

Verfügbare Kontrollen: FastPack®  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049

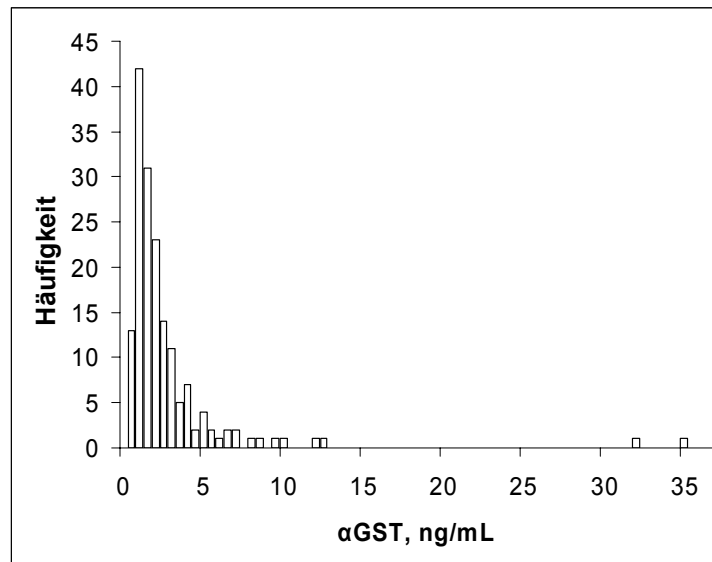
## GRENZEN DES VERFAHRENS

- Plasmaproben, die mittels EDTA oder Lithium-Heparin als Antikoagulans zu sammeln sind.
- Die Proben können innerhalb des messbaren Bereichs der Quantifizierungsgrenze (0,5 ng/ml) und des oberen Endes des Kalibrierungsbereichs von 200 ng/ml gemessen werden.
- Proben von >200 ng/ml müssen entweder berichtet oder nach Verdünnung erneut analysiert werden. Die Proben können mittels der  $\alpha$ GST-Probenverdünnung solange verdünnt werden, bis sich die Werte innerhalb des Assay-Bereichs befinden.
- Der FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay zeigt bis zu 5.000 ng/ml keinen Hook-Effekt.
- Proben von Patienten, die Präparate mit Maus-monoklonalen Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder erniedrigte Werte aufweisen, wenn sie mit Assay-Kits getestet werden, die Maus-monoklonale Antikörper einsetzen.
- Heterophile Antikörper in einer Probe haben das Potenzial, Interferenzen in Immunoassay-Systemen hervorzurufen. In seltenen Fällen können  $\alpha$ GST-Spiegel aufgrund in der Patientenprobe vorhandener heterophiler Antikörper oder aufgrund nicht spezifischer Proteinbindung erniedrigt erscheinen. Falls der  $\alpha$ GST-Spiegel nicht mit dem klinischen Nachweis übereinstimmt, wird die Durchführung zusätzlicher  $\alpha$ GST-Tests zur Bestätigung des Ergebnisses empfohlen.
- Für diagnostische Zwecke muss der FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay stets in Verbindung mit der Anamnese, der klinischen Untersuchung und anderen Befunden des Patienten bewertet werden.
- Die Leistung dieses Assays wurde nicht mit Proben von Neugeborenen bestätigt.

## ERWARTETE WERTE

Es wurden Proben von 167 Individuen gesammelt. Die Proben wurden offensichtlich gesunden Blutspendern ohne klinisch abnormale Anzeichen entnommen. Die  $\alpha$ GST-Spiegel wurden mit dem FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay in Verbindung mit dem FastPack® IP System bestimmt, um die  $\alpha$ GST-Konzentration bei der normalen Population zu ermitteln. Das Referenzintervall (5. bis 95. Perzentile) für den FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay beträgt 0,24 – 11,4 ng/ml. Die Referenzintervalle spiegeln die Spenderpopulation dieser Studiengruppe wider. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich bestimmen, der sich für seine Population eignet. Das folgende Säulendiagramm zeigt die Streuung der Werte.

Probentyp	Referenzgruppe	n	Medianalter (Jahre)	Altersbereich	Mittlere Konzentration (ng/ml)	95 % Referenzintervall (ng/ml)
Serum	Männer und Frauen	167	35	18 – 55	1,4	0,24 – 11,4



## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

### Präzision

Es wurden drei mit variierenden Mengen an  $\alpha$ GST versehene Serumpools unter Verwendung von drei Chargen FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST Reagenzien und vier FastPack<sup>®</sup> IP Instrumenten getestet. Jede Kontrolle wurde in Doppelbestimmung pro Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen getestet mit insgesamt 80 Wiederholungsbestimmungen pro Kontrolle. Die Daten wurden mittels der Varianzanalyse (ANOVA) analysiert und es wurden die Ungenauigkeit innerhalb des Assays und die gesamte Ungenauigkeit bestimmt. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient in Prozent (% CV) für jede Kontrolllösung berechnet.

#### Assay-Ungenauigkeit

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
<b>Mittelwert ng/ml <math>\alpha</math>GST</b>	7,3	37,6	180,5
<b>SD</b>	0,34	1,5	10,4
<b>% CV</b>	4,7	4,0	5,8

#### Gesamtungenauigkeit

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
<b>Mittelwert mIU/ml <math>\alpha</math>GST</b>	7,6	37,6	180,5
<b>SD</b>	0,80	3,0	25,4
<b>% CV</b>	11,1	7,9	14,1

### Linearitätsbereich.

Für  $\alpha$ GST, die mittels FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST getestet wurde, gemäß der CLSI EP-6A Evaluierung, erwies sich die Methode als linear von 1,3 bis 26,7 ng/ml, mit 5,0 ng/ml bis zu 66,8 ng/ml und 25,0 ng/ml im Intervall 66,8 und 267,4 ng/ml  $\alpha$ GST. Die Linearität wurde durch Verdünnung einer klinischen Humanserumprobe, die mit einer bekannten hoch endogenen  $\alpha$ GST-Konzentration versehen wurde, bestimmt. Die FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST ist über den Bereich von 0,5 ng/ml (LOQ) bis 200 ng/ml linear. (% Wiederfindung= [Gemessener Wert/Erwarteter Wert] X 100).

### Linearität nach Verdünnung

Aus einer mit einer hohen endogenen  $\alpha$ GST-Konzentration versehenen Serumprobe wurden Verdünnungen zwischen 90 % und 0,5 % mit der Serumprobe gewonnen und in Dreifachbestimmung mit einem FastPack<sup>®</sup>  $\alpha$ GST Reagenzcharge auf einem einzelnen FastPack<sup>®</sup> Instrument gemessen. Die gemessenen Werte der Verdünnungen wurden mit den erwarteten Werten (im selben Assay bestimmt) verglichen, basierend auf dem gemessenen Wert der unverdünnten Probe und der entsprechenden Verdünnung. (% Wiederfindung = [Gemessener Wert/Erwarteter Wert] X 100).

% Verdünnung	Erwartet $\alpha$ GST, ng/m	Gemessen $\alpha$ GST, ng/ml	% Wiederfindung
100,0 %	k.A.	267,4	k.A.
90,0 %	240,6	229,2	95,2
75,0 %	200,5	173,8	86,7
50,0 %	133,7	122,1	91,3
25,0 %	66,8	54,8	82,0
12,5 %	33,4	29,0	86,8
6,3 %	16,7	14,3	85,6
3,0 %	8,0	6,8	85,0
1,0 %	2,7	2,5	92,6
0,5 %	1,3	1,2	92,3

Zusätzlich wurden drei Serumproben mit hohen endogenen  $\alpha$ GST-Spiegeln mit einem  $\alpha$ GST-Sample Diluent, die eine Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und Tween 20 enthielt, verdünnt. Die gemessenen Werte der Verdünnungen wurden mit ihren erwarteten Werten verglichen.

Serum 1	Erwartet (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)	% Wiederfindung
Unverdünnt	k.A.	>200	k.A.
1:160	k.A.	68,5	k.A.
1:320	34,3	32,9	96,6
1:640	17,1	16,4	95,9
1:1280	8,6	7,9	91,9
1:2560	4,3	4,2	97,7

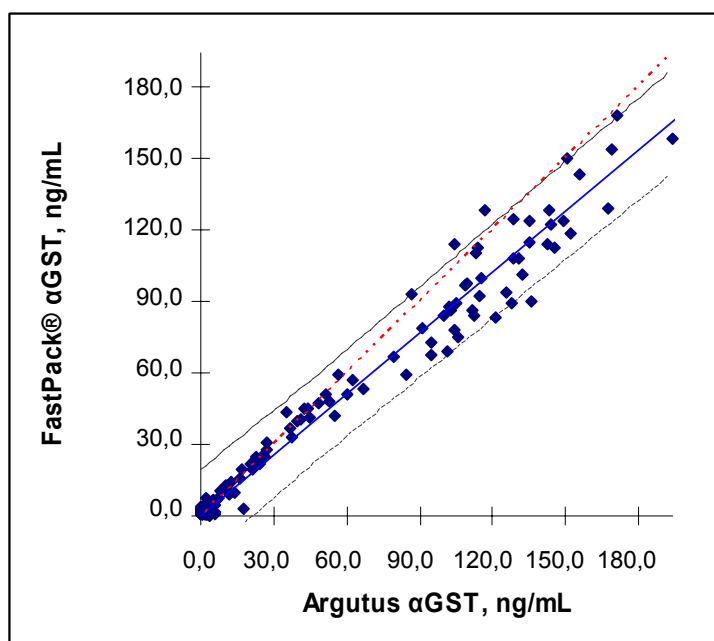
Serum 2	Erwartet (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)	% Wiederfindung
Unverdünnt	k.A.	>200	k.A.
1:320	k.A.	99,9	k.A.
1:640	50,0	52,0	104,0
1:1280	25,0	23,9	95,6
1:2560	12,5	12,2	97,6
1:5120	6,25	5,4	86,4

Serum 3	Erwartet (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)	% Wiederfindung
Unverdünnt	k.A.	>200	k.A.
1:20	k.A.	148,9	k.A.
1:40	74,4	70,7	95,0
1:80	37,2	35,8	96,2
1:160	18,6	18,2	87,8
1:320	9,3	9,1	97,8

## Methodenvergleich

Es wurden klinische Serumproben (n=141) verwendet, um die Werte, die mittels der FastPack® IP  $\alpha$ GST Methode bestimmt wurden, mit den Werten, die mittels der Argutus Medical HEPKIT® Alpha Methode bestimmt wurden, zu vergleichen. Die Werte wurden mittels der Deming-Regressionsanalyse mit dem zugehörigen Korrelationskoeffizienten evaluiert.

n	Beobachteter Bereich (ng/ml)	Schnittpunkt (ng/ml)	Steigung	r
141	0,0 – 193,9	1,7	0,85	0,986



## STÖRENDE SUBSTANZEN

Es wurde die Auswirkung ikterischer, lipämischer und hämolysierter Serumproben auf die mengenmäßige Bestimmung von  $\alpha$ GST untersucht, indem ein Serumpool mit einer  $\alpha$ GST-Konzentration von ~60,0 ng/ml mit bekannten Konzentrationen von Bilirubin, Triglyceriden und Hämoglobin, und ein anderer Serumpool mit einer endogenen  $\alpha$ GST-Konzentration von ~3,0 ng/ml mit denselben Konzentrationen der störenden Substanzen versetzt wurde. Die mit jeder störenden Substanz für die Serumpools erhaltenen Werte wurden mit den Werten verglichen, die für die Serumpools ohne die störende Substanz erhalten wurden und es wurde die Prozentabweichung oder die absolute Abweichung in ng/ml bestimmt. Diese Substanzen zeigten keine Interferenzen bei den angegebenen Werten.

	Störende Substanz		
	Bilirubin (30 mg/dl)	Lipämie (1000 mg/dl)	Hämoglobin (500 mg/dl)
Nicht versetzte Aliquote	3,8 ng/ml	3,0	3,9
Versetzte Aliquote	3,9 ng/ml	3,2	3,8
Absolute Abweichung, ng/ml	+0,1	+0,2	-0,1

	Störende Substanz		
	Bilirubin (30 mg/dl)	Lipämie (1000 mg/dl)	Hämoglobin (500 mg/dl)
Nicht versetzte Aliquote	66,5 ng/ml	57,7 ng/ml	58,7
Versetzte Aliquote	66,8 ng/ml	56,2 ng/ml	56,2
% Abweichung	+0,5 %	-2,6 %	-4,3 %

### **Kreuzreaktivität**

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktivität (<0,5 ng/ml) gemessen, als eine FastPack®  $\alpha$ GST-Probe mit den folgenden kreuzreaktiven Substanzen versetzt wurde: m $\mu$  GST, mit 250 ng/ml und pi GST mit 2000 ng/ml.

### **Nullgrenze (Limit of Blank (LOB)), Detektionsgrenze (Limit of Detection (LOD)) und Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation (LOQ))**

Die Nullgrenze (LOB, die höchste Messung, die wahrscheinlich noch als Nullprobe beobachtet wird), die Detektionsgrenze (LOD, die niedrigste Menge des Analyts in einer Probe, die erkannt werden kann bei auf 5 % gesetzten Typ I und Typ II Fehlerraten) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ, die niedrigste Menge des Analyts in einer Probe, die zuverlässig nachgewiesen werden kann, und bei der der Gesamtfehler der vorbestimmten Anforderung an die Genauigkeit entspricht) wurden gemäß CLSI EP17-A für den FastPack® IP  $\alpha$ GST Assay bestimmt. In dieser Studie wurde die Nullgrenze durch 20 Wiederholungsbestimmungen der FastPack®  $\alpha$ GST-Probe auf jedem der drei FastPack® IP Instrumente bestimmt. Die roh gemessenen RLUs der Assays wurden mittels Kalibrierungskurve jedes Assays in ng/ml konvertiert. Der LOB erwies sich als der höchste gemessene Wert. Dieser Wert betrug 0,12 ng/ml  $\alpha$ GST.

Der LOD wurde durch 60 Wiederholungsbestimmungen einer Low-Kontrollprobe gemäß der CLSI EP17-A Richtlinie bestimmt. In dieser Studie ergab der LOD einen Wert von 0,21 ng/ml  $\alpha$ GST.

Für die LOQ Analyse ergaben die vorbestimmten Genauigkeitsziele  $\leq 20$  % CV. In dieser Studie erfüllte eine Kontrollprobe dieses Kriterium für CV, und somit ergab der LOQ einen Wert von 0,5 ng/ml  $\alpha$ GST.

## REFERENZEN

1. Trull, A.K. *et al.* (1994). Serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase- A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 58 (12), 1345-1351.
2. Kobayashi, H. *et al.* (2000).  $\alpha$ -Glutathione-S-Transferase as a new sensitive marker of hepatocellular damage in biliary atresia. *Pediatr. Surg. Int.*, 16: 302-305.
3. Mulder, T. P.J. *et al.* (1999). Variability of Glutathione S-Transferase a in human liver and plasma. *Clinical Chemistry* 45 (3), 355–359.
4. Rees, G.W. *et al.* (1995). Evaluation of an enzyme-immunometric assay for serum  $\alpha$ -Gultathione S-Transferase. *Ann. Clin. Biochem.* 32, 575-583.
5. Hughes, V.F. *et al.* (1997). Randomized Trial to evaluate the clinical benefits of serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* 64 (10), 1446-1452.
6. Beckett, G.J. and Hayes, J.D. (1993). Glutathione S-Transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30, 281–389.
7. Platz K.P. *et al.* (1997). Determination of alpha- and Pi-Glutathione-S-Transferase will improve monitoring after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997 Nov; 29(7):2827-9.
8. Schroff, R.J. *et al.* Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45:879 – 885, 1985.
9. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved Standard – Sixth Edition: H3-A6: 27(26), 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
10. Procedures for the handling and processing of blood specimens; Approved guideline – Third Edition, H18-A3; 23 (38), 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technischer Kundendienst  
+1 (760) 918-9165  
+1 (877) 709-2169



MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Deutschland





Pour la mesure quantitative d'alpha glutathione s-transferase ( $\alpha$ GST) dans le sérum et le plasma humains

### APPLICATION

Le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay est un immunoessai à particules paramagnétiques pour la détermination quantitative *in-vitro* de  $\alpha$ GST dans le sérum et le plasma humains. La mesure de  $\alpha$ GST peut être utilisée comme une aide dans l'évaluation de lésions hépatiques. Le FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay est conçu pour être utilisé avec le FastPack® IP System.

### RÉSUMÉ

Dans le foie, l'alpha glutathione s-transferase se situe dans les hépatocytes, tandis que pi GST ( $\pi$ GST) se trouve dans les cellules intrahépatiques de la voie biliaire principale. Cette répartition hétérogène de la sous-classe GST suggère que les isoenzymes ont des fonctions *in vivo* uniques dans différentes régions hépatiques et que la détection de niveaux de sous-classe GST dans les fluides biologiques aurait une importance significative pour le monitoring de l'intégrité de régions hépatiques spécifiques.

À l'heure actuelle, les lésions hépatiques sont étudiées par la mesure des enzymes hépatiques, comme l'alanine aminotransferase (ALT) et l'aspartate aminotransferase (AST). Un des désavantages de ces marqueurs tient au fait qu'ils ne sont pas répartis uniformément dans le foie, la concentration périportale étant supérieure à la centrilobulaire. En revanche, il a été déterminé que  $\alpha$ GST a une répartition homogène dans les régions centrilobulaire et périportale. Étant donné que les hépatocytes centrilobulaires sont très susceptibles aux lésions dans diverses conditions cliniques (notamment en cas de rejet d'allogreffe, d'hépatite virale, d'hépatite active chronique et d'hépatotoxicité),  $\alpha$ GST serait un indicateur plus sensible de l'état hépatique dans ces situations cliniques, ainsi que dans d'autres. Dès lors, la quantification de  $\alpha$ GST peut être utilisée pour étudier l'état hépato-cellulaire des personnes à risque de lésions hépatiques.<sup>1-7</sup>

### PRINCIPE DU TEST

Le FastPack®  $\alpha$ GST IP est un dosage de chimioluminescence basé sur le principe « sandwich ».

- Incubation primaire : la solution d'anticorps (mélange d'un anticorps spécifique  $\alpha$ GST monoclonal biotinylé et d'un anticorps  $\alpha$ GST monoclonal marqué avec de la phosphatase alcaline) [100  $\mu$ l] réagit avec le  $\alpha$ GST de l'échantillon, le contrôle ou l'étalonneur du patient [100  $\mu$ l].
- Incubation secondaire : les particules paramagnétiques revêtues de streptavidine [150  $\mu$ l] sont combinées avec le mélange réactif. Durant cette incubation, le complexe « sandwich » est lié à la phase solide via l'interaction de la biotine et de la streptavidine.
- Élimination des produits non liés : les particules paramagnétiques sont nettoyées à plusieurs reprises avec un tampon de lavage. [0,2 ml/lavage] pour éliminer les produits non liés.
- Addition du substrat et détection : un substrat chimioluminogénique [140  $\mu$ l] est ajouté au complexe lié à la phase solide, et résulte en chimioluminescence mesurée à l'aide du FastPack® IP System.
- La quantité d'anticorps marqués liés est directement proportionnelle à la concentration de  $\alpha$ GST dans l'échantillon.

### RÉACTIFS – Contenu et concentration

Chaque carton de FastPack® IP contient :

- 30 FastPack® IP

Chaque FastPack® IP contient :

- Particules paramagnétiques, 150  $\mu$ l  
Particules paramagnétiques revêtues de streptavidine en solution tampon contenant 0,1% de ProClin® 300 en tant qu'agent de conservation.
- Solution d'anticorps  $\alpha$ GST, 100  $\mu$ l  
Solution d'anticorps contenant un mélange d'un anticorps anti- $\alpha$ GST monoclonal d'origine murine biotinylé et d'un deuxième anticorps anti- $\alpha$ GST monoclonal d'origine murine marqué avec de la phosphatase alcaline dans une matrice de protéines contenant du ProClin® 150 en tant qu'agent de conservation.
- Tampon de lavage, 2,0 ml  
Tampon Tris contenant des surfactants.
- Substrat, 140  $\mu$ l  
ImmuGlow™ Plus : indoxyle-3-phosphate et lucigénine en solution tampon contenant des agents de conservation.

Produits nécessaires mais non fournis

- FastPack® IP System
- FastPack®  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048
- FastPack®  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049

- FastPack®  $\alpha$ GST Sample Diluent Kit – Cat. No. 25000050

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour une utilisation de diagnostic *in vitro* uniquement.
- Ne pas aspirer à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées.
- Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons.
- Interférence HAMA : certaines personnes ont des anticorps réagissant avec les protéines murines (HAMA), ce qui peut causer une interférence dans les dosages immunologiques utilisant des anticorps dérivés des souris<sup>8</sup>.
- Les réactifs FastPack® IP sont stables jusqu'à la date d'expiration sur l'étiquette quand ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les réactifs FastPack® IP après la date d'expiration.
- Jeter les FastPacks usagés dans un récipient pour produits biologiques dangereux.
- Les composants contenant du ProClin® sont classés par les directives européennes applicables de la manière suivante : Irritant (Xi). Les identifications suivantes (risque, R, et sécurité, S) s'appliquent au ProClin® :

R36/38	Irritant pour les yeux et la peau
R43	Peut provoquer une sensibilisation en cas de contact cutané
S24/25	Éviter tout contact avec la peau et les yeux
S36/37	Porter un vêtement de protection et des gants
S60	Ce matériel et / ou son récipient doivent être éliminés comme des déchets dangereux

## CONSIGNES DE CONSERVATION

Stocker entre 2 et 8 °C.

## PRÉLÈVEMENT/PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

1. Des échantillons de sérum, d'EDTA ou de plasma à l'héparine de lithium peuvent être utilisés pour le FastPack®  $\alpha$ GST IP Immunoassay.
2. Le Clinical and Laboratory Standards Institute fournit les recommandations suivantes pour la manipulation, le traitement et la conservation du sang.<sup>9,10</sup>
  - A. Prélever tous les échantillons de sang en observant les précautions habituelles en rapport avec la ponction veineuse.
  - B. Pour les échantillons de plasma :
    - Prélever les échantillons dans un tube EDTA (capuchon lavande) ou hépariné (capuchon vert).
    - Mélanger le tube immédiatement après le prélèvement en le retournant doucement plusieurs fois.
    - Le plasma doit être séparé des cellules par centrifugation dans les 3 heures après le prélèvement et stocké entre 2 et 8 °C. Transférer le plasma depuis le tube d'origine pour la conservation.
    - Un échantillon non testé dans les 24 heures doit être congelé à une température de –20 °C ou inférieure.
  - C. Afin d'obtenir des résultats optimaux, les échantillons ne doivent pas contenir de globules rouges ni de particules.
  - D. Les échantillons troubles ou contenant des particules doivent être centrifugés avant leur utilisation.
  - E. Veiller à ce que les échantillons soient exempts de bulles d'air.

## PROCÉDURE DE DOSAGE

Pour tout renseignement sur le fonctionnement du FastPack® IP, consulter le manuel de procédures du FastPack® IP System.

## INSTRUMENTATION

FastPack® IP System

## DÉTAILS DE L'ÉTALONNAGE

Au cours du processus de fabrication des FastPack® IP, Qualigen génère une courbe de référence puis transfère les informations correspondantes sur le code barre de chaque étiquette FastPack® IP, où elles sont lues par le FastPack® IP System analyzer pendant la séquence de test. Le FastPack® IP System analyzer doit être étalonné par l'utilisateur pour assurer qu'il est correctement réglé pour le lot particulier de FastPacks utilisé. Des étalonnages séparés doivent être effectués pour chaque type de dosage (PSA total, testostérone ou  $\alpha$ GST). La fréquence d'étalonnage varie selon le type de dosage. Pour le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay, le FastPack® IP System analyzer doit être étalonné tous les 30 jours ou à chaque fois qu'un nouveau lot de  $\alpha$ GST FastPacks est utilisé.

Lors de l'étalonnage pour un lot de FastPacks particulier ou de l'utilisation d'un nouveau lot d'étalonneurs, 2 FastPacks sont requis pour l'étalonnage (doubles). Au moment de l'expiration de l'étalonnage (30 jours après l'étalonnage initial), 2 FastPacks sont nécessaires pour l'étalonnage. Voir le manuel de procédures du FastPack® IP System pour connaître la marche à suivre pour l'étalonnage.

Utiliser le FastPack®  $\alpha$ GST Calibrator Kit – Cat. No. 25000048

## RÉSULTATS

Le FastPack® IP System analyzer utilise les informations contenues dans le code à barres pour établir une table de consultation des valeurs de x et y représentant la courbe de référence et estime les concentrations d'échantillons inconnus par interpolation linéaire.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Les produits de contrôle de la qualité sont essentiels pour surveiller la performance des dosages du système. Les bonnes pratiques de travail en laboratoire (GLP) comprennent l'utilisation d'échantillons de contrôle pour assurer que tous les réactifs et protocoles se comportent correctement. Voir le manuel de procédures du système du FastPack® IP System pour connaître la marche à suivre pour les tests de contrôle. Utiliser au moins deux niveaux de produits de contrôle de la qualité. Respecter les recommandations applicables pour l'exécution de produits contrôle externe de la qualité.

Contrôles disponibles : FastPack®  $\alpha$ GST Control Kit – Cat. No. 25000049

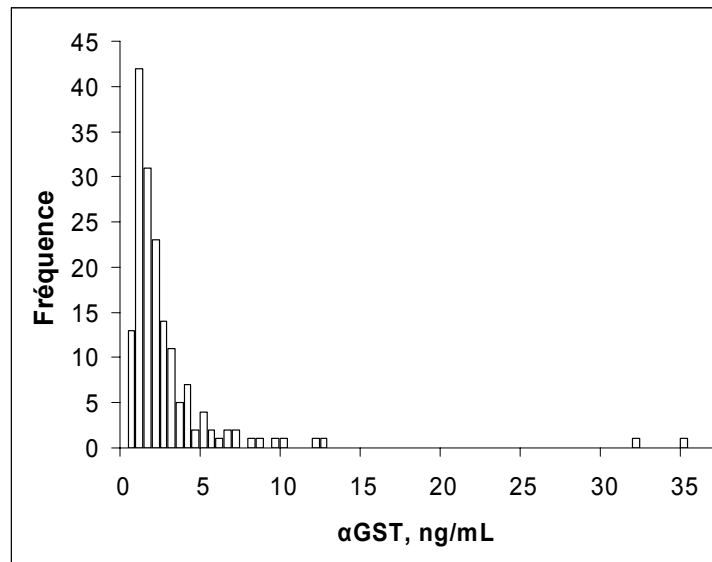
## LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Échantillons des plasma à prélever en utilisant de l'EDTA ou de l'héparine de lithium comme anticoagulant.
- Les échantillons peuvent être mesurés dans la plage de la limite de quantification (0,5 ng/ml) et jusqu'à la partie supérieure de la plage d'étalonnage, 200 ng/ml.
- Les échantillons >200 ng/ml doivent être signalés ou retestés après dilution. Les échantillons peuvent être dilués en utilisant le tampon pour échantillon  $\alpha$ GST jusqu'à ce que les valeurs se trouvent dans la plage du dosage.
- Le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay ne montre pas d'effet crochet de dose élevée avant 5 000 ng/ml.
- Les échantillons provenant de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux d'origine murine à des fins de diagnostic ou de traitement peuvent contenir des anticorps anti-souris humains (HAMA). Ils peuvent indiquer des valeurs faussement élevées ou faussement basses lorsqu'ils sont testés avec des kits de dosage utilisant des anticorps monoclonaux d'origine murine.
- Les anticorps hétérophiles d'un échantillon peuvent causer des interférences dans les systèmes de dosages immunologiques. Il arrive parfois que les niveaux de  $\alpha$ GST paraissent diminués à cause d'anticorps hétérophiles présents dans l'échantillon du patient ou à cause d'une liaison non spécifique à des protéines. Si le niveau de  $\alpha$ GST est en contradiction avec les constatations cliniques, il est conseillé d'effectuer d'autres tests de  $\alpha$ GST pour confirmer le résultat.
- À des fins de diagnostic, le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay doit toujours être évalué en conjonction avec les antécédents médicaux du patient, les examens cliniques et les autres résultats.
- La performance de ce dosage n'a pas été établie avec des échantillons néonataux.

## VALEURS ATTENDUES

Des échantillons ont été prélevés chez 167 personnes. Les échantillons provenaient de donneurs de sang sains, sans indication d'anomalies cliniques. Les niveaux de  $\alpha$ GST ont été déterminés en utilisant le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay en conjonction avec le FastPack® IP System afin d'établir la concentration de  $\alpha$ GST dans la population normale. L'intervalle de référence (du 5ème au 95ème centiles) pour le FastPack® IP  $\alpha$ GST Immunoassay est 0,24 – 11,4 ng/ml. Les intervalles de référence reflètent la population de donneurs de ce groupe d'étude. Chaque laboratoire doit déterminer sa propre plage de référence en fonction de la population. La répartition des valeurs est indiquée dans l'histogramme ci-dessous.

Type d'échantillon	Groupe de référence	n	Âge moyen (années)	Tranche d'âge	Concentration moyenne (ng/ml)	Intervalle de référence 95% (ng/ml)
Sérum	Hommes et femmes	167	35	18 - 55	1,4	0,24-11,4



## CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

### Précision

Trois pools de sérum de contrôle ayant reçu diverses quantités de  $\alpha$ GST ont été dosés en utilisant trois lots de réactifs FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST et quatre instruments FastPack<sup>®</sup> IP. Chaque contrôle a été testé en doubles déterminations, quotidiennement, pendant 10 jours, pour un total de 80 déterminations répliquées par contrôle. Les données ont été analysées en utilisant la technique de l'analyse de variance (ANOVA) et l'imprécision dans le dosage et l'imprécision totale ont été déterminées. L'écart standard moyen (SD) et le coefficient en pourcentage de l'écart (%CV) ont été calculés pour chaque solution de contrôle.

#### Imprécision dans le dosage

	Control 1	Control 2	Control 3
$\alpha$ GST moyen, ng/ml	7,3	37,6	180,5
SD	0,34	1,5	10,4
%CV	4,7	4,0	5,8

#### Imprécision totale

	Control 1	Control 2	Control 3
$\alpha$ GST moyen, mIU/ml	7,6	37,6	180,5
SD	0,80	3,0	25,4
%CV	11,1	7,9	14,1

### Plage de linéarité.

Pour le  $\alpha$ GST testé par FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST, basé sur l'évaluation CLSI EP-6A, il a été démontré que la méthode est linéaire de 1,3 à 26,7 ng/mL, avec de 5,0 ng/ml jusqu'à 66,8 ng/ml, et 25,0 ng/ml dans l'intervalle 66,8 et 267,4 ng/ml  $\alpha$ GST. La linéarité déterminée par la dilution d'un échantillon clinique de sérum humain enrichi avec une concentration élevée de  $\alpha$ GST endogène. Le FastPack<sup>®</sup> IP  $\alpha$ GST est linéaire sur une plage de 0,5 ng/mL (LOQ) à 200 ng/ml. (% de récupération = [valeur mesurée/valeur attendue] X 100).

### Linéarité avec dilution

Un échantillon de sérum enrichi d'une concentration élevée de  $\alpha$ GST endogène a été dilué de 90% à 0,5% avec un échantillon de sérum et quantifié en tri-déterminations avec un lot réactif FastPack®  $\alpha$ GST sur un seul instrument FastPack®. Valeurs mesurées des dilutions comparées à leurs valeurs attendues (déterminées dans le même dosage), sur la base de la valeur mesurée de l'échantillon non dilué et de la dilution respective. (% de récupération = [valeur mesurée/valeur attendue] X 100).

% dilution	$\alpha$ GST attendu, ng/mL	$\alpha$ GST mesuré, ng/mL	% de récupération
100,0%	N/AN/A	267,4	N/AN/A
90,0%	240,6	229,2	95,2
75,0%	200,5	173,8	86,7
50,0%	133,7	122,1	91,3
25,0%	66,8	54,8	82,0
12,5%	33,4	29,0	86,8
6,3%	16,7	14,3	85,6
3,0%	8,0	6,8	85,0
1,0%	2,7	2,5	92,6
0,5%	1,3	1,2	92,3

En outre, trois échantillons de sérum avec des niveaux élevés de  $\alpha$ GST endogènes ont été dilués avec le  $\alpha$ GST Sample Diluent contenant une solution saline tamponnée au phosphate et du Tween 20. Les valeurs mesurées des dilutions ont été comparées avec leurs valeurs attendues.

Sérum 1	Attendue (ng/ml)	Mesurée (ng/ml)	% de récupération
Non dilué	N/AN/A	>200	N/AN/A
1:160	N/AN/A	68,5	N/AN/A
1:320	34,3	32,9	96,6
1:640	17,1	16,4	95,9
1:1280	8,6	7,9	91,9
1:2560	4,3	4,2	97,7

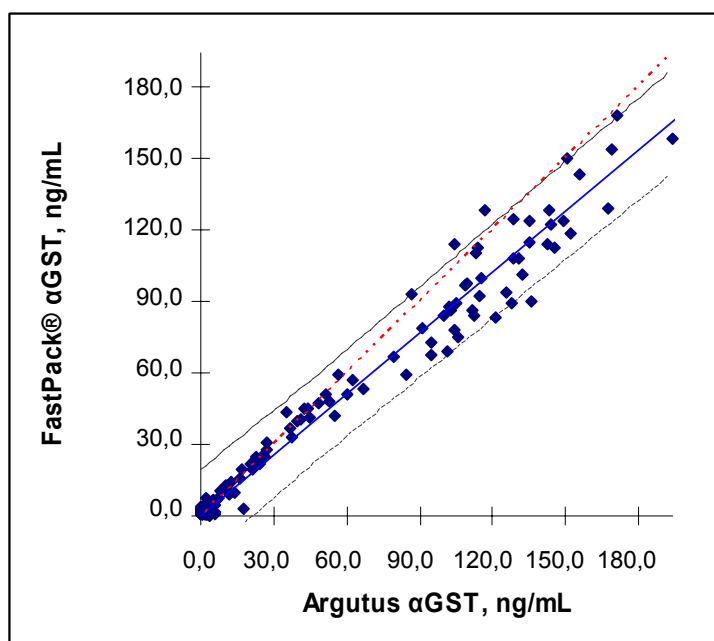
Sérum 2	Attendue (ng/ml)	Mesurée (ng/ml)	% de récupération
Non dilué	N/AN/A	>200	N/AN/A
1:320	N/AN/A	99,9	N/AN/A
1:640	50,0	52,0	104,0
1:1280	25,0	23,9	95,6
1:2560	12,5	12,2	97,6
1:5120	6,25	5,4	86,4

Sérum 3	Attendue (ng/ml)	Mesurée (ng/ml)	% de récupération
Non dilué	N/AN/A	>200	N/AN/A
1:20	N/AN/A	148,9	N/AN/A
1:40	74,4	70,7	95,0
1:80	37,2	35,8	96,2
1:160	18,6	18,2	87,8
1:320	9,3	9,1	97,8

### Comparaison des méthodes

Des échantillons cliniques de sérum (n=141) ont été utilisés pour comparer les valeurs obtenues en utilisant la méthode FastPack® IP  $\alpha$ GST et les valeurs obtenues en utilisant la méthode Argutus Medical HEPKIT® Alpha. La concordance des valeurs a été calculée en utilisant l'analyse de régression de Deming, avec le coefficient de corrélation associé.

n	Plage d'observation (ng/ml)	Intersection (ng/ml)	Pente	r
141	0,0 – 193,9	1,7	0,85	0,986



### SUBSTANCES INTERFÉRANTES

L'effet d'échantillons de sérum icterique, lipémique et hémolysé sur la quantification de  $\alpha$ GST a été étudié en enrichissant un pool de sérum d'une concentration de  $\alpha$ GST de ~60,0 ng/ml avec des concentrations connues de bilirubine, de triglycérides et d'hémoglobine, et un autre pool de sérum avec une concentration de  $\alpha$ GST endogène de ~3,0 ng/ml, avec les mêmes concentrations de substances interférantes. Les valeurs obtenues pour les pools de sérum avec chaque substance interférante ont été comparées aux valeurs obtenues pour les pools de sérum sans la substance interférante et la pondération partielle ou absolue dans la valeur ng/ml déterminée. Ces composés n'ont pas présenté d'interférence avec les niveaux indiqués.

	Substance interférante		
	Bilirubine (30 mg/dl)	Lipémie (1000 mg/dl)	Hémoglobine (500 mg/dl)
Aliquote non enrichie	3,8 ng/ml	3,0	3,9
Aliquote enrichie	3,9 ng/ml	3,2	3,8
Pondération absolue, ng/ml	+0,1	+0,2	-0,1

	Substance interférante		
	Bilirubine (30 mg/dl)	Lipémie (1000 mg/dl)	Hémoglobine (500 mg/dl)
Aliquote non enrichie	66,5 ng/ml	57,7 ng/ml	58,7
Aliquote enrichie	66,8 ng/ml	56,2 ng/ml	56,2
% de pondération	+0,5%	- 2,6%	- 4,3%

### **Réactivité croisée**

Aucune réactivité croisée significative (<0,5 ng/ml) n'a été obtenue lorsqu'un échantillon FastPack®  $\alpha$ GST a été enrichi avec les réactifs croisés suivants :  $\mu$  GST, à 250 ng/ml, et  $\pi$  GST à 2000 ng/ml.

### **Limite de blanc (LOB), Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)**

La limite de blanc (LOB, mesure la plus haute supposée être observée pour un échantillon à blanc), limite de détection (LOD, quantité la plus basse d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée avec des taux d'erreur de type I et II réglés à 5%), et la limite de quantification (LOQ, quantité la plus basse d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée de manière fiable et à laquelle l'erreur totale répond à l'exigence de précision prédéfinie) ont été déterminées conformément à CLSI EP17-A pour le dosage FastPack® IP  $\alpha$ GST. Dans cette étude, la limite de blanc a été déterminée à partir de 20 déterminations répliquées de l'échantillon FastPack®  $\alpha$ GST sur chacun des trois instruments FastPack® IP différents. Les RLU bruts des dosages ont été convertis en ng/ml correspondants sur la base de la courbe d'étalonnage pour chaque dosage. La LOB a été déterminée comme la valeur maximale observée. Cette valeur était de 0,12 ng/ml  $\alpha$ GST.

La LOD a été déterminée à partir de 60 déterminations répliquées d'un échantillon à bas contrôle, conformément à la recommandation CLSI EP17-A. Dans cette étude, la LOD était de 0,21 ng/ml  $\alpha$ GST.

Pour les analyses LOQ, les objectifs définis de manière prospective pour la précision étaient de  $\leq 20\%$  CV. Dans cette étude, il a été trouvé qu'une précision d'échantillon de contrôle répondait au critère de CV, donc la LOQ se trouvait à 0,5 ng/ml  $\alpha$ GST.

## RÉFÉRENCES

1. Trull, A.K. *et al.* (1994). Serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase- A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 58 (12), 1345-1351.
2. Kobayashi, H. *et al.* (2000).  $\alpha$ -Glutathione-S-Transferase as a new sensitive marker of hepatocellular damage in biliary atresia. *Pediatr. Surg. Int.*, 16: 302-305.
3. Mulder, T. P.J. *et al.* (1999). Variability of Glutathione S-Transferase a in human liver and plasma. *Clinical Chemistry* 45 (3), 355-359.
4. Rees, G.W. *et al.* (1995). Evaluation of an enzyme-immunometric assay for serum  $\alpha$ -Gultathione S-Transferase. *Ann. Clin. Biochem.* 32, 575-583.
5. Hughes, V.F. *et al.* (1997). Randomized Trial to evaluate the clinical benefits of serum  $\alpha$ -Glutathione S-Transferase concentration monitoring after liver transplantation. *Transplantation* 64 (10), 1446-1452.
6. Beckett, G.J. and Hayes, J.D. (1993). Glutathione S-Transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 30, 281-389.
7. Platz K.P. *et al.* (1997). Determination of alpha- and Pi-Glutathione-S-Transferase will improve monitoring after liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997 Nov; 29(7):2827-9.
8. Schroff, R.J. *et al.* Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45:879 – 885, 1985.
9. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved Standard – Sixth Edition: H3-A6: 27(26), 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
10. Procedures for the handling and processing of blood specimens; Approved guideline – Third Edition, H18-A3; 23 (38), 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 États-Unis  
Assistance technique  
+1 (760) 918-9165  
+1 (877) 709-2169



MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Allemagne

