

NGAL Rapid ELISA Kit

EN

DE

FR

IT

ES

DA

SE

KIT 037



BIOPORTO[®]
Diagnostics



Revision: NR2010-05-EN**Please read these instructions carefully****INTENDED USE**

For the *in vitro* determination of human NGAL in urine, plasma or serum as a marker of acute kidney injury which may lead to acute renal failure.

INTRODUCTION

NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) was first discovered in 1989¹ and, as its name implies, belongs to the lipocalin family of proteins. These are typically small secreted proteins characterized by their ability to bind hydrophobic molecules in a structurally conserved pocket formed by β -pleated sheet, to bind to specific cell-surface receptors, and to form macromolecular complexes. NGAL was fully characterized and named in 1993², but has many synonyms: NL (neutrophil lipocalin; HNL: human NL)³, lipocalin 2, oncogene protein 24p3⁴ or uterocalin⁵ (in the mouse) and *neu*-related lipocalin⁶ or 25-kDa α_2 -microglobulin-related protein⁷ (in the rat). Human NGAL consists of a single disulfide-bridged polypeptide chain of 178 amino-acid residues with a calculated molecular mass of 22 kDa², but glycosylation increases its apparent molecular mass to 25 kDa. In neutrophils (neutrophilic polymorphonuclear leukocytes) it occurs as monomeric and dimeric forms, with a small percentage of trimer, and it also occurs in complex with 92-kDa human neutrophil type IV collagenase (gelatinase B or matrix metalloproteinase-9, MMP-9)⁸.

NGAL was originally isolated from the supernatant of activated human neutrophils¹, but it is also expressed at a low level in other human tissues including the kidney, prostate and epithelia of the respiratory and alimentary tracts^{9,10}. It is strongly expressed in adenomas and inflamed epithelia of the bowel¹¹, adenocarcinomas of the breast¹², and urothelial carcinomas¹³.

Because of its small molecular size and resistance to degradation, NGAL is readily excreted and detected in the urine, both in its free form and in complex with MMP-9. Urinary levels correlate with plasma levels whatever the cause of increased NGAL

production¹⁴, but particularly high urinary levels can be expected when NGAL is released directly into the urine by the kidney tubules or urothelial carcinomas. It is uncertain how far NGAL/MMP-9 complexes from sources remote from the urinary tract are excreted as such into the urine or reform in the urine after independent excretion of NGAL and MMP-9⁸.

While the functions of NGAL are not fully understood, NGAL appears to be upregulated in cells under "stress", e.g. from infection, inflammation or neoplastic transformation, or in tissues undergoing involution, such as the postpartum mouse uterus and mammary glands on weaning⁵. In relation to a possible antibacterial role, it binds enterobactin and other siderophores, depriving the microorganisms of Fe³⁺, an important nutritional requirement¹⁵. Its complex formation with MMP-9 appears to protect MMP-9 enzymatic activity from degradation⁸. The upregulation of NGAL in involuting tissues has led to the postulation of a role in apoptosis, but it appears more likely that NGAL is associated with a survival response⁶.

NGAL and the kidney. As early as 1989, NGAL (24p3) was found to be expressed by mouse kidney cells and to undergo an early, dramatic upregulation (14- to 20-fold) in response to SV40 viral infection¹⁷. A similar early and dramatic upregulation was later observed in other types of kidney injury, and raised plasma levels of NGAL were found to be strongly correlated with decreased renal function in patients with renal damage due to systemic vasculitis¹⁸. Urinary NGAL levels serve as an early marker of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass surgery^{19,20}, and both urinary and plasma levels of NGAL provide an early indication of acute renal injury in unselected patients in intensive care²¹. Raised urinary and plasma NGAL levels have also been observed in patients with chronic kidney diseases²², and patients with functioning renal grafts also showed raised urinary levels (detectable by Western blotting)¹³. It is therefore apparent that a large variety of renal disorders are associated with raised plasma and urinary levels of NGAL. While plasma and urinary NGAL levels are closely correlated in acute conditions, it is to be expected

that urinary NGAL levels will be particularly high after kidney injury severe enough to result in acute renal failure, acute tubular necrosis or acute tubulointerstitial nephropathy. However, the use of NGAL as a marker for renal disorders is subject to the proviso that other concurrent conditions that are independently associated with raised NGAL levels must be taken into account.

NGAL in inflammation or infection. NGAL is released from the specific granules of activated neutrophils^{1,2} and serum levels rise in inflammatory or infective conditions, especially in bacterial infections²³. Serum NGAL has thus been proposed as a marker of bacterial infection. However, as levels of NGAL may also be raised in neoplastic conditions and renal disorders independently of any infective process, this proposed application should be treated with caution. NGAL may also be raised in infections in patients with an uncountably low number of neutrophils due to leukemia or treated leukemia, showing that the source of the raised NGAL in infections is not only the neutrophils.

NGAL and neoplasia. The various types of cancer in which NGAL may be upregulated (often with MMP-9) have been referred to above. This has been shown by its expression in tumor cells and its raised urinary levels, both in the free form and in complex with MMP-9⁸. Indeed, it has been proposed that urinary NGAL/MMP-9 complexes may serve as a marker of disease status for breast cancer patients²⁴. Plasma levels have not usually been measured in these cases.

PRINCIPLE OF THE ASSAY PROCEDURE

The assay is an ELISA performed in microwells coated with a monoclonal antibody against human NGAL. Bound NGAL is detected with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated monoclonal antibody and the assay is developed by incubation with a color-forming substrate. The assay is a rapid 2-step procedure:

Step 1. Aliquots of calibrators, diluted samples and any controls are incubated with HRP-conjugated detection antibody in the coated microwells. Only NGAL will bind to both coat and detection antibody, while unbound materials are removed by washing.

Step 2. A chromogenic peroxidase substrate containing tetramethylbenzidine (TMB) is added to each test well. The HRP linked to the bound detection antibody reacts with the substrate to generate a colored product. The enzymatic reaction is stopped chemically, and the color intensity is read at 450 nm in an ELISA reader. The color intensity (absorbance) is a function of the concentration of NGAL originally added to each well. The results for the calibrators are used to construct a calibration curve from which the concentrations of NGAL in the test specimens are read.

KIT COMPONENTS

Item	Contents	Quantity
①	12 x 8 coated Microwells + Frame	96 wells
②	5x Sample Diluent Conc.	1 x 60 mL
③-⑤	NGAL Rapid Calibrator 1-6 0, 0.2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	25x Wash Solution Conc.	1 x 30 mL
⑥	HRP-conjugated NGAL Antibody	1 x 6 mL
⑦	TMB Substrate	1 x 12 mL
⑧	Stop Solution	1 x 16 mL
⑨	Polypropylene U-Microwell Plate	96 wells

Note: Liquid reagents contain the preservatives thimerosal or Bronidox L. These may be harmful if ingested.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Adjustable micropipettes covering the range 1-1000 μ L and corresponding disposable pipette tips
2. Polypropylene tubes to contain up to 1000 μ L
3. Tube racks
4. Adjustable 8- or 12-channel micropipette (50-250 μ L range) or repeating micropipette (optional)
5. Clean 1 L and 500 mL graduated cylinders
6. Deionized or distilled water
7. Cover for microplate
8. Clean container for diluted Wash Solution
9. Apparatus for filling wells during washing procedure (optional)
10. Lint-free paper towels or absorbent paper
11. Disposable pipetting reservoirs
12. Timer (60-minute range)
13. Calibrated ELISA plate reader capable of reading at 450 nm (preferably subtracting reference values at 650 or 620 nm)
14. Sodium hypochlorite (household bleach 1:10 dilution) for decontamination of specimens, reagents and materials

PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only

1. This kit should only be used by qualified laboratory staff.
2. Use separate pipette tips for each sample, calibrator and reagent to avoid cross-contamination.
3. Use separate reservoirs for each reagent. This applies especially to the TMB Substrate.
4. After use, decontaminate all specimens, reagents and materials by soaking for at least 30 minutes in sodium hypochlorite solution (household bleach diluted 1:10).
5. To avoid droplet formation during washing, aspirate the wash solution into a bottle containing bleach.
6. Avoid release into the environment. Dispose of containers and unused contents in a safe way and in accordance with national and local regulations.
7. The Stop Solution contains 0.5 mol/L sulfuric

- acid and can cause irritation or burns to the skin and eyes. If contact occurs, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
8. Do not interchange components from kits with different batch numbers. The components have been standardized as a unit for a given batch.
9. Hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated specimens may give erroneous results.
10. Do not dilute clinical specimens directly in the coated microwells.
11. Do not touch or scrape the bottom of the coated microwells when pipetting or aspirating fluid.
12. Incubation times and temperatures other than those specified may give erroneous results.
13. Do not allow the wells to dry once the assay has begun.
14. The TMB Substrate is light sensitive. Keep away from bright light.
15. Do not reuse microwells or pour reagents back into their bottles once dispensed.

STABILITY AND STORAGE

1. Store the kit with all reagents at 2-8°C. Do not freeze.
2. Use all reagents before the expiry date on the kit box label.
3. Diluted Wash Solution Concentrate remains stable for 4 weeks at 2-8°C. If not all wells are to be used, dilute only the portion of Wash Solution Concentrate required.
4. Diluted Sample Diluent Concentrate remains stable for 24 hours at 2-8°C. If not all wells are to be used, dilute only the portion of Sample Diluent Concentrate required.
5. For subsequent use, store unused wells in the foil pouch with the desiccant provided and reseal. Always allow foil pouch to equilibrate to room temperature before opening to avoid condensation in/on the coated microwells.

COLLECTION OF SPECIMENS

Handle and dispose of all blood-derived or urine specimens as if they were potentially infectious. See Precautions, sections 2, 4 and 5.

Determination of NGAL in a single specimen requires 10 μ L of urine, plasma or serum. Blood specimens should be collected aseptically into EDTA tubes or plain tubes by qualified staff using approved venepuncture techniques. Plasma or serum should be prepared by standard techniques for clinical laboratory testing. Urine should be centrifuged. Cap the prepared clinical specimens. If the assay cannot be performed within 24 hours or specimens are to be shipped, freeze the specimens at -20°C or below. For long-term storage of clinical specimens, -70°C or below is recommended. Avoid repeated freezing and thawing. Do not use hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated specimens.

PREPARATION OF REAGENTS

1. Bring all specimens and reagents to room temperature ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$). Mix specimens thoroughly by gentle inversion and if necessary clear visible particulate matter by low-speed centrifugation.
2. Determine the number of specimens to be tested (in duplicate) plus any internal laboratory control specimens (in duplicate) plus any reagent blank wells. The pre-coated wells can be used as strips of 8 or as individual wells. Single wells are handled by breaking individual wells apart and placing each well in the frame at an appropriate position. Letters and notches on the wells allow the individual wells to be identified. Add 12 wells for the 6 calibrators (in duplicate). Remove the number of microwells required and replace the remainder in the foil pouch with desiccant at $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$.
3. Wash Solution: Dilute the 25x Wash Solution Concentrate by pouring the total contents of the bottle (30 mL) into a 1-L graduated cylinder and add distilled or deionized water to a final volume of 750 mL. Mix thoroughly and store at $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ after use. If not all the wells are to be used, dilute only the required volume of Wash

Solution Concentrate with 24 volumes of water to produce a 1/25 dilution.

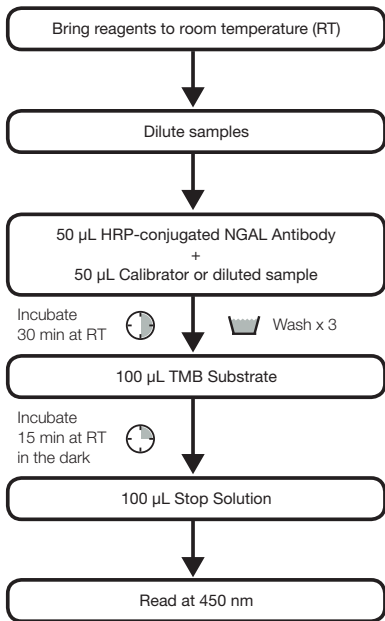
4. Sample Diluent: Dilute the 5x Sample Diluent Concentrate (contains red dye to aid pipetting) by pouring the total contents of the bottle (60 mL) into a 500-mL graduated cylinder and add distilled or deionized water to a final volume of 300 mL. Mix thoroughly and store at $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ after use. If not all the wells are to be used, dilute only the required volume of Sample Diluent Concentrate with 4 volumes of water to produce a 1/5 dilution.
5. NGAL Rapid Calibrators (contains red dye to aid pipetting): The assigned concentrations are indicated on their labels. Do not dilute further.
6. HRP-conjugated NGAL Antibody (ready to use): Do not dilute further.
7. TMB Substrate (ready to use): Do not dilute further.
8. Stop Solution (ready to use): Do not dilute further.

PREPARATION OF SAMPLES

The range of the standard curve is 0.2-20 ng/mL and the diagnostically relevant range is 100-500 ng/mL for plasma or serum and 50-500 ng/mL for urine (see Interpretation of Results). Therefore an initial screening dilution of 1/100 for plasma or serum and 1/50 for urine is recommended. The 1/100 dilution can be prepared by diluting 10 μ L of plasma or serum in 990 μ L of Sample Diluent and the 1/50 dilution can be prepared by diluting 10 μ L of urine in 490 μ L of Sample Diluent. Dilutions are mixed by inversion or moderate vortexing. Reassay of out-of-range samples at lower or higher dilution may be necessary. Dilutions lower than 1/25 should not be used.

ASSAY PROCEDURE

1. Prepare the assay protocol, assigning the appropriate wells for setting up calibrators, diluted patient specimens and any internal laboratory controls in duplicate. If a reference wavelength of 650 or 620 nm is not available on the ELISA reader, a reagent blank well can be assigned. This is set up with 50 μ L of Sample Diluent instead of diluted sample and processed like the other wells.
2. Dilute samples according to the expected NGAL concentrations (1/100 for plasma or serum and 1/50 for urine will be suitable for most samples).
3. Pipette a sufficient volume of each calibrator, each diluted sample and any internal laboratory controls into the appropriate wells of the polystyrene U-microwell plate to permit subsequent transfer of 50 μ L volumes to corresponding coated microwells.
4. Pipette 50 μ L volumes of HRP-conjugated NGAL Antibody into the corresponding positions in the coated microwells. Then with a multichannel pipette rapidly transfer 50 μ L volumes of the calibrator solutions, diluted samples and internal controls from the U-wells into the corresponding coated wells already containing the detection antibody. This method of sample addition is recommended to reduce the difference in incubation time between the first and last samples added to the coated microwells.
5. Cover the wells and incubate for **30 minutes** at room temperature on a shaking platform set at 200/minute.
6. Aspirate the contents of the microwells and wash the microwells three times with at least 300 μ L of the previously diluted Wash Solution. If washing is performed manually, empty the microwells by inversion and gentle shaking into a suitable container, followed by blotting in the inverted position on a paper towel. A dwell time of 1 minute before emptying is recommended for at least the last wash of the cycle. The vigor with which diluted Wash Solution is filled into or emptied from the wells influences final color development. Manual pipetting, which may be very gentle and lead to high color development, is only recommended in the absence of alternatives such as filling the wells by immersion, using a multi-channel manual washing dispenser, or using an automatic washing apparatus.
7. Dispense 100 μ L of TMB Substrate (ready to use) into each microwell. The use of a multichannel micropipette is recommended to reduce pipetting time. Cover the wells and incubate for **exactly 15 minutes** at room temperature in the dark. Start the clock when filling the first well.
8. Add 100 μ L of Stop Solution (ready to use) to each well, maintaining the same pipetting sequence and rate as in Step 7. Mix by gentle shaking for 20 seconds, avoiding splashing. Read the wells within 30 minutes.
9. Read the absorbances of the wells at 450 nm in an appropriate microplate reader (reference wavelength 650 or 620 nm). If no reference wavelength is available, the value of the reagent blank well is subtracted from each of the other values before other calculations are performed.

SCHEMATIC OVERVIEW**CALCULATION OF RESULTS**

For calculation of results the exact values of the calibrators printed on the labels of the calibrators and on the QC-certificate should be used.

The basic principle is to construct a calibration curve by plotting the mean of duplicate absorbance values for each NGAL Rapid Calibrator on the y-axis against the corresponding NGAL concentrations in ng/mL on the x-axis. The calibration curve must meet the validation requirements. The NGAL concentration of each diluted sample is then found by locating the point on the curve corresponding to the mean of

duplicate absorbance values for the diluted sample and reading its corresponding concentration in ng/mL from the x-axis. The concentration of NGAL in the undiluted specimen is calculated by multiplying this result by the sample dilution factor.

This procedure can be performed manually using graph paper with linear x and y scales. A smooth curve can be drawn through the points or adjacent points can be joined by straight lines. The latter procedure may slightly overestimate concentration values between points when the curve is slightly convex to the left, which is the typical finding. Although the curve may approximate to a straight line, it is both practically and theoretically incorrect to calculate and draw the straight line of best fit and to read the results from this.

The procedure can also be performed by an ELISA reader software program incorporating curve fitting procedures. The procedure of choice is to use linear x and y axes with 4-parameter logistic curve fitting. Diluted samples that give a mean absorbance above that for the NGAL Rapid Calibrator 6 or below that for the NGAL Rapid Calibrator 2 are out of the range of the assay and their concentrations should be noted as >20 ng/mL and <0.2 ng/mL, respectively. The corresponding concentrations in the undiluted samples are calculated >(20 x dilution factor) ng/mL and <(0.2 x dilution factor) ng/mL, respectively. If necessary, these samples can be re-assayed at higher and lower dilutions for high- and low-reading samples, respectively. The new dilution factors should be those estimated to give absorbance values that fall well within the range of the calibration curve, but dilutions lower than 1/25 should not be used.

VALIDATION OF CALIBRATION CURVE

The mean absorbance for the NGAL Rapid Calibrator 6 should be >1.5. The mean absorbance for any NGAL Rapid Calibrator should be higher than that for the previous NGAL Rapid calibrator, e.g. absorbance(NGAL Rapid Calibrator 6) > absorbance(NGAL Rapid Calibrator 5). The curve should be slightly convex to the left when the results are plotted on linear axes.

Out-of-line points for individual calibrators: One or more individual calibrators may give anomalous absorbance readings. One or both of the duplicate values may be out of line, and the mean of the duplicates may be out of line. This error is significant if it impairs satisfactory curve fitting by the 4-parameter logistic method, which, as a result of the anomalous value, is shifted away from other calibrator points that are in fact correct. The calibrator points and fitted curve should always be examined for correct fit before any calculations of concentration from it are accepted. A poorly fitting curve will also be revealed by a high sum of residual squares. If only one calibrator is affected, which is not the highest calibrator, two courses of action are possible:

i) An erroneous singlet or duplicate result should be eliminated from the curve, and the remaining results refitted by the 4-parameter logistic procedure. If a satisfactory fit is obtained, provisional concentration results can be calculated from it.

ii) If no satisfactory fit can be obtained in this way, but the curve is otherwise consistent, provisional results can be obtained from straight lines or simple cubic spline fitting between the means of duplicates, omitting the erroneous point.

If two or more calibrators are affected, the assay should be repeated.

A deviant result for an individual calibrator can be due to operator error or to calibrator deterioration. If both duplicate values are consistently out of line in successive assays, the calibrator is faulty and should be omitted.

TRACEABILITY OF CALIBRATOR VALUE

The NGAL concentration of diluted calibrator material has been assigned by comparison in ELISA with a purified preparation of recombinant human NGAL quantified by Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

INTERPRETATION OF RESULTS

The finding of a raised urinary, plasma or serum level of NGAL cannot be independently diagnostic of any single pathology. As stated in the Introduction, a variety of independent pathologies are

associated with raised levels of urinary or plasma NGAL. Physicians must interpret the significance of any raised NGAL level in the light of each patient's clinical features.

The capacity of urinary and plasma NGAL levels to diagnose acute renal failure presumed to result from renal injury was determined in a series of 60 consecutive patients admitted to a non-specialized intensive care unit and classifiable by other criteria as showing or not showing signs of renal failure. Many of these patients had concurrent sepsis and some had cancers. Raised maximal NGAL levels were associated with acute renal failure as shown:

ACUTE RENAL FAILURE

Sample	Urine	Plasma
Cutoff value	350 ng/mL	400 ng/mL
Diagnostic specificity	89.3%	96.3%
Diagnostic sensitivity	96.9%	84.8%
Positive predictive value	91.2%	93.1%
Negative predictive value	96.2%	83.9%

An NGAL concentration in urine above 350 ng/mL or in plasma above 400 ng/mL is highly likely (>90% positive predictive value) to be due to renal injury that may lead to acute renal failure. NGAL concentrations below the cutoff values may indicate either no or only slight renal injury in this patient population. A sudden rise in the urinary NGAL concentration above the patient's previous values may indicate renal injury even if the cutoff value is not exceeded, and close surveillance of renal function is recommended.

QUALITY CONTROL

Laboratories intending to perform repeated assays

should establish their own high-reading and low-reading control sera or urine, stored in small (e.g. 50 μ L) aliquots at -70°C or below. An aliquot of each should be thawed and tested in each assay and a record kept of successive results. This serves as a control of test performance, test integrity and operator reliability. The results should be examined for drift (tendency for successive results to rise or fall) or significant deviation from the mean of previous results. Values not deviating by more than 20% from the mean of previous values can be taken to indicate acceptability of the assay. Aliquots of control serum should not be refrozen for repeated assay once thawed, and if a further assay is performed, fresh control aliquots and fresh dilutions of patient specimens should be used.

LIMITATIONS

The finding of a raised urinary, plasma or serum level of NGAL cannot be independently diagnostic of any single pathology. As stated in the Introduction, a variety of independent pathologies are associated with raised levels of urinary or plasma NGAL. Physicians must interpret the significance of any raised NGAL level in the light of each patient's clinical features.

The cutoff values given in the Interpretation of Results are based on the maximal values in the patient population described, which was characterized by the presence of multiple confounding factors. Other cutoffs, perhaps lower, may be appropriate for other patient groups with fewer confounding factors. Sudden rises in NGAL may indicate acute renal injury even if they do not exceed the cutoff values.

EXPECTED RESULTS

The mean NGAL concentration in samples from healthy donors was 63 ng/mL (range 37–106 ng/mL, $n = 80$) in EDTA plasma and 5.3 ng/mL (range 0.7–9.8 ng/mL, $n = 7$) in urine. In unselected patients admitted to intensive care, the NGAL concentrations in urine ranged from 9 ng/mL to 40,000 ng/mL (40 μ g/mL) in urine ($n = 60$) and from 25 ng/mL to 3491 ng/mL in EDTA plasma ($n = 60$).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of detection: The lowest concentration of NGAL giving an absorbance reading greater than 2 SD above the mean zero (NGAL Rapid Calibrator 1) reading ($n = 8$) was determined to be 0.008 ng/mL, this being lower than the value of NGAL Rapid Calibrator 2.

Precision: Intraassay variation was determined by measurement of NGAL in two urine samples and two plasma samples with 8 replicates. The following results were obtained (CV = coefficient of variation):

Samples	CV
Urine A	3.4%
Urine B	4.3%
Plasma A	2.9%
Plasma B	1.9%

Interassay variation was determined by measurement of NGAL in 2 diluted urine samples and 2 diluted EDTA plasma samples with 2 replicates in 4 separate assays. The following results were obtained:

Samples	CV
Urine A	4.7%
Urine B	22.7%
Plasma A	11.4%
Plasma B	12.4%

Analytical recovery: Urine and plasma samples were spiked with recombinant human NGAL and analyzed in the assay. Recovery was calculated from (Measured/Expected) expressed as a percentage.

Sample	Measured (range)	Expected (range)	Recovery (range)
Urine	4.3-12.0 ng/mL	4.5-12.4 ng/mL	93%-98%
Plasma	4.2-10.5 ng/mL	4.6-12.6 ng/mL	83%-90%

Linearity: NGAL was measured in serial dilutions ($n = 8$) of 2 urine samples and 2 plasma samples. The CV of the mean of the measured values corrected for the dilution was 9.9% and 12.5% for the two urine samples and 12.2% and 7.4% for the two plasma samples, demonstrating satisfactory linearity.

Sample material: Analysis of samples of serum, EDTA plasma or urine showed no significant differences in analytical recovery, linearity or precision. However, NGAL concentrations are often slightly higher in serum than in plasma²³, probably because of the release of NGAL from neutrophils during blood clotting.

Specificity: The two monoclonal antibodies against human NGAL used in the assay have been shown to bind to different preparations of recombinant human NGAL and to give a single band at 25 kDa on Western blot analysis of a reduced postnuclear supernatant from human neutrophils²⁵.

LIABILITY

For *in vitro* diagnostic use in selected countries only. See www.bioporto.com for availability in your country. This kit is only intended for the *in vitro* determination of NGAL in human plasma, serum or urine.

The kit is only intended for use by qualified personnel carrying out research or diagnostic activities.

If the recipient of this kit passes it on in any way to a third party, this instruction must be enclosed, and said recipient shall at own risk secure in favor of BioPorto Diagnostics A/S all limitations of liability herein.

BioPorto Diagnostics A/S shall not be responsible for any damages or losses due to using the kit in any way other than as expressly stated in these Instructions.

The liability of BioPorto Diagnostics A/S shall in no event exceed the commercial value of the kit.

BioPorto Diagnostics A/S shall under no circumstances be liable for indirect, special or consequential damages, including but not limited to loss of profit.



Revision: NR2010-05-EN-DE

Diese Anleitung bitte sorgfältig lesen

VERWENDUNGSZWECK

Zur *in vitro*-Bestimmung von humanem NGAL im Urin, Plasma oder Serum als Marker für eine akute Nierenschädigung, die zu einem akuten Nierenversagen führen kann.

EINFÜHRUNG

NGAL (Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin) wurde erstmals 1989¹ entdeckt und gehört, wie der Name sagt, zur Proteinfamilie der Lipocaline. Diese sind typischerweise kleine sezernierte Proteine, die dadurch charakterisiert sind, dass sie kleine, hydrophobe Moleküle in einem strukturell konservierten, aus β -Faltblättern gebildeten Trichter binden, um an spezifische Zelloberflächenrezeptoren zu binden und makromolekulare Komplexe zu bilden. NGAL wurde 1993² vollständig charakterisiert und benannt, hat aber viele Synonyme: Es ist auch unter den Namen NL (neutrophiles Lipocalin; HNL: humanes NL)³, Lipocalin-2, Protein 24p3⁴ oder Uterocalin⁵ (in Mäusen) und *neu*-related Lipocalin⁶ oder 25 kDa α_2 -microglobulin-related Protein⁷ (in Ratten) bekannt. Das humane NGAL besteht aus einer einzelnen, mit einer Disulfidbrücke ausgestatteten Polypeptidkette aus 178 Aminosäureresten, die eine berechnete Molekülmasse von 22 kDa² besitzt. Durch Glykosylierungen erhöht sich die scheinbare Molekülmasse jedoch auf 25 kDa. In Neutrophilen (neutrophile polymorphkernige Leukozyten) tritt es in monomeren und dimeren sowie zu einem kleinen Prozentsatz in trimeren Formen auf. Darüber hinaus kommt es im Komplex mit der 92-kDa Typ IV-Kollagenase aus menschlichen Neutrophilen (Gelatinase B oder Matrix Metallproteinase-9, MMP-9)⁸ vor.

NGAL wurde zuerst aus dem Zellkulturüberstand von aktivierten humanen neutrophilen Granulozyten isoliert¹, wird aber auch in geringen Mengen in anderen menschlichen Geweben, darunter Niere, Prostata und Epithelien der Atem- und Verdauungstrakte, exprimiert^{9,10}. Eine starke Expression findet in Adenomen und entzündeten

Darmepithelien¹¹, Mammaadenokarzinomen¹² und Urothelkarzinomen¹³ statt.

Aufgrund seiner geringen Molekülgröße und seiner Abbauwiderstandsfähigkeit wird NGAL mit dem Urin ausgeschieden und kann dort sowohl in seiner freien Form als auch im Komplex mit MMP-9 nachgewiesen werden. Ungeachtet der Gründe für eine erhöhte NGAL-Produktion korrelieren die Urinwerte mit den Plasmawerten¹⁴, wobei jedoch besonders hohe Urinwerte zu erwarten sind, wenn NGAL von den Nierentubuli oder urothelialen Karzinomen direkt in den Urin freigesetzt wird. Es ist unklar, inwieweit NGAL-MMP-9-Komplexe, die aus weit von den Harnwegen entfernten Quellen stammen, als solche in den Urin abgegeben werden, oder ob sie sich nach unabhängiger Exkretion von NGAL und MMP-9 im Urin neu bilden⁸.

Auch wenn die Funktionen von NGAL nicht vollständig verstanden sind, so scheint es, dass es in Zellen unter „Stress“ zu einer erhöhten NGAL-Produktion kommt, z. B. bei einer Infektion, Inflammation, einer neoplastischen Transformation oder in Geweben, die zurückgebildet werden, wie z. B. dem Mausuterus post partum und den Brustdrüsen nach dem Abstillen⁵. Im Hinblick auf eine mögliche antibakterielle Funktion von NGAL lässt sich sagen, dass es Enterobactin und andere Siderophore bindet, wodurch Mikroorganismen der wichtige Nahrungsbestandteil Fe³⁺ entzogen wird¹⁵. Die Komplexbildung von NGAL und MMP-9 scheint die enzymatische Aktivität von MMP-9 vor einem Abbau zu schützen⁸. Die erhöhte Expression von NGAL in sich rückbildenden Geweben führte zu der Vermutung, dass es an der Apoptose beteiligt ist, aber es erscheint wahrscheinlicher, dass NGAL mit einer Erhaltungsreaktion verbunden ist¹⁶.

NGAL und Nieren. Schon 1989 wurde entdeckt, dass NGAL (24p3) von Maus-Nierenzellen exprimiert und als frühe Reaktion auf eine virale Infektionen mit SV40 dramatisch hochreguliert wird (14- bis 20-fach)¹⁷. Eine ähnlich frühe und dramatische Hochregulierung wurde später bei anderen Arten von Nierenschäden beobachtet. So zeigten erhöhte Plasma-NGAL-Werte bei nierengeschädigten Patienten mit systemischer Vaskulitis eine starke

Urin-NGAL-Werte dienen als früher Marker einer akuten Nierenschädigung nach kardiopulmonaler Bypass-Operation^{19,20}, und bei Intensivpflegepatienten liefern sowohl Urin- als auch Plasma-NGAL-Werte einen frühen Hinweis auf eine akute Nierenschädigung²¹. Außerdem wurden erhöhte Urin- und Plasma-NGAL-Werte bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen beobachtet²². Patienten mit funktionierenden Nierentransplantaten zeigten ebenfalls erhöhte Urinwerte (nachweisbar durch Western Blot)²³. Es scheint daher, dass viele verschiedene Nierenerkrankungen mit erhöhten NGAL-Werten im Plasma und im Urin assoziiert sind. Während die Plasma- und Urin-NGAL-Werte unter akuten Bedingungen stark korrelieren, sind nach einer Nierenschädigung, die stark genug ist, um zu einem akuten Nierenversagen, einer akuten Tubulusnekrose oder einer akuten tubulointerstitiellen Nephropathie zu führen, besonders hohe Urin-NGAL-Werte zu erwarten. Die Nutzung von NGAL im Urin als Marker für Nierenerkrankungen darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass es auch andere gleichzeitige Erkrankungen gibt, die selbst mit erhöhten NGAL-Werten assoziiert sind.

NGAL in Inflammation/Infektion. NGAL wird von spezifischen Granuläe aktivierter Neutrophiler freigesetzt^{1,2}, und die Serumwerte steigen bei entzündlichen oder infektiösen Vorgängen, insbesondere bei bakteriellen Infektionen²³ an. Deshalb wurde Serum-NGAL als Marker für bakterielle Infektionen vorgeschlagen. Da NGAL-Spiegel jedoch auch unabhängig von infektiösen Vorgängen bei neoplastischen und Nierenerkrankungen erhöht sein können, sollte diese vorgeschlagene Anwendung mit Vorsicht betrachtet werden. NGAL kann auch bei Infektionen in solchen Patienten erhöht sein, die aufgrund einer Leukämie oder einer behandelten Leukämie eine unzählbar niedrige Anzahl an neutrophilen Granulozyten aufweisen, was zeigt, dass das erhöhte NGAL in Infektionen nicht nur von neutrophilen Granulozyten stammt.

NGAL und Neoplasien. Die verschiedenen Krebsarten, bei denen die NGAL-Werte (oftmals zusammen mit MMP-9) erhöht sein können, wurden bereits weiter oben angegeben. Dies wurde durch

die Expression von NGAL in Tumorzellen und dessen hohen Urinwerten sowohl in der freien Form als auch im Komplex mit MMP-9 gezeigt⁸. Es wurde sogar vorgeschlagen, NGAL-MMP-9-Komplexe im Urin als Marker für den Krankheitszustand von Brustkrebspatienten zu benutzen²⁴. In diesen Fällen wurden die Plasmawerte normalerweise nicht bestimmt.

TESTPRINZIP

Bei dem Test handelt es sich um einen ELISA, der in mit einem monoklonalen Antikörper gegen das humane NGAL beschichteten Mikrotitervertiefungen durchgeführt wird. Gebundenes NGAL wird mit einem Meerrettichperoxidase (horseradish Peroxidase, HRP)-konjugierten monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Der Test wird dann durch Inkubation mit einem farbbildenden Substrat entwickelt. Der Test ist schnell durchzuführen und besteht aus zwei Schritten:

Schritt 1. Aliquots der Standards, verdünnte Proben und Kontrollen werden mit dem HRP-konjugierten Detektionsantikörper in den beschichteten Mikrotitervertiefungen inkubiert. Einzig NGAL wird sowohl an die Beschichtung als auch den Detektionsantikörper binden, während ungebundenes Material durch Waschen entfernt wird.

Schritt 2. Ein chromogenes, Tetramethylbenzidin (TMB) enthaltendes Peroxidasesubstrat wird zu den einzelnen Testvertiefungen gegeben. Die an den gebundenen Detektionsantikörper gekoppelte HRP reagiert mit dem Substrat, wodurch ein farbiges Produkt entsteht. Die enzymatische Reaktion wird chemisch gestoppt und die Farbintensität bei 450 nm in einem ELISA-Lesegerät gemessen. Die Farbintensität (Extinktion) wird durch die Konzentration des ursprünglich in die einzelnen Vertiefungen gegebenen NGAL bestimmt. Die Ergebnisse der Standards werden zur Erstellung einer Standardkurve genutzt, von der die NGAL-Konzentrationen in den Testproben abgelesen werden.

BESTANDTEILE DES KITS

Einheit	Inhalt	Menge
①	12 x 8 beschichtete Mikrotitervertiefungen + Rahmen	96 Vertfg.
②	5x Probenverdünnungsmittel-Konzentrat	1 x 60 mL
③-⑥	NGAL Rapid standard 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	25x Waschlösungs-konzentrat	1 x 30 mL
⑤	HRP-konjug. NGAL-Antikörper	1 x 6 mL
⑦	TMB-Substrat	1 x 12 mL
⑧	Stopplösung	1 x 16 mL
⑨	U-Mikrotiterplatte aus Polypropylen	96 Vertfg.

Hinweis: Flüssige Reagenzien enthalten Thimerosal oder Bronidox L als Konservierungsmittel. Diese sind bei oraler Einnahme gesundheitsschädlich.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

1. Einstellbare Mikropipetten (für einen Bereich von 1-1000 μ L) sowie dazugehörige Einweg-Pipettenspitzen
2. Polypropylen-Reaktionsgefäße mit einem zulässigen Füllvolumen von mindestens 1000 μ L
3. Reaktionsgefäßhalter
4. Eine einstellbare 8- oder 12-Kanal-Mikropipette (für einen Bereich von 50-250 μ L) oder Multipipette (optional)
5. Saubere 1-L- und 500-mL-Messzylinder
6. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
7. Eine Abdeckung für die Mikrotiterplatte
8. Einen sauberen Behälter für die verdünnte Waschlösung
9. Ein Gerät zur Befüllung der Vertiefungen in den Waschschritten (optional)
10. Flusenfreie Papierhandtücher oder absorbierendes Papier
11. Einweg-Pipettierreservoirs
12. Eine Zeitschaltuhr (für eine Zeitspanne bis 60

Minuten)

13. Ein kalibriertes ELISA-Platten-Lesegerät, das die Platten bei 450 nm messen kann (vorzugsweise mit der Möglichkeit, Referenzwerte bei 650 oder 620 nm abzulesen zu können)
14. Natriumhypochlorit (Haushaltsbleiche, 1:10 Verdünnung) zur Dekontamination der Proben, Reagenzien und Materialien

VORSICHTSMASSNAHMEN
Nur für die *In-vitro*-Diagnostik

1. Dieser Kit sollte nur von qualifiziertem Laborpersonal benutzt werden.
2. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen für jede Probe, jeden Standard und jedes Reagenz gesonderte Pipettenspitzen benutzen.
3. Für jedes Reagenz gesonderte Reservoirs benutzen. Dies gilt insbesondere für das TMB-Substrat.
4. Alle Proben, Reagenzien und Materialien nach Gebrauch durch mindestens 30-minütiges Einweichen in Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche, 1:10 verdünnt) dekontaminieren.
5. Um Tröpfchenbildung während der Waschprozedur zu vermeiden, sollte die Waschlösung in eine Bleiche enthaltende Flasche abgosaugt werden.
6. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Behälter und unbenutzte Bestandteile müssen unter Beachtung der nationalen und örtlichen Vorschriften sicher beseitigt werden.
7. Die Stopplösung enthält 0,5 mol/L Schwefelsäure und kann Reizungen und Verätzungen der Haut und Augen verursachen. Bei Berührung sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen.
8. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht ausgetauscht werden. Die Komponenten wurden als Einheit für eine bestimmte Charge standardisiert.
9. Hämolytierte, hyperlipämische, hitzebehandelte oder kontaminierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
10. Verdünnungen von klinischen Proben nicht

direkt in den beschichteten Mikrotitervertiefungen durchführen.

11. Beim Pipettieren oder Absaugen von Flüssigkeit die Berührung oder das Kratzen am Boden der Mikrotitervertiefungen vermeiden.
12. Die Verwendung anderer als der angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
13. Während des Versuchs dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.
14. Das TMB-Substrat ist lichtempfindlich. Vor Licht geschützt aufbewahren.
15. Benutzte Mikrotitervertiefungen und Reagenzien nicht wieder verwenden oder in ihre Flaschen zurückschütten.

STABILITÄT UND LAGERUNG

1. Kit mit allen Reagenzien bei 2-8°C lagern. Nicht einfrieren.
2. Alle Reagenzien vor dem auf dem Kitschachtel-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
3. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2-8°C für 4 Wochen haltbar. Falls nicht alle Vertiefungen benutzt werden, nur den benötigten Anteil des Waschlösungskonzentrats verdünnen.
4. Das verdünnte Probenverdünnungsmittelkonzentrat ist bei 2-8°C für 24 Stunden haltbar. Falls nicht alle Vertiefungen benutzt werden, nur den benötigten Anteil des Probenverdünnungsmittelkonzentrats verdünnen.
5. Nicht eingesetzte Vertiefungen können für nachfolgenden Gebrauch zusammen mit dem Antikondensationsmittel in dem mitgelieferten Folienbeutel versiegelt und gelagert werden. Folienbeutel vor dem Öffnen stets auf Raumtemperatur bringen, um eine Kondensation in/auf den beschichteten Mikrotitervertiefungen zu vermeiden.

PROBENENTNAHME

Alle Proben aus Blutprodukten oder Urinproben wie potenziell infektiöses Material behandeln und entsorgen. Siehe Vorsichtsmaßnahmen in den Abschnitten 2, 4 und 5.

Die Bestimmung von NGAL in einer einzelnen Probe erfordert 10 µL Urin, Plasma oder Serum. Blutproben sollten von qualifiziertem Personal aseptisch mittels einer anerkannten Venenpunktionstechnik in einem unbehandelten oder mit EDTA versetzten Gefäß gesammelt werden. Plasma oder Serum sollte mit klinischen Standardlabormethoden hergestellt werden. Urin sollte zentrifugiert werden. Zubereitete klinische Proben mit einem Deckel versehen. Proben bei -20°C oder niedrigeren Temperaturen einfrieren, falls der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden kann oder falls die Proben verschickt werden sollen. Zur Langzeitlagerung klinischer Proben werden Temperaturen von -70°C oder niedriger empfohlen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden. Keine hämolytierten, hyperlipämischen, hitzebehandelten oder kontaminierten Proben verwenden.

REAGENZIVORBEREITUNG

1. Alle Proben und Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Proben durch vorsichtiges Schütteln gründlich mischen. Falls notwendig, sichtbare Teilchen durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit entfernen.
2. Anzahl der zu testenden Proben (im Duplikat) plus Anzahl der internen Laborkontrollproben (im Duplikat) plus Anzahl der Leerwerte bestimmen. Die vorbeschichteten Vertiefungen können als 8er-Streifen oder einzeln verwendet werden. Nach dem Abbrechen einzelner Vertiefungen werden diese jeweils an einer passenden Position im Rahmen platziert. Individuelle Vertiefungen werden anhand von Buchstaben und Einkerbungen auf den Vertiefungen identifiziert. 12 Vertiefungen für die 6 Standards (im Duplikat) hinzufügen. Die benötigte Anzahl der Mikrotitervertiefungen abtrennen und den Rest im Folienbeutel mit

- dem Antikondensationsmittel bei 2-8°C lagern.
3. **Waschlösung:** Den gesamten Inhalt der Flasche mit dem 25x Waschlösungskonzentrat (30 mL) in einen 1-L-Messzylinder geben und mit destilliertem oder deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 750 mL auffüllen. Gründlich mischen und nach Gebrauch bei 2-8°C lagern. Falls nicht alle Vertiefungen benutzt werden, sollte nur das benötigte Volumen des Waschlösungskonzentrats mit 24 Volumenteilen Wasser verdünnt werden, um eine Verdünnung von 1/25 zu erhalten.
 4. **Probenverdünnungsmittel:** Den gesamten Inhalt der Flasche mit dem 5x Probenverdünnungsmittelkonzentrat (enthält einen roten Farbstoff als Hilfe beim Pipettieren) in einen 500-mL-Messzylinder geben und mit destilliertem oder deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 300 mL auffüllen. Gründlich mischen und nach Gebrauch bei 2-8°C lagern. Falls nicht alle Vertiefungen benutzt werden, sollte nur das benötigte Volumen des Probenverdünnungsmittelkonzentrats mit 4 Volumenteilen Wasser verdünnt werden, um eine Verdünnung von 1/5 zu erhalten.
 5. **NGAL Rapid Standards (enthalten einen roten Farbstoff als Hilfe beim Pipettieren):** Die entsprechenden Konzentrationen sind auf den Etiketten angegeben. Nicht weiter verdünnen.
 6. **HRP-konjugierter NGAL-Antikörper (gebrauchsfertig):** Nicht weiter verdünnen.
 7. **TMB-Substrat (gebrauchsfertig):** Nicht weiter verdünnen.
 8. **StoppLösung (gebrauchsfertig):** Nicht weiter verdünnen.

PROBENVORBEREITUNG

Der Bereich der Standardkurve ist 0,2 ng/mL bis 20 ng/mL, mit einem diagnostisch relevanten Bereich von 100-500 ng/mL für Plasma oder Serum und 50-500 ng/mL für Urin (siehe Interpretation der Ergebnisse). Daher wird für ein erstes Screening eine Plasma- oder Serumverdünnung von 1/100 und eine Urinverdünnung von 1/50 empfohlen. Die 1/100-Verdünnung kann durch Verdünnung von

10 µL Plasma oder Serum in 990 µL des Probenverdünnungsmittels hergestellt werden, während die 1/50-Verdünnung durch Verdünnung von 10 µL Urin in 490 µL des Probenverdünnungsmittels hergestellt werden kann. Die Verdünnungen werden durch Inversion oder mäßiges Vortexen gemischt. Unter Umständen müssen aus dem Wertebereich fallende Proben bei einer höheren oder niedrigeren Verdünnung erneut gemessen werden. Niedrigere Verdünnungen als 1/25 sollten nicht verwendet werden.

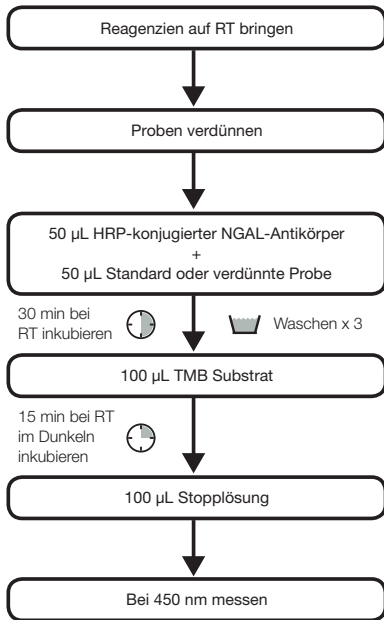
TESTDURCHFÜHRUNG

1. Testprotokoll erstellen und dabei die Standards, verdünnten Patientenproben und internen Laborkontrollproben jeweils im Duplikat den entsprechenden Vertiefungen zuweisen. Falls das ELISA-Lesegerät keine Referenz-Wellenlänge bei 650 oder 620 nm zulässt, kann eine Vertiefung ein Reagenzleerwert zugewiesen werden. Dieser wird mit 50 µL des Probenverdünnungsmittels anstelle einer verdünnten Probe befüllt und in gleicher Weise behandelt wie die anderen Vertiefungen.
2. Proben gemäß den erwarteten NGAL-Konzentrationen verdünnen (für die meisten Proben werden 1/100 für Plasma oder Serum und 1/50 für Urin ausreichend sein).
3. Ausreichende Volumina der Standards, der verdünnten Proben und der internen Laborkontrollen in die geeigneten Vertiefungen der U-Mikrotiterplatte aus Polypropylen pipettieren, um einen nachfolgenden Transfer von 50-µL-Volumina in die entsprechenden beschrifteten Mikrotitervertiefungen zu ermöglichen.
4. 50-µL-Volumina des HRP-konjugierten NGAL-Antikörpers in die entsprechenden Positionen der beschrifteten Mikrotitervertiefungen pipettieren. Dann zügig mit einer Mehrkanal-Pipette 50-µL-Volumina der Standardlösungen, verdünnten Proben und internen Kontrollen aus den U-Vertiefungen in die entsprechenden beschrifteten Vertiefungen mit dem bereits vorhandenen Detektionsantikörper übertragen. Diese Methode der Probenaddition wird

empfohlen, um die unterschiedliche Inkubationszeit zwischen den zuerst und den zuletzt in die beschichteten Mikrotitervertiefungen gegebenen Proben so gering wie möglich zu halten.

5. Vertiefungen abdecken und für **30 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 200 U/min inkubieren.
6. Inhalt der Mikrotitervertiefungen absaugen und die Vertiefungen dreimal mit mindestens 300 µL der zuvor verdünnten Waschlösung waschen. Falls der Waschvorgang von Hand durchgeführt wird, die Mikrotitervertiefungen durch Umdrehen und vorsichtiges Schütteln über einem passenden Behälter leeren, gefolgt von Ausklopfen in der umgedrehten Position auf einem Papierhandtuch. Eine Verweilzeit von 1 Minute vor dem Leeren wird zumindest für den letzten Waschgang empfohlen. Die Heftigkeit, mit der die verdünnte Waschlösung in die Vertiefungen gefüllt oder aus diesen geleert wird, beeinflusst die Farbentwicklung am Ende. Pipettieren von Hand, welches sehr behutsam sein und zu hoher Farbentwicklung führen kann, wird nur bei Abwesenheit von Alternativen wie z. B. Füllung der Vertiefungen durch Eintauchen, Anwendung eines manuellen Mehrkanal-Waschlösungsdispensers oder Nutzung eines automatischen Waschapparats empfohlen.
7. In jede Mikrotitervertiefung 100 µL des gebrauchsfertigen TMB-Substrats verteilen. Die Anwendung einer Mehrkanal-Pipette wird empfohlen, um die Pipettierzeit zu reduzieren. Vertiefungen abdecken und für **genau 15 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren. Uhr starten, wenn die erste Vertiefung gefüllt wird.
8. 100 µL der gebrauchsfertigen Stopplösung unter Beibehaltung der gleichen Pipettierreihenfolge und -geschwindigkeit wie in Schritt 7 angegeben zu jeder Vertiefung zugeben. 20 Sekunden durch vorsichtiges Schütteln unter Vermeidung von Spritzern mischen. Vertiefungen innerhalb von 30 Minuten analysieren.
9. Extinktion der Vertiefungen in einem geeigneten

Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm messen (Referenz-Wellenlänge 650 oder 620 nm). Falls keine Referenz-Wellenlänge verfügbar ist, den Reagenzleerwert von allen anderen Werten abziehen, bevor weitere Berechnungen durchgeführt werden.

SCHEMATISCHE ÜBERSICHT

AUSWERTUNG

Zur Auswertung sollten die auf den Etiketten der Standards und dem QC-Zertifikat angegebenen genauen Werte der Standards benutzt werden.

Als Grundlage dient die Konstruktion einer Standardkurve. Dazu wird für den jeweiligen NGAL Rapid Standard der Mittelwert der doppelt bestimmten Extinktionswerte auf der y-Achse gegen die entsprechende NGAL-Konzentration (in ng/mL) auf der x-Achse aufgetragen. Die Standardkurve muss mit den Validierungsbedingungen übereinstimmen. Die NGAL-Konzentration einer

verdünnten Probe wird dann durch die Identifizierung des Punktes auf der Kurve, der dem Mittelwert der doppelt bestimmten Extinktionswerte der verdünnten Probe entspricht und dem Ablesen der diesem Punkt entsprechenden Konzentration (in ng/mL) auf der x-Achse bestimmt. Die NGAL-Konzentration in der unverdünnten Probe erhält man durch die Multiplikation dieses Resultats mit dem Probenverdünnungsfaktor.

Dieses Verfahren kann unter Anwendung von Graphpapier mit linearen x- und y-Achsen von Hand durchgeführt werden. Durch die Punkte kann eine stetige Kurve gezeichnet werden, angrenzende Punkte können aber auch durch gerade Linien verbunden werden. Die letztere Vorgehensweise könnte zu geringfügigen Überbewertungen von Konzentrationswerten zwischen zwei Punkten führen, falls die Kurve leicht konvex nach links verläuft, was typischerweise der Fall ist. Auch wenn die Kurve ungefähr einer geraden Linie entsprechen kann, ist es sowohl praktisch als auch theoretisch inkorrekt, eine Ausgleichsgerade zu berechnen und zu zeichnen und von dieser die Ergebnisse abzulesen.

Die Analyse kann ebenso mit einem Softwareprogramm für ein ELISA-Platten-Lesegerät durchgeführt werden, sofern das Programm mit Kurvenanpassungsmethoden ausgestattet ist. Die Methode der Wahl ist die Kurvenanpassung mit Hilfe eines Vier-Parameter-Modells (4-parameter logistic curve fitting) mit linearen x- und y-Achsen. Verdünnte Proben, deren mittlere Extinktion größer als die des NGAL Rapid Standards 6 oder kleiner als die des NGAL Rapid Standards 2 ist, befinden sich außerhalb des Testbereichs. Ihre Konzentrationen sollten mit >20 ng/mL beziehungsweise $<0,2$ ng/mL angegeben werden. Die entsprechenden Konzentrationen der unverdünnten Proben werden mit $>(20 \times \text{Verdünnungsfaktor})$ ng/mL beziehungsweise $<(0,2 \times \text{Verdünnungsfaktor})$ ng/mL berechnet. Falls nötig, können diese Proben in höheren oder niedrigeren Verdünnungen (je nachdem, ob die Werte ober- oder unterhalb des Messbereichs lagen) erneut analysiert werden. Die neuen Verdünnungsfaktoren sollten so gewählt werden,

dass ihre voraussichtlichen Extinktionswerte gut innerhalb des Messbereichs der Standardkurve liegen, wobei niedrigere Verdünnungen als 1/25 vermieden werden sollten.

VALIDIERUNG DER STANDARDKURVE

Die mittlere Extinktion des NGAL Rapid Standards 6 sollte $>1,5$ sein. Die mittlere Extinktion eines NGAL Rapid Standards sollte größer sein als die des vorhergehenden NGAL Rapid Standards, beispielsweise Extinktion(NGAL Rapid Standard 6) $>$ Extinktion(NGAL Rapid Standard 5). Bei Auftragung der Ergebnisse auf lineare Achsen sollte die Kurve leicht konvex nach links verlaufen.

Aus dem Rahmen fallende Punkte für einzelne Standards: Für einen oder mehrere individuelle Standards können abweichende Extinktionsmessungen auftreten. Es kann vorkommen, dass einer oder beide der Doppelwerte aus dem Rahmen fallen oder dass der Mittelwert der Duplikate aus dem Rahmen fällt. Dieser Fehler ist signifikant, wenn er die zufrieden stellende Kurvenanpassung mittels des Vier-Parameter-Modells beeinträchtigt, wodurch die Kurve sich aufgrund des abweichenden Wertes von anderen Standardpunkten entfernt, obwohl diese eigentlich korrekt sind. Die korrekte Übereinstimmung zwischen den Standardpunkten und der angepassten Kurve sollte immer überprüft werden, bevor hieraus berechnete Konzentrationen akzeptiert werden. Eine schlecht angepasste Kurve kommt auch durch eine große Summe der Abweichungsquadrate zum Ausdruck. Falls nur ein Standard betroffen ist und es sich dabei nicht um den höchsten Standard handelt, sind zwei Vorgehensweisen möglich:

i) Ein einzelner fehlerhafter Wert oder fehlerhaftes Resultat einer Doppelbestimmung sollte von der Kurve ausgeschlossen und für die übrigen Resultate mit dem Vier-Parameter-Modell eine neue Kurve erstellt werden. Wenn eine akzeptable Kurve ermittelt wurde, können mit ihrer Hilfe vorläufige Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden.

ii) Falls auf diese Weise keine akzeptable Anpassung erzielt werden kann, die Kurve

ansonsten jedoch konsistent ist, können vorläufige Resultate anhand gerader Linien oder einer einfachen Kubische-Spline-Anpassung zwischen den Mittelwerten der Duplikate unter Ausschluss des fehlerhaften Punktes bestimmt werden.

Falls zwei oder mehr Standards betroffen sind, sollte der Test wiederholt werden.

Ein abweichendes Ergebnis für einen einzelnen Standard kann durch Anwenderfehler oder durch einen verdorbenen Standard verursacht werden. Falls beide Doppelwerte in aufeinander folgenden Tests durchweg aus dem Rahmen fallen, ist der Standard fehlerhaft und sollte verworfen werden.

RÜCKVERFOLGBARKEIT DER STANDARDWERTE

Die NGAL-Konzentration von verdünntem Standardmaterial wurde vom Rigshospitalet in Kopenhagen, Dänemark, durch einen ELISA-Vergleich mit einer gereinigten Zubereitung an rekombinantem humanen NGAL quantifiziert.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Das Ergebnis eines erhöhten NGAL-Wertes im Urin, Plasma oder Serum allein kann nicht als Hinweis auf eine bestimmte Pathologie betrachtet werden. Wie in der Einführung dargelegt, gibt es verschiedene unabhängige Pathologien, die mit erhöhten NGAL-Werten im Urin oder Plasma verbunden sind. Ärzte müssen die Signifikanz eines erhöhten NGAL-Wertes im Lichte der individuellen klinischen Charakteristika eines Patienten deuten.

Die Möglichkeit, über die NGAL-Urin- und Plasmaspiegel ein vermutlich durch eine Nierenschädigung verursachtes akutes Nierenversagen zu diagnostizieren, wurde an einer Reihe von 60 aufeinander folgenden Patienten bestimmt, die in eine nicht spezialisierte Intensivstation aufgenommen wurden, und die nach anderen Kriterien auf An- oder Abwesenheit von Zeichen für Nierenversagen untersucht wurden. Viele dieser Patienten zeigten gleichzeitig eine Sepsis und einige litten an Krebs. Erhöhte maximale NGAL-Werte waren wie folgt mit akutem Nierenversagen assoziiert:

AKUTES NIERENVERSAGEN

Probe	Urin	Plasma
Grenzwert	350 ng/mL	400 ng/mL
Diagnostische Spezifität	89,3%	96,3%
Diagnostische Sensitivität	96,9%	84,8%
Positiver Prädiktivwert	91,2%	93,1%
Negativer Prädiktivwert	96,2%	83,9%

Eine NGAL-Konzentration von mehr als 350 ng/mL im Urin oder mehr als 400 ng/mL im Plasma hat seine Ursache sehr wahrscheinlich (>90%, positiver Prädiktivwert) in einer Nierenschädigung, die zu einem akuten Nierenversagen führen kann. NGAL-Konzentrationen unterhalb des Grenzwerts weisen in dieser Patientenpopulation auf keine oder nur eine geringe Nierenschädigung hin. Ein plötzlicher Anstieg der NGAL-Harnkonzentration über die vorherigen Werte des Patienten kann auf eine Nierenschädigung hinweisen, selbst wenn der Grenzwert nicht überschritten wird. In diesen Fällen wird eine genaue Überwachung der Nierenfunktion empfohlen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Laboratorien, die häufiger Tests durchführen wollen, sollten ihre eigenen hoch und niedrig messenden Kontrollsera oder -urine herstellen und in kleinen (z. B. 50 µL) Aliquots bei -70°C oder darunter lagern. Ein Aliquot der Kontrollproben sollte aufgetaut und in jedem Test mitgetestet werden, und die Ergebnisse aus einander folgenden Tests sollten aufbewahrt werden. Dies dient zur Kontrolle der Testleistung, Testintegrität und Anwenderzuverlässigkeit. Die Ergebnisse sollten auf eine Drift (Tendenz aufeinanderfolgender Ergebnisse zur Zu- oder Abnahme) oder signifikante Abweichungen vom Mittelwert

früherer Ergebnisse untersucht werden. Wenn die Werte nicht mehr als 20 % vom Mittelwert früherer Werte ab-weichen, können sie als Indiz für die Annehmbarkeit des Tests gelten. Aliquots von Kontrollsera sollten nach dem Auftauen nicht zur Mehrfachverwendung erneut eingefroren werden. Falls ein weiterer Test durchgeführt wird, sollten frische Kontrollaliquots und frische Verdünnungen von Patientenproben benutzt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Das Ergebnis eines erhöhten NGAL-Wertes im Urin, Plasma oder Serum kann allein nicht als Hinweis auf eine bestimmte Pathologie betrachtet werden. Wie in der Einführung dargelegt, gibt es verschiedene unabhängige Pathologien, die mit erhöhten NGAL-Werten im Urin oder Plasma verbunden sind. Ärzte müssen die Signifikanz eines erhöhten NGAL-Wertes im Lichte der individuellen klinischen Charakteristika eines Patienten deuten.

Die im Abschnitt Interpretation der Ergebnisse angegebenen Grenzwerte basieren auf den Maximalwerten der beschriebenen Patientenpopulation, die durch die Anwesenheit mehrerer Störfaktoren charakterisiert wurde. Andere, unter Umständen niedrigere Grenzwerte können für andere Patientengruppen mit weniger Störfaktoren geeigneter sein. Ein plötzlicher NGAL-Anstieg kann auf eine akute Nierenschädigung hinweisen, selbst wenn die Grenzwerte nicht überschritten werden.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Die durchschnittliche NGAL-Konzentration in Proben von gesunden Spendern betrug 63 ng/mL (im Bereich von 37–106 ng/mL, n = 80) in EDTA-Plasma und 5,3 ng/mL (im Bereich von 0,7–9,8 ng/mL, n = 7) in Urin. In nicht ausgewählten Intensivpatienten reichten die NGAL-Konzentrationen von 9 ng/mL bis 40.000 ng/mL (40 µg/mL) in Urin (n = 60) und von 25 ng/mL bis 3491 ng/mL in EDTA-Plasma (n = 60).

TESTEIGENSCHAFTEN

Nachweisgrenze: Die niedrigste NGAL-Konzentration, deren Absorptionsmesswert mehr als 2 SD über dem mittleren Nullwert (NGAL Rapid Kalibrator

1) lag ($n = 8$) wurde als 0,008 ng/ml definiert und somit tiefer als der Wert des NGAL Rapid Kalibrators 2 festgelegt.

Genauigkeit: Die Intraassay-Variation wurde durch NGAL-Messung in 2 Urin- und 2 Plasmaproben mit 8 Messungen innerhalb eines Kits bestimmt. Dies ergab folgende Ergebnisse (VK = Variationskoeffizient):

Proben	VK Median
Urin A	3,4%
Urin B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

Die Interassay-Variation wurde durch NGAL-Messung in 2 verdünnten Urin- und 2 verdünnten EDTA-Plasmaproben mit je 2 Messungen innerhalb eines Kits und in vier unabhängigen Tests bestimmt. Dies ergab folgende Ergebnisse:

Proben	VK Median
Urin A	4,7%
Urin B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Wiederfindungsrate: Urin- und Plasmaproben wurden mit rekombinantem humanen NGAL versetzt und mit dem Test analysiert. Die Wiederfindungsrate wurde mit (Gemessen/Erwartet) berechnet und als Prozentanteil wiedergegeben.

Probe	Gemessen (Bereich)	Erwartet (Bereich)	Wiederfindungsrate (Bereich)
Urin	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83-90%

Linearität: NGAL wurde in seriellen Verdünnungen ($n = 8$) von je 2 Urin- und 2 Plasmaproben bestimmt. Der VK des Mittelwerts der gemessenen Werte betrug nach Korrektur um die Verdünnung 9,9% und 12,5% für die beiden Urinproben sowie 12,2% und 7,4% für die beiden Plasmaproben, was eine zufriedenstellende Linearität darstellt.

Probenmaterial: Analysen von Serum-, EDTA-Plasma- oder Urinproben zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wiederfindungsrate, Linearität oder Genauigkeit. NGAL-Konzentrationen im Serum sind jedoch oftmals geringfügig höher als im Plasma²³, wahrscheinlich weil NGAL bei der Blutgerinnung von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird.

Spezifität: Für die beiden in diesem Test verwendeten monoklonalen Antikörper gegen humanes NGAL wurde gezeigt, dass sie an verschiedene Präparationen von rekombinantem humanen NGAL binden und in Western Blots eines reduzierten postnuklearen Zellkulturüberstands humaner neutro-philier Granulozyten eine einzelne Bande bei 25 kDa ergeben²⁵.

HAFTUNG

Zur In-vitro-Diagnose in ausgewählten Ländern. Für Erhältlichkeit in Ihrem Land siehe www.bioporto.com.

Dieser Kit ist einzig zur *In-vitro*-Bestimmung von NGAL in humanem Urin, Serum oder EDTA-Plasma vorgesehen.

Der Kit ist nur für die Anwendung durch qualifiziertes Personal, welches Forschungs- oder Diagnosetätigkeiten ausführt, vorgesehen.

Falls der Empfänger dieses Kits dieses in irgend einer Weise an Dritte weitergibt muss diese Anleitung beigefügt sein, und der Drittempfänger stellt auf eigenes Risiko BioPorto Diagnostics A/S von allen Haftungsansprüchen frei.

BioPorto Diagnostics A/S soll in keiner Weise anders als ausdrücklich in diesen Instruktionen angegeben für jedwede Schäden oder Verluste aufgrund der Nutzung dieses Kits verantwortlich gemacht werden.

Die Haftung von BioPorto Diagnostics A/S übersteigt unter keinen Umständen den kommerziellen Wert des Kits.

BioPorto Diagnostics A/S ist unter keinen Umständen für indirekte, konkrete oder Folgeschäden, insbesondere für entgangenen Gewinn, verantwortlich zu machen.

Révision: NR2010-05-EN-FR

Veillez lire attentivement les instructions d'emploi

UTILISATION PRÉVUE

Pour la détermination *in vitro* de la NGAL humaine dans l'urine, le plasma ou le sérum comme indicateur de lésion rénale pouvant provoquer une insuffisance rénale aiguë.

INTRODUCTION

La NGAL¹ (lipocaline associée à la gélatinase de neutrophile) a été découverte en 1989¹ et, comme son nom l'indique, appartient à la famille des protéines de type lipocaline. Il s'agit de petites protéines sécrétées, capables de capter de petites molécules hydrophobes à l'intérieur d'une poche structurellement conservée, formée de feuillets β antiparallèles, qui peut capter des récepteurs spécifiques qui se trouvent sur la surface des cellules, afin de former des complexes macromoléculaires. La NGAL a été entièrement caractérisée et nommée en 1993², mais elle est aussi connue sous nombreux synonymes comme NL (neutrophile lipocaline; HNL: NL humaine)³, lipocaline 2, protéine oncogène 24p3⁴ ou uterocaline⁵ (chez la souris) et lipocaline associée au *neu*⁶ ou 25-kDa protéine semblable à la microglobuline α_2 (chez le rat)⁷. La NGAL humaine se compose d'une chaîne polypeptidique simple avec un pont disulfure, formée de 178 résidus d'acides aminés; sa masse moléculaire est calculée à 22 kDa², mais la glycosylation fait que sa masse apparente moléculaire est poussée à 25 kDa. Dans les neutrophiles (leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles) elle se présente sous formes monomériques et dimériques, avec un faible pourcentage de formes trimériques. On la trouve aussi en complexe avec la collagénase humaine de 92 kDa de type IV (la gélatinase B ou la métalloprotéase-9 de matrice, MMP-9)⁸.

A l'origine, NGAL était isolée du surnageant de neutrophiles¹ humains activés, mais elle se trouve également à un taux basal dans d'autres tissus humains, incluant ceux des reins, de la prostate et de l'épithélium des voies^{9,10} respiratoires et alimentaires. La NGAL se trouve aussi en concentration

importante dans les adénomes et dans l'épithélium intestinal enflammé, dans les adénocarcinomes du sein¹² et dans les carcinomes urothéliaux¹³.

A cause de sa petite taille moléculaire et sa résistance à la dégradation, la NGAL est excrétée et facilement détectée dans les urines, sous sa forme libre, ainsi que sous sa forme complexe avec MMP-9. Les concentrations urinaires sont en corrélation avec les taux plasmatiques quelle que soit la cause de l'augmentation de la production de NGAL¹⁴. Cependant on peut s'attendre à des concentrations particulièrement élevées dans les urines lorsque la NGAL est libérée directement dans l'urine par les tubules rénaux ou les carcinomes urothéliaux. Le taux de complexes NGAL-MMP-9, qui proviennent de sources éloignées par rapport à la voie urinaire et qui sont sécrétés tels quels dans les urines ou bien qui sont reconstitués dans les urines après une sécrétion indépendante de NGAL et de MMP-9, reste indéfini⁸.

Tandis que les fonctions de la NGAL ne sont pas complètement cernées, elle paraît se trouver en régulation positive dans les cellules «stress» par exemple à cause d'infection, d'inflammation, de transformation néoplasique, ou bien dans le cas de tissus en involution, comme par exemple l'involution utérine post-partum des souris ou l'involution mammaire dans le sevrage⁵. En ce qui concerne un rôle antibactérien possible, elle capte l'enterobactine et d'autres sidérophores, privant ainsi les microorganismes de Fe³⁺, qui constitue un besoin nutritif¹⁵ important. Sa formation de complexes avec la MMP-9, semble protéger l'activité enzymatique contre la dégradation⁸. La régulation positive de la NGAL dans les tissus involutifs nous permet d'émettre une hypothèse sur un rôle dans l'apoptose. Cependant il paraît plus probable que la NGAL est associée à des réponses de survie¹⁶.

NGAL et le rein. Dès 1989, la NGAL (24p3) a été trouvée suite à son expression par les cellules de rein de souris, entraînant sa sur-régulation spectaculaire rapide (14- à 20-fois) en réponse à l'infection virale SV40¹⁷. Une sur-régulation rapide et spectaculaire similaire a été observée plus tard dans d'autres types de lésions rénales. Une élévation des

taux plasmatiques de NGAL s'est avérée fortement corrélée à une diminution de la fonction rénale chez les patients présentant une atteinte rénale due à la vascularite¹⁸. La concentration urinaire de NGAL sert de marqueur précoce des lésions rénales aiguës après un pontage cardio-pulmonaire^{19,20}. Les deux niveaux de NGAL, urinaires et plasmatiques, fournissent une indication précoce de lésion rénale aiguë chez des patients non sélectionnés en soins intensifs²¹. Des niveaux urinaires et plasmatiques élevés de NGAL ont également été observés chez des patients souffrant de maladies rénales chroniques²². Chez les patients avec des greffons rénaux actifs, le taux de NGAL dans les urines est élevé (le diagnostic a été effectué par Western-blot)¹³. Donc, il est évident qu'une grande variété de désordres rénaux est associée à des taux élevés en NGAL dans le plasma et les urines. Bien que les niveaux plasmatiques et urinaires de NGAL soient étroitement corrélés dans des conditions aiguës, il faut s'attendre à ce que les niveaux urinaires de NGAL soient particulièrement élevés après une lésion suffisamment grave des reins pour entraîner une insuffisance rénale aiguë. Cependant, l'usage de la NGAL urinaire comme indicateur de ces conditions est sujet à la stipulation que les autres conditions concourantes associées indépendamment à des taux élevés en NGAL doivent être prises en considération.

NGAL et les inflammations/infections. La NGAL est libérée par des granules spécifiques des neutrophiles^{1,2}. Sa concentration sérique s'élève dans des conditions inflammatoires ou infectieuses, en particulier dans des infections bactériennes²³. Le taux de NGAL dans le sérum a donc été proposé comme marqueur d'infection bactérienne. Cependant, les niveaux de NGAL peuvent être élevés en cas de maladies néoplasiques, et dans les troubles rénaux, indépendamment de tout processus infectieux. Pour cette raison, l'application proposée ici doit être traitée avec précaution. La NGAL peut se trouver en taux élevés chez les patients qui présentent une absence de neutrophiles à cause de leucémie, ou de leucémie en cours de traitement, ce qui prouve que la cause des taux

élevés de NGAL dans un contexte infectieux n'est pas exclusivement liée aux neutrophiles.

NGAL et néoplasie. Les différents types de cancer où la NGAL pourrait se réguler positivement (souvent en conjonction avec MMP-9) ont été mentionnés plus haut. Ce fait s'est manifesté par une présence importante de NGAL dans les cellules tumorales, et par des niveaux urinaires élevés, sous sa forme libre et sous sa forme complexe avec MMP-9⁸. Il a été suggéré que la présence de complexes NGAL-MMP-9 dans les urines, peut servir d'indication de l'évolution de la maladie chez les patients souffrant de cancer du sein²⁴. Les niveaux dans le plasma n'ont pas été habituellement mesurés dans ces cas.

PRINCIPES DU PROCESSUS D'ESSAI

Il s'agit d'un essai ELISA qui a lieu dans des micropuits coâtés d'un anticorps monoclonal contre la NGAL humaine. La NGAL qui est unie au premier anticorps est détectée par la union d'un autre anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort (HRP); l'essai est développé par incubation avec un substrat formant la couleur qui donne le résultat. L'essai est effectué rapidement en deux étapes:

Etape 1. Des agents d'étalonnage aliquotés, des échantillons dilués et de contrôle sont incubés avec des anticorps de détection conjugués à HRP à l'intérieur des micropuits coâtés. Seule la NGAL peut se lier à l'anticorps de revêtement et à l'anticorps de détection, tandis que tout matériel non capté est éliminé par lavage.

Etape 2. Un substrat chromogène de peroxydase contenant de la tétraméthylbenzidine (TBM) est ajouté à chaque puits de test. La HRP liée à l'anticorps de détection réagit avec le substrat pour créer un produit coloré. La réaction enzymatique est arrêtée chimiquement, et l'intensité de la coloration est mesurée à 450 nm par un lecteur ELISA (spectrophotomètre). L'intensité de la coloration (absorbance) est fonction de la concentration en NGAL ajoutée initialement dans chaque puits. Les résultats des étalonnages sont utilisés pour établir une courbe d'étalonnage permettant de lire la

concentration en NGAL dans les échantillons testés.

COMPOSANTS DE LA TROUSSE

Article	Composants	Quantité
①	12 x 8 micropuits enduits + Cadre	96 puits
②	Concentré de Diluant d'Échantillon 5x	1 x 60 mL
③-③'	Étalonnage NGAL Rapid 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	Solution de lavage Concentrée 25x	1 x 30 mL
⑤	Anticorps NGAL conjugué à HRP	1 x 6 mL
⑥	Substrat TMB	1 x 12 mL
⑦	Solution d'arrêt	1 x 16 mL
⑧	Plaque à micropuits en U de polypropylène	96 puits

Note: Les réactifs liquides contiennent des conservateurs de thimerosal ou du Bronidox L. Leur ingestion peut avoir des effets nocifs.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS

1. Micropipettes réglables de 1-1000 µL et embouts jetables correspondants.
2. Tubes de polypropylène de capacité de 1000 µL.
3. Râteliers à tubes
4. Micropipette réglable à 8 ou 12 canaux (de 50 à 250 µL) ou micropipette à répétition (facultatif).
5. Éprouvettes graduées de 1 L et de 500 mL, propres
6. Eau déionisée ou distillée
7. Couvercle de microplaque
8. Réservoir propre pour la Solution de lavage diluée
9. Appareil de remplissage des puits pendant le processus de lavage (facultatif)
10. Papier absorbant ou essuie-tout non pelucheux
11. Récipients jetables des réactifs
12. Minuterie (60 minutes)

13. Lecteur calibré des microplaques ELISA, capable de lire à 450 nm (de préférence en retranchant les valeurs de référence à 650 ou à 620 nm)
14. Hypochlorite de sodium (solution à 1:10 d'eau de Javel) pour décontaminer les échantillons, les réactifs et tous matériaux

PRÉCAUTIONS

Uniquement pour usage diagnostic *in vitro*

1. Ce kit réactif diagnostique doit être utilisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié.
2. Utiliser des embouts de pipettes différents pour chaque échantillon, pour chaque agent d'étalonnage et pour chaque réactif afin d'éviter toute contamination croisée.
3. Utiliser des récipients séparés pour chaque réactif. Cela s'applique en particulier au Substrat TMB.
4. Après usage, décontaminer tous échantillons, réactifs et matériaux en les laissant tremper dans une solution d'hypochlorite de sodium (solution à 1:10 d'eau de Javel).
5. Pour éviter les gouttelettes pendant le lavage, aspirer la solution de lavage directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
6. Éviter le rejet dans l'environnement. Disposer des récipients et du contenu non utilisés selon les règles de sécurité et conformément à la législation nationale et aux règlements locaux.
7. La Solution d'arrêt contient 0,5 mol/L d'acide sulfurique et peut causer l'irritation ou des brûlures de la peau et des yeux. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin.
8. Ne pas interchanger les composants provenant des trousse de lots différents. Les composants ont été l'objet de standardisation homogène pour chaque série.
9. Les échantillons hémolysés, hyperlipidémiques, ayant subi un traitement thermique ou qui ont été contaminés, peuvent entraîner des résultats erronés.
10. Éviter de diluer des échantillons cliniques

directement dans les micropuits coatés.

11. Ne pas râcler ou toucher le fond des micropuits coatés lors du pipetage ou de l'élimination de liquide par aspiration.
12. Le non-respect des durées et températures d'incubation indiquées dans le processus peut provoquer des résultats erronés.
13. Ne pas laisser sécher les micropuits une fois que l'essai est commencé.
14. Le Substrat TMB est sensible à la lumière. Conserver à l'abri de la lumière intense.
15. Ne pas réutiliser les micropuits ou reverser les réactifs dans leurs flacons après usage.

STABILITÉ ET STOCKAGE

1. Conserver la trousse avec tous les réactifs entre 2° et 8°C. Ne pas congeler.
2. Utiliser tous les réactifs avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.
3. La Solution de lavage diluée demeure stable pendant 4 semaines à une température de 2° à 8°C. Si tous les puits ne sont pas utilisés, diluez seulement la quantité de Solution Bain Concentrée requise.
4. La Solution diluée du Concentré de Diluant d'Échantillon demeure stable pendant 24 heures à une température de 2° à 8°C. Si tous les puits ne sont utilisés, diluez seulement la quantité de Solution du Concentré de Diluant d'Échantillon requise.
5. Pour tout usage ultérieur, placer les puits inutilisés dans la pochette d'aluminium refermable avec un dessiccant. Avant utilisation, toujours laisser la pochette d'aluminium revenir à la température ambiante avant de l'ouvrir afin d'éviter la condensation sur ou dans les micropuits coatés.

COLLECTION DES ÉCHANTILLONS

Manipuler et disposer de tous spécimens dérivés du sang et des urines comme s'ils étaient infectieux. Voir Précautions, parties 2, 4 et 5.

Pour mesurer la NGAL dans un seul échantillon, 10 µL d'urine, de plasma ou de sérum sont nécessaires. Les échantillons sanguins doivent être prélevés

aseptiquement dans des tubes EDTA ou tubes lisses par un personnel qualifié utilisant des techniques des ponction veineuse approuvées. Le plasma ou le sérum doit être préparé conformément aux techniques standards pour les tests en laboratoire clinique. Les échantillons urinaires doivent être centrifugés. Les échantillons cliniques préparés doivent ensuite être recouverts. Dans le cas où l'essai ne peut pas avoir lieu dans les 24 heures qui suivent le prélèvement, ou si les échantillons doivent être transportés, congeler les spécimens à -20°C minimum. Pour une conservation longue des échantillons cliniques, ils doivent être congelés de préférence à -70°C minimum. Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Ne pas utiliser les échantillons hémolysés, hyperlipidémiques, ayant subi un traitement thermique ou ayant été contaminés.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. Laisser les échantillons et les réactifs revenir à la température ambiante (20-25°C). Mélanger les spécimens par inversion lente et si nécessaire éliminer toute matière particulaire visible par centrifuge à basse vitesse.
2. Déterminer le nombre d'échantillons pour le dépiçage (en double), plus le nombre d'échantillons de contrôle, spécifiques au laboratoire (en double), plus le nombre de puits inactivés. Les puits coatés peuvent être utilisés en bandelettes de 8 ou en puits individuels. Pour les utiliser en puits individuels, il faut les séparer et les placer dans le cadre à l'emplacement approprié. Les lettres et les encoches dont les puits sont dotés permettent d'identifier les puits individuels. Ajouter 12 puits pour les 6 agents d'étalonnage (en double). Enlever les micropuits nécessaires, et replacer les produits inutilisés dans la pochette d'aluminium rescellable avec dessiccant à la température de conservation de 2° à 8°C.
3. Solution de lavage: Diluer la solution concentrée 25x en versant tout le contenu du flacon (30 mL) dans une éprouvette graduée d'1 L et ensuite ajouter de l'eau distillée ou déionisée jusqu'à

obtenir 750 mL de produit. Bien mélanger et conserver entre 2° et 8°C après usage. Au cas où la totalité des puits n'est pas nécessaire, diluer le volume requis du Concentré de Solution de lavage par 24 volumes d'eau afin d'obtenir un produit de dilution à 1/25.

4. Diluant d'Échantillon: Diluer la solution Concentrée de Diluant d'Échantillon x 5 (une teinte rouge aide le pipetage) en versant tout le contenu du flacon (60 mL) dans une éprouvette graduée de 500 L et ajouter de l'eau distillée ou désionisée jusqu'à obtenir 300 mL de produit. Bien mélanger et conserver à 2-8°C après usage. Au cas où la totalité des puits n'est pas nécessaire, diluer le volume requis du concentré de solution de Diluant d'Échantillon par 4 volumes d'eau afin d'obtenir un produit de dilution à 1/5.
5. Agents d'étalonnage NGAL Rapid (une teinte rouge aide le pipetage): Les concentrations exactes sont indiquées sur l'étiquette de chaque flacon. Ne pas diluer davantage.
6. Anticorps NGAL conjugué à de la HPR (prêt à l'emploi): Ne pas diluer davantage.
7. Substrat TMB (prêt à l'emploi): Ne pas diluer davantage.
8. Solution d'arrêt (prêt à l'emploi): Ne pas diluer davantage.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

La plage de la courbe standard est de 0,2 ng/mL à 20 ng/mL, et la plage pertinente de diagnostic est de 100 à 500 ng/mL pour le plasma ou le sérum et de 50 à 500 ng/mL pour l'urine (voir Interprétation des Résultats). Une dilution initiale de criblage de 1/100 pour le plasma ou le sérum et de 1/50 pour l'urine est conseillée. La dilution à 1/100 peut se préparer en diluant 10 µL de plasma ou de sérum pour une quantité de 990 µL de Diluant d'Échantillon, et la dilution à 1/50 peut se préparer en diluant 10 µL d'urine pour 490 µL de Diluant d'Échantillon. Pour effectuer les dilutions, inverser les flacons ou créer une petite vortex. Une répétition de l'essai pour les échantillons excédant les paramètres de dilution inférieurs et supérieurs sera nécessaire.

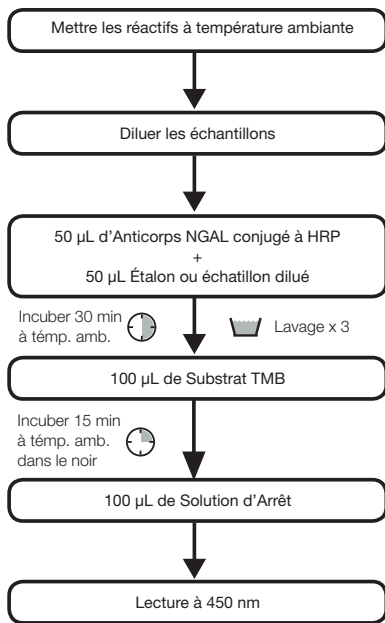
Les dilutions inférieures à 1/25 ne doivent pas être utilisées.

PROCESSUS D'ESSAI

1. Préparer le protocole d'essai, annotant l'emplacement des micropuits correspondants aux étalons, aux échantillons dilués des patients et à tous les contrôles de laboratoire en double. Si la longueur d'onde de référence de 650 à 620 nm n'est pas disponible sur le lecteur ELISA, un puits blanc de réactifs peut être désigné. Cela est établi en ajoutant 50 µL du Diluant d'Échantillon à la place de l'échantillon dilué, et la solution est traitée pareillement aux autres.
2. Diluer les échantillons selon les concentrations attendues en NGAL (1/100 pour le plasma ou le sérum et 1/50 pour l'urine conviendra pour la plupart des échantillons).
3. Pipeter un volume suffisant de chaque étalon, chaque échantillon dilué et tout contrôle de laboratoire dans les puits annotés de la plaque à micropuits en U, afin de permettre un transfert subséquent de 50 µL de volume dans les micropuits enduits correspondants.
4. Pipeter 50 µL de volume d'anticorps NGAL conjugué à HPR aux emplacements correspondants à l'intérieur des micropuits coâtés. Ensuite à l'aide d'une pipette multicanaux transférer rapidement 50 µL de volume de solution étalon, les échantillons dilués et les contrôles internes des micropuits en U aux micropuits coâtés correspondants contenant l'anticorps utilisé pour la détection. Cette méthode d'addition d'échantillons est recommandée afin de réduire la différence de temps d'incubation entre le premier et le dernier échantillon ajouté aux micropuits coâtés.
5. Couvrir les puits et incuber pendant **30 minutes** à température ambiante sur un agitateur de microplaques à 200/minute.
6. Aspirer le contenu des micropuits et laver chaque puits trois fois avec au moins 300 µL de Solution de lavage diluée. Si le lavage est fait manuellement, vider les puits dans un récipient approprié en les renversant et en secouant

légèrement, puis les essuyer inversés sur du papier absorbant. Il est conseillé d'attendre 1 minute avant de vider les puits, avant le dernier lavage prévu du cycle. La vigueur avec laquelle la solution de lavage est versée dans les puits ou en est vidée influence le développement de la couleur finale. Le pipetage manuel, qui peut se faire délicatement et aboutir à un développement élevé de couleur, est conseillé seulement s'il n'y a pas d'autres alternatives, comme est le remplissage des puits par immersion, l'utilisation d'un distributeur multicanaux, ou l'utilisation d'un appareil de lavage automatique.

7. Remplir 100 μ L de Substrat TMB (prêt à l'emploi) dans chaque micropuits. L'usage d'une micropipette multicanaux est recommandé dans le but de réduire le temps nécessaire au pipetage. Couvrir les puits et laisser incuber pour **exactement 15 minutes** à température ambiante dans l'obscurité. Commencer la minuterie au moment où le premier puits est rempli.
8. Ajouter 100 μ L de solution d'arrêt (prêt à l'emploi) dans chaque puits, en maintenant la même séquence de pipetage et le même taux qu'à l'étape 7. Mélanger délicatement pendant 20 secondes, éviter les projections. Effectuer la lecture des puits dans les 30 minutes qui suivent.
9. Lire les absorbances des puits à 450 nm sur un lecteur de microplaque approprié (la longueur d'onde de référence est de 650 à 620 nm). Si aucune référence pour la longueur d'onde n'est disponible, la valeur des puits de réactifs vides est soustraite aux autres valeurs avant d'effectuer d'autres calculs.

SCHÉMA DU PROCESSUS D'ESSAI

CALCUL DES RÉSULTATS

Pour le calcul des résultats, il est nécessaire d'utiliser la valeur exacte de chaque étalonnage qui se trouve imprimée sur l'étiquette de chaque fiole et sur les certificats QC.

Le principe de base est d'établir une courbe d'étalonnage en relevant la valeur moyenne d'absorbance pour chaque étalon NGAL Rapid sur l'axe des ordonnées (y) par rapport aux concentrations de NGAL correspondantes en ng/mL sur l'axe des abscisses (x).

La courbe d'étalonnage doit répondre aux conditions de validation.

La concentration de chaque échantillon dilué est ensuite déterminée par interpolation de la valeur moyenne d'absorbance pour l'échantillon dilué, avec la concentration en ng/mL sur l'axe des abscisses. La concentration en NGAL dans l'échantillon non dilué est calculée en multipliant ce résultat par le facteur de dilution étalon.

Ce processus peut être exécuté à la main à l'aide de papier millimétré, avec les axes des ordonnées et des abscisses. Une courbe continue peut être tracée en joignant les points, ou les points adjacents peuvent être joints par lignes droites. Ce processus peut surestimer les valeurs de concentration entre des points différents quand la courbe est légèrement convexe vers la gauche, ce qui est une constatation typique. Bien que la courbe puisse approcher une ligne droite, il est pratiquement et théoriquement incorrect de calculer et de tracer une ligne droite afin d'en lire les résultats.

Le même processus peut s'effectuer par un logiciel de lecture incorporant le processus nécessaire pour tracer la courbe. Le processus préféré est l'utilisation des axes linéaires x et y avec un ajustement logistique de courbe en 4 paramètres. Les échantillons dilués présentant une absorbance moyenne supérieure à celle de l'agent d'Etalonnage NGAL Rapid 6 ou inférieure à celle de l'agent d'Etalonnage NGAL Rapid 2, donnent des résultats qui se trouvent hors des paramètres de l'essai et doivent être relevés comme >20 ng/mL et <0,2 ng/mL, respectivement. Les concentrations correspondantes des échantillons sans dilution sont calculées >(20 x facteur de dilution) ng/mL et <(0,2 x facteur de dilution) ng/mL respectivement. Si nécessaire, ces échantillons peuvent être réessayés en dilutions supérieures ou inférieures, respectivement. Les nouveaux facteurs de dilution, devraient être ceux qui sont estimés comme ayant la possibilité de produire des valeurs d'absorbance qui tombent bien entre les limites de la courbe d'étalonnage, mais sans utiliser de dilutions inférieures à 1/25.

VALIDATION DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

L'absorbance moyenne pour l'agent d'étalonnage NGAL Rapid 6 devrait être $>1,5$. L'absorbance moyenne pour tout agent d'étalonnage NGAL Rapid devrait être supérieure à celle de l'agent NGAL précédent, par ex. absorbance(étalonnage NGAL Rapid 6) $>$ absorbance(étalonnage NGAL Rapid 5). La courbe devrait être légèrement convexe vers la gauche lorsque les résultats sont tracés sur des axes linéaires.

Ecart des étalons individuels: Un ou plusieurs étalons peuvent présenter des résultats d'absorbance anormaux. Une ou les deux valeurs en double peuvent être hors-ligne, ou bien la valeur moyenne des doubles peut se trouver hors-ligne. Cette erreur est importante si elle empêche l'ajustement satisfaisant de la courbe par la méthode logistique à 4 paramètres, qui à cause des valeurs anormales, se trouve déplacée par rapport aux autres points étalon qui sont en fait corrects. Les points étalons et la courbe ajustée doivent toujours être examinés pour vérifier que la courbe soit tracée de façon exacte, avant d'accepter les calculs de concentration basés sur la courbe. Une courbe mal ajustée pourrait être le résultat d'une somme élevée de carrés résiduels. Si le problème affecte un étalon seulement, qui n'est pas l'étalon aux valeurs les plus élevées, il y a deux possibilités d'action:

i) Un résultat erroné de la valeur simple ou en double, devrait être éliminé de la courbe et les résultats restants doivent être réajustés par le processus logistique à 4 paramètres. Si un ajustement satisfaisant est obtenu, des résultats provisionnels de concentration peuvent en être calculés.

ii) Si l'ajustement de la courbe ainsi obtenue n'est pas satisfaisant, mais la courbe semble toutefois cohérente, des résultats provisionnels peuvent être obtenus par lignes droites ou par un ajustement par la fonction "Cubic Spline" entre les valeurs moyennes des doubles, en omettant le point erroné.

Si plusieurs étalons sont affectés, l'essai doit se répéter.

Un résultat anormal pour un seul étalon peut

être dû à une erreur opérationnelle ou à la détérioration de l'étalon. Dans le cas où les valeurs en double sont hors-ligne lors d'essais successifs, l'étalon est défectueux et doit être exclu.

TRAÇABILITÉ DE LA VALEUR DE L'AGENT D'ÉTALONNAGE

La concentration en NGAL de l'agent d'étalonnage dilué est désignée, à partir d'une comparaison en 'ELISA avec une préparation de NGAL humaine purifiée, quantifiée par Rigshospitalet, Copenhague, Danemark.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le dépistage des niveaux élevés de NGAL dans les urines, le plasma et le sérum, ne peut pas représenter un diagnostic indépendant d'une seule pathologie. Comme il a été déjà mentionné à l'introduction, ces résultats doivent être interprétés en corrélation avec les différents problèmes pathologiques associés aux niveaux élevés en NGAL dans les urines ou le plasma. Les médecins doivent interpréter la signification d'un niveau de NGAL élevé selon les renseignements cliniques concernant le patient.

La possibilité du dépistage de l'insuffisance rénale aigue pouvant provenir d'une lésion rénale grave, par l'observation des niveaux de la NGAL dans les urines et le plasma, a été déterminée par l'examen de 60 patients successifs qui avaient été admis dans une unité de soins intensifs non spécialisée, et classés selon d'autres critères comme présentant ou non des signes d'insuffisance rénale. Plusieurs patients souffraient de sepsis concourants et certains souffraient de cancer. Des taux maximum élevés de NGAL ont été associés avec une insuffisance rénale aigue comme suit:

INSUFFISANCE RÉNALE AIGÜE

Echantillon	Urines	Plasma
Valeur de seuil	350 ng/mL	400 ng/mL
Spécificité diagnostique	89,3%	96,3%
Sensibilité diagnostique	96,9%	84,8%
Valeur prédictive positive	91,2%	93,1%
Valeur prédictive négative	96,2%	83,9%

Une concentration en NGAL dans les urines dépassant 350 ng/mL, ou une concentration de 400 ng/mL dans le plasma, est probablement (valeur prédictive positive de >90%) due à une lésion rénale pouvant mener à une insuffisance rénale aiguë. Les concentrations en NGAL au dessous de la valeur seuil peuvent indiquer soit une absence de lésion rénale soit une lésion rénale légère. Une augmentation soudaine de la concentration urinaire en NGAL, par rapport aux valeurs précédentes observées chez le patient, peuvent révéler une lésion rénale, même si la valeur seuil n'est pas dépassée, et il est vivement conseillé de surveiller de près la fonction rénale.

CONTROLE DE QUALITÉ

Les laboratoires qui ont l'intention d'exécuter des essais répétitifs devraient établir leurs propres références de contrôle de limite supérieure et inférieure de plasma ou d'urine, qui doivent être conservés en petites doses aliquotés (par ex. 50 µL) à -70°C minimum. Chaque échantillon doit être décongelé et testé à chaque essai et un rapport des résultats successifs doit être maintenu. Cette pratique assure le contrôle de performance, le contrôle de l'intégrité des résultats et le contrôle de la fiabilité de l'opérateur. Les résultats devraient être examinés pour des dérives (tendance à l'augmen-

tation ou à la chute de résultats successifs) ou des déviations importantes des valeurs moyennes par rapport à des résultats antérieurs. Les valeurs qui ne présentent pas une déviation plus importante de 20% de la moyenne des résultats antérieurs pourraient indiquer les limites d'acceptabilité de l'essai. Les échantillons de sérum de contrôle ne devraient pas être recongelés pour des essais répétés. Il est préférable d'utiliser des échantillons de contrôle et des dilutions fraîches de spécimens des patients.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le dépistage des niveaux élevés de NGAL dans les urines, le plasma et le sérum, ne peuvent pas représenter un diagnostic indépendant d'une seule pathologie. Comme il a été déjà mentionné à l'introduction ces résultats doivent être interprétés en corrélation avec les différents problèmes pathologiques associés avec des niveaux élevés de NGAL dans les urines ou le plasma. Les docteurs doivent interpréter la signification d'un niveau NGAL élevé selon les renseignements cliniques concernant le patient.

Les valeurs seuil données lors de l'interprétation des Résultats sont fondées sur les valeurs maximales pour la population de patients décrite, qui est caractérisée par la présence des multiples facteurs confondus. D'autres valeurs seuil, quelques fois inférieures, peuvent convenir à un groupe de patients différent, qui présente moins de facteurs divers et confondus. Une augmentation soudaine du taux de NGAL peut indiquer une lésion rénale grave, même si le taux observé ne dépasse pas les valeurs seuil.

RÉSULTATS ATTENDUS

La concentration moyenne de NGAL dans les échantillons en provenance des donneurs sains était de 63 ng/mL (amplitude de 37 à 106 ng/mL, n = 80), dans le plasma EDTA et de 5,3 ng/mL (amplitude de 0,7 à 9,8 ng/mL, n = 7) dans les urines. Pour les patients non sélectionnés mais admis à l'unité de soins intensifs, la concentration de NGAL dans les

urines variait de 9 ng/mL à 40.000 ng/mL (40 µg/mL) dans les urines (n = 60) et de 25 ng/mL à 3491 ng/mL dans le plasma EDTA (n = 60).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de la détection: La plus faible concentration de NGAL donnant une absorbance supérieure à 2 SD au-dessus de la moyenne de zéro (NGAL Calibreur Rapide 1) une lecture (n = 8) a été établie à 0,008 ng/mL, ce qui est inférieur à la valeur de la NGAL Calibreur Rapide 2.

Précision: La variation intra-essai a été calculée à partir de la mesure en NGAL d'échantillons d'urines et de plasma sur 2 échantillons d'urine et 2 échantillons de plasma répliqués en 8 exemplaires. Les résultats suivants ont été obtenus (CV = coefficient de variation):

Échantillons	CV
Urine A	3,4%
Urine B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

La variation intra-essai a été calculée à partir de la mesure en NGAL d'échantillons d'urines et de plasma sur 2 échantillons d'urine et 2 échantillons de plasma EDTA répliqués sur 4 essais différents. Les résultats suivants ont été obtenus:

Échantillons	CV
Urine A	4,7%
Urine B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Test de récupération: Des échantillons de plasma et d'urine ont été mélangés à un recombiné de NGAL humaine, et ensuite analysés en essai. La récupération a été calculée à partir des valeurs (Mesurées/Attendues) exprimées en pourcentage.

Échantillon	Mesuré (amplitude)	Attendues (amplitude)	Récupération (amplitude)
Urine	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83-90%

Linéarité des résultats: La NGAL a été calculée à partir de dilutions successives (n=8) de 2 échantillons d'urines et 2 de plasma. Le CV de la valeur moyenne calculée, corrigée pour la dilution était de 9,9% ou 12,5% pour les 2 échantillons d'urine et de 12,2% ou 7,4% pour les 2 échantillons du plasma, faisant preuve d'une linéarité satisfaisante des résultats.

Échantillonnage: L'analyse des échantillons de sérum, de plasma EDTA ou de l'urine n'a pas démontré des différences importantes au niveau de la récupération, de la linéarité ou de la précision des résultats. Cependant les concentrations en NGAL sont souvent légèrement plus élevés dans le sérum que dans le plasma, probablement à cause de la libération de NGAL de neutrophiles au cours de la coagulation du sang²³.

Spécificité: Les deux anticorps monoclonaux utilisés contre la NGAL humaine dans l'essai ont prouvé leur capacité de capter les différentes formes de NGAL humaine recombinée, en donnant une seule chaîne à 25 kDa dans l'analyse de Western blot du surnageant postnucléic provenant des neutrophiles humaines²³.

RESPONSABILITÉ

Pour le diagnostic *in vitro* seulement dans certains pays. Voir www.bioporto.com pour trouver s'il est disponible dans votre pays.

Cette trousse est uniquement destinée à la détermination *in vitro* de la NGAL dans le urine, sérum ou le plasma EDTA humain.

La trousse est uniquement destinée à être utilisée par un personnel qualifié impliqué dans les activités de recherche ou de diagnostic.

Si le propriétaire de cette trousse la prête, de n'importe quelle façon, à un tiers, cette instruction doit être incluse et ledit propriétaire doit, à ses propres risques, assurer en faveur de BioPorto Diagnostics A/S toutes les limitations et responsabilités décrites ici.

BioPorto Diagnostics A/S ne sera pas responsable des dommages ou pertes pouvant être occasionnés par l'utilisation de cette trousse d'une autre façon que celle indiquée dans ces instructions.

La responsabilité de BioPorto Diagnostics A/S n'excèdera en aucun cas la valeur marchande de cette trousse.

BioPorto Diagnostics A/S ne sera en aucun cas responsable de dommages indirects ou spéciaux, incluant sans s'y limiter la perte de profit.

Revisione: NR2010-05-EN-IT**Leggere attentamente le istruzioni****DESTINAZIONE D'USO**

Per la determinazione *in vitro* di NGAL umano nelle urine, nel plasma o nel siero come marcatore di una malattia renale acuta che può portare alla insufficienza renale.

INTRODUZIONE

NGAL (Lipocalina Neutrofila Gelatinase-Associata) è stata scoperta nel 1989¹ e, come implica il nome, appartiene alla famiglia delle proteine lipocaline. Di norma queste sono piccole proteine secrete caratterizzate dalla loro capacità di legare piccole molecole idrofobiche in una tasca strutturalmente conservata formata da un foglio β -piegheggiato, di legarsi a specifici recettori della superficie cellulare e di formare complessi macromolecolari. NGAL è stata caratterizzata e denominata nel 1993², ma ha diversi sinonimi: è anche noto come NL (neutrophil lipocalin; lipocalina neutrofila; HNL: NL umana)³, lipocalina 2, proteina oncogenica 24p3⁴ o uterocalina⁵ (nel topo) e NRL (neu-related lipocalin)⁶ o proteina 25 kDa α_2 -microglobulina-correlata⁷ (nel ratto). NGAL umano consiste in una catena di polipeptidi con un solo ponte disolfuro di 178 aminoacidi con una massa molecolare calcolata di 22 kDa², che con la glicosilazione aumenta la massa apparente fino a 25 kDa. Nei neutrofili (leucociti polimorfonucleari neutrofili) è presente in forma monomerica e dimerica, con una piccola percentuale trimerica, e si trova anche associata con collagenasi neutrofilo umano di tipo IV da 92-kDa (gelatinasi B o matrice metallo-proteinasi-9, MMP-9)⁸.

NGAL fu originariamente isolato dal sovrantante dei neutrofili umani attivati¹, ma è anche espresso a basso livello in altri tessuti tra cui il rene, la prostata e l'epitelio dei tratti respiratori ed alimentari^{9,10}. È fortemente espresso in adenoma, epitelio infiammato dell'intestino¹¹, adenocarcinoma del seno¹² e carcinoma dell'utero¹³.

A causa della sua piccola dimensione e della sua resistenza alla degradazione, NGAL è prontamente secreto e rilevabile nelle urine sia nella forma

libera sia in complesso con MMP-9. Livelli urinari correlati con i livelli plasmatici qualunque sia la causa dell'aumento di produzione¹⁴ di NGAL, ma in particolare si possono riscontrare elevati livelli urinari quando l'NGAL è secreto direttamente nell'urina dai tubuli renali o dai carcinomi uroteliali. Non è invece certo in che misura i complessi NGAL-MMP-9 da fonti remote dal tratto urinario siano secreti come tali nelle urine o si riformino nelle urine dopo una secrezione indipendente di NGAL e MMP-9⁸.

Mentre le funzioni di NGAL non sono completamente note, esso sembra essere sovraregolato nelle cellule sotto "stress", per esempio per infezioni, infiammazioni o trasformazioni neoplastiche o in tessuti che stanno subendo una involuzione come nell'utero dei topi postpartum e nelle ghiandole mammarie durante lo svezzamento⁵. In relazione a un possibile ruolo antibatterico, esso lega l'enterobactina e altri siderofori, privando i microrganismi di Fe³⁺, importante per la nutrizione¹⁵. La formazione del complesso con MMP-9 sembra proteggere l'attività enzimatica di MMP-9 dalla degradazione⁶. La sovraregolazione di NGAL in tessuti in involuzione ha portato al postulato del suo ruolo nell'apoptosi, ma sembra più probabile che NGAL sia associato ad una risposta in termini di sopravvivenza¹⁶.

NGAL e rene. Fin dal 1989, l'NGAL (24p3) è stata trovata nelle cellule renali dei topi e la sua iperespressione è stata associata (da 14 a 20 volte) in risposta all'infezione virale¹⁷ SV40. Una simile ed importantissima iperespressione venne osservata in seguito in altri tipi di lesioni renali, ed aumentati livelli plasmatici di NGAL strettamente correlati con la diminuita funzione renale in pazienti con danni renali dovuti a vasculite sistemica¹⁸. I livelli urinari NGAL vengono utilizzati come primissimo indicatore per lesioni renali gravi dopo un intervento di bypass cardiopolmonare^{19,20}, e sia i livelli di plasma sia quelli urinari di NGAL forniscono una prima indicazione di lesione renale acuta in pazienti non selezionati in terapia intensiva²¹. Livelli elevati urinari e plasmatici di NGAL sono stati osservati in pazienti con patologie renali croniche²², pure pazienti con graft renali funzionanti mostravano livelli urinari aumentati (rilevabili con Western blotting)¹³. Appare evidente,

quindi, che una vasta gamma di disfunzioni renali è associata ad aumentati livelli plasmatici e urinari di NGAL. Mentre i livelli urinari e plasmatici di NGAL sono strettamente collegati in condizioni gravi, c'è da aspettarsi livelli urinari di NGAL particolarmente elevati in seguito a lesioni renali abbastanza gravi da risultare in insufficienza renale acuta, necrosi tubulare acuta o nefropatie tubulo-interstiziali acute. Comunque, l'uso di NGAL urinario come marcatore di disfunzioni renali è soggetto al fatto che vengano prese in considerazione altre condizioni concorrenti, indipendentemente associate ad aumentati livelli di NGAL.

NGAL in infiammazioni/infezioni. L'NGAL viene rilasciato dai granuli specifici di neutrofili attivati^{1,2} ed i livelli di serum aumentano in patologie di tipo infiammatorio o infettivo, specialmente in caso di infezioni batteriche²³. L'NGAL serico è stato quindi proposto come marcatore delle infezioni batteriche. Tuttavia, poiché i livelli di NGAL possono anche aumentare in condizioni neoplastiche e disfunzioni renali indipendentemente da processi infettivi, l'applicazione proposta va trattata con cautela. NGAL può anche aumentare in pazienti con processi infettivi in corso, con un numero basso non rilevabile di neutrofili dovuto a leucemia o trattamento leucemico e questo dimostra che la fonte di NGAL aumentato nelle infezioni non sono solo i neutrofili.

NGAL e neoplasia. I vari tipi di cancro in cui NGAL può essere sovraregolato (spesso con MMP-9) sono stati summenzionati. Ciò è stato dimostrato dalla sua espressione nelle cellule tumorali e dagli alti livelli urinari sia in forma semplice sia in forma complessa con MMP-9⁸. In realtà è stato proposto che complessi urinari di NGAL-MMP-9 possano servire da marcatori di stati patologici in pazienti con cancro al seno²⁴. In questi casi non sono stati di solito misurati livelli plasmatici.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA DEL TEST

Il test è un ELISA eseguito in micropozzetti rivestiti di un anticorpo monoclonale contro NGAL umano. NGAL legato viene rilevato con anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e il test viene sviluppato per incubazione con un substrato che forma il colore. Il test è una procedura rapida in 2 fasi:

Fase 1. Aliquote di calibratori, campioni diluiti e qualsiasi controllo vengono incubati con anticorpo di rilevazione HRP coniugato in micropozzetti rivestiti. Solo NGAL si legherà sia all'anticorpo del rivestimento sia a quello di rilevazione, mentre i materiali non legati vengono rimossi con il lavaggio.

Fase 2. A ciascun pozzetto del test viene anche aggiunto un sostrato cromogenico con perossidasi contenente benzidina tetraetile (TMB). Lo HRP collegato all'anticorpo di rilevazione legato reagisce con il sostrato generando un prodotto colorato. La reazione enzimatica viene interrotta chimicamente e l'intensità del colore viene letta a 450 nm in un lettore ELISA. L'intensità del colore (assorbanza) è in funzione della concentrazione di NGAL originariamente aggiunto a ciascun pozzetto. I risultati dei calibratori vengono usati per costruire una curva di calibrazione da cui vengono lette le concentrazioni di NGAL nei campioni del test.

COMPONENTI DEL KIT

Articolo	Contenuto	Quantità
①	12 x 8 micropozzetti rivestiti + vassoio	96 pozzetti
②	5x diluente campione conc.	1 x 60 mL
③-③'	Calibratore NGAL Rapid 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	25x soluzione di lavaggio conc.	1 x 30 mL
⑤	Anticorpo NGAL coniugato HRP	1 x 6 mL
⑥	Sostrato TMB	1 x 12 mL
⑦	Soluzione d'arresto	1 x 16 mL
⑧	Piastra di micropozzetti ad U in polipropilene.	96 pozzetti

Nota: i reagenti liquidi contengono thimerosal o Bronidox L come conservanti. Possono essere nocivi se ingeriti.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Micropipette regolabili nella gamma da 1 a 1000 µL e corrispondenti punte da pipetta usa e getta
2. Provette in polipropilene atte a contenere fino a 1000 µL
3. Porta-provette
4. Micropipette regolabili a 8 o 12 canali (da 50 a 250 µL) o micropipette da ripetizione (opzionali)
5. Cilindri graduati puliti da 1 L e 500 mL
6. Acqua deionizzata o distillata
7. Copertura per micropiastre
8. Contenitore pulito per soluzione di lavaggio diluita
9. Apparecchiatura per riempire i pozzetti durante la procedura di lavaggio (opzionale)
10. Asciugamani di carta o carta assorbente non garzati
11. Serbatoi usa e getta per l'uso delle pipette
12. Timer (da 60 minuti)
13. Lettore per piastra ELISA calibrato in grado di leggere a 450 nm (preferibilmente sottraendo i valori di riferimento a 650 o 620 nm)

14. Ipocloruro di sodio (candeggiante domestico diluito 1:10) per la decontaminazione di campioni, reagenti e materiali

PRECAUZIONI
Solo per diagnostica *in vitro*

1. Questo kit deve essere usato solo da personale di laboratorio qualificato.
2. Usare punte di pipette separate per ciascun campione, calibratore e reagente per evitare la contaminazione incrociata.
3. Usare serbatoi separati per ciascun reagente. Questo si applica particolarmente al sostrato TMB.
4. Dopo l'uso, decontaminare tutti i campioni, i reagenti e i materiali immergendoli per almeno 30 minuti in una soluzione di ipocloruro di sodio (candeggiante domestico diluito 1:10).
5. Per evitare la formazione di goccioline durante il lavaggio, aspirare la soluzione di lavaggio in una bottiglia contenente candeggiante.
6. Non disperdere nell'ambiente. Smaltire contenitori e contenuti inutilizzati in modo sicuro secondo le norme nazionali e locali.
7. La soluzione di arresto contiene 0,5 mol/L di acido solforico e può causare irritazioni o ustioni alla pelle e agli occhi. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua abbondante e rivolgersi ad un medico.
8. Non mescolare componenti provenienti da kit con numeri di batch diversi. I componenti sono stati standardizzati come unità per ogni batch.
9. Campioni emolizzati, iperlipemici, trattati a caldo o contaminati possono dare risultati erronei.
10. Non diluire i campioni clinici direttamente nei pozzetti rivestiti.
11. Non toccare né raschiare il fondo dei micropozzetti rivestiti quando si pipetta o si aspira il liquido.
12. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
13. Non lasciare asciugare i pozzetti una volta che il test è iniziato.
14. Il sostrato TMB è sensibile alla luce. Tenere

lontano da luci forti.

- Non riutilizzare i micropozzetti né versare di nuovo i reagenti nelle bottiglie precedentemente eliminate.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Conservare il kit con tutti i reagenti a 2-8°C. Non congelare.
- Usare tutti i reagenti prima della data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
- La soluzione di lavaggio diluita resta stabile per 4 settimane a 2-8°C. Se non tutti i pozzetti devono essere utilizzati, diluire solo la parte di soluzione di lavaggio concentrata richiesta.
- La soluzione di diluente campione concentrata resta stabile per 24 ore a 2-8°C. Se non tutti i pozzetti devono essere utilizzati, diluire solo la parte di diluente campione concentrato richiesta.
- Per uso successivo, conservare i pozzetti non utilizzati nella sacca protettiva con l'essiccante in dotazione e sigillare di nuovo. Lasciare sempre che la sacca protettiva si equilibri a temperatura ambiente prima di aprire ed evitare la condensazione in/su i micropozzetti rivestiti.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Maneggiare e smaltire tutti i campioni di emoderivati o di urina come se fossero potenzialmente infettivi. Vedere Precauzioni, sezioni 2, 4 e 5.

La determinazione di NGAL in un singolo campione richiede 10 µL di urina, plasma o siero. I campioni di sangue devono essere raccolti in modo asettico in provette EDTA o in provette normali da parte di personale qualificato che usa tecniche di venopuntura approvate. Il plasma o il siero deve essere preparato con tecniche standard per i test di laboratorio. L'urina deve essere centrifugata. Coprire i campioni clinici preparati. Se il test non può essere eseguito entro 24 ore o se i campioni devono essere spediti, congelarli ad almeno -20°C. Per la conservazione nel lungo periodo dei campioni clinici, si raccomanda di congelare ad almeno -70°C. Evitare congelamento e scongelamento ripetuti. Non utiliz-

zare campioni emolizzati, iperlipemici, contaminati o trattati a caldo.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Portare tutti i campioni e i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C). Mescolare a fondo i campioni capovolgendo delicatamente e, se necessario, eliminare il materiale particolare visibile con centrifugazione a bassa velocità.
- Stabilire il numero di campioni da testare (in duplicato), più qualsiasi campione di controllo interno al laboratorio (in duplicato) e qualsiasi pozzetto di reagente in bianco. I pozzetti pre-rivestiti possono essere usati come strisce di 8 o come pozzetti singoli. I pozzetti singoli vengono preparati separando ciascun pozzetto e mettendolo sul vassoio nella posizione corretta. Lettere e tacche presenti sui pozzetti consentono l'identificazione dei singoli pozzetti. Aggiungere 12 pozzetti per 6 calibratori (in duplicato). Rimuovere il numero necessario di micropozzetti e rimettere il resto nella busta protettiva con essiccante a 2-8°C.
- Soluzione di lavaggio. Diluire la soluzione di lavaggio concentrata 25x versando tutto il contenuto della bottiglia (30 mL) in un cilindro graduato da 1 L e aggiungere acqua distillata o deionizzata fino a raggiungere il volume finale di 750 mL. Mescolare bene e, dopo l'uso, conservare a 2-8°C. Se non devono essere utilizzati tutti i pozzetti, diluire solo il volume richiesto di soluzione di lavaggio concentrata con 24 volumi di acqua fino a raggiungere una diluizione 1/25.
- Diluente campione. Diluire il diluente campione concentrato 5x (contiene colorante rosso per aiutare la pipettazione) versando tutto il contenuto della bottiglia (60 mL) in un cilindro graduato da 500 mL e aggiungere acqua distillata o demineralizzata fino a raggiungere il volume finale di 300 mL. Mescolare bene e, dopo l'uso, conservare a 2-8°C. Se non devono essere utilizzati tutti i pozzetti, diluire solo il volume richiesto di diluente campione concentrato con 4 volumi di acqua fino a raggiungere una

- diluzione 1/5.
5. Calibratori NGAL Rapid (contiene colorante rosso per aiutare la pipettazione). Le concentrazioni assegnate sono riportate sulle etichette. Non diluire ulteriormente.
 6. Anticorpo NGAL coniugato HRP (pronto all'uso). Non diluire ulteriormente.
 7. Sostrato TMB (pronto all'uso). Non diluire ulteriormente.
 8. Soluzione d'arresto (pronta all'uso). Non diluire ulteriormente.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il range della curva standard è 0,2-20 ng/mL e il range diagnosticamente rilevante è 100-500 ng/mL per plasma o siero e 50-500 ng/mL per urina (vedere Interpretazione dei risultati). Si consiglia quindi una diluizione di screening iniziale di 1/100 per plasma o siero e di 1/50 per urina. La diluizione 1/100 può essere preparata diluendo 10 µL di plasma o siero in 990 µL di diluente campione e una diluizione 1/50 può essere preparata diluendo 10 µL di urina in 490 µL di diluente campione. Le diluizioni vengono mescolate capovolgendo o facendo vorticare delicatamente. Può essere necessario ritestare campioni fuori range a diluizione inferiore o superiore. Diluizioni inferiori a 1/25 non devono essere usate.

PROCEDURA DEL TEST

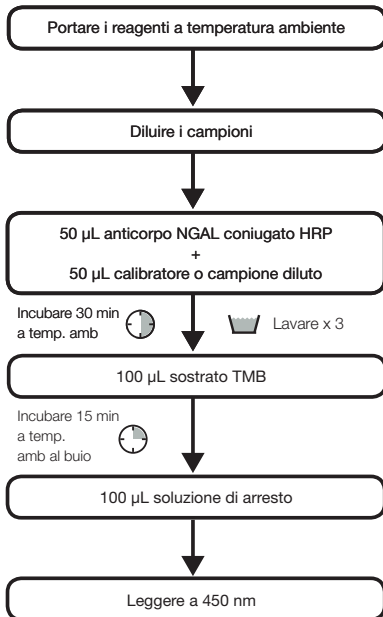
1. Preparare il protocollo del test assegnando i pozzetti appropriati per impostare i calibratori, i campioni paziente diluiti e tutti i controlli interni di laboratorio in duplicato. Se sul lettore ELISA non è disponibile una lunghezza d'onda di riferimento di 650 o 620 nm, può essere assegnato un pozzetto di reagente in bianco. Questo viene impostato con 50 µL di diluente campione invece che di campione diluito e viene elaborato come gli altri pozzetti.
2. Campioni diluiti secondo le previste concentrazioni NGAL (1/100 per plasma o siero e 1/50 per urina saranno adatti per la maggior parte dei campioni).
3. Pipettare un volume sufficiente di ciascun calibratore, ciascun campione diluito e qualsiasi

- controllo interno di laboratorio nei pozzetti appropriati della piastra di micropozzetti a U in polipropilene per permettere il successivo trasferimento di volumi di 50 µL nei corrispondenti micropozzetti rivestiti.
4. Pipettare volumi di 50 µL di anticorpo NGAL coniugato HRP nelle corrispondenti posizioni dei micropozzetti rivestiti. Poi, con una pipetta multicanale, trasferire rapidamente volumi di 50 µL delle soluzioni di calibratori, di campioni diluiti e di controlli interni dai pozzetti a U nei corrispondenti pozzetti rivestiti già contenenti l'anticorpo di rilevazione. Si consiglia questo metodo di aggiunta dei campioni per ridurre la differenza nei tempi di incubazione tra i primi e gli ultimi campioni aggiunti ai micropozzetti rivestiti.
 5. Coprire i pozzetti e incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente su una piattaforma oscillante impostata a 200/minuto.
 6. Aspirare il contenuto dei micropozzetti e lavare questi ultimi tre volte con almeno 300 µL della soluzione di lavaggio precedentemente diluita. Se il lavaggio viene eseguito a mano, svuotare i micropozzetti capovolgendoli e scuotendoli delicatamente in un contenitore adatto, tamponarli poi, capovolti, su un asciugamano di carta. Si consiglia un'attesa di 1 minuto prima dello svuotamento almeno per l'ultimo lavaggio del ciclo. La forza con cui la soluzione di lavaggio viene versata o svuotata dai pozzetti, influenza lo sviluppo finale del colore. Pipettare manualmente, operazione che può essere molto delicata e che può portare ad alto sviluppo di colore, è consigliato solo in assenza di alternative come il riempimento dei pozzetti per immersione, usando un dispensatore manuale multicanale o un dispositivo di lavaggio automatico.
 7. Versare 100 µL di sostrato TMB (pronto all'uso) in ciascun micropozzetto. Si consiglia l'uso di una micropipetta multicanale per ridurre il tempo di pipettazione. Coprire i pozzetti e incubare per **15 minuti esatti** a temperatura ambiente al buio. Impostare l'orologio quando

si riempie il primo pozzetto.

8. Aggiungere a ciascun pozzetto 100 μ L di soluzione di arresto (pronta all'uso) conservando la stessa sequenza di pipettazione e lo stesso ritmo della fase 7. Mescolare delicatamente agitando per 20 secondi, evitando di spargere. Leggere i pozzetti entro 30 minuti.
9. Leggere le assorbenze dei pozzetti a 450 nm in un lettore per micropiastra appropriato (lunghezza d'onda di riferimento 650 o 620 nm). Se non è disponibile alcuna lunghezza d'onda di riferimento, il valore del pozzetto in bianco viene sottratto da ciascuno degli altri valori prima di eseguire altri calcoli.

SCHEMA DELLA PROCEDURA DEL TEST



CALCOLO DEI RISULTATI

Per il calcolo dei risultati devono essere usati i valori esatti riportati sull'etichetta dei calibratori e sul certificato QC.

Il principio di base è costruire una curva di calibrazione tracciando la media dei valori di assorbenza in duplicato per ciascun Calibratore NGAL Rapid sull'asse y contro le corrispondenti concentrazioni di NGAL in ng/mL sull'asse x. La curva di calibrazione deve soddisfare i requisiti di validazione. La concentrazione di NGAL di ciascun campione diluito si trova localizzando il punto della

curva che corrisponde alla media dei valori di assorbenza in duplicato per il campione diluito e leggendo la sua corrispondente concentrazione in ng/mL dall'asse x. La concentrazione di NGAL nel campione non diluito si calcola moltiplicando questo risultato per il fattore di diluizione del campione.

Questa procedura può essere eseguita manualmente usando la carta millimetrata con scale lineari x e y. Una curva uniforme può essere tracciata attraverso i punti oppure i punti adiacenti possono essere uniti con linee rette. La seconda procedura può leggermente sovrastimare i valori di concentrazione tra i punti in cui la curva è leggermente convessa verso sinistra, cosa che si riscontra spesso. Sebbene la curva possa avvicinarsi ad una linea retta, non è corretto né da un punto di vista pratico né teorico calcolare e tracciare la linea retta del miglior adattamento e leggere i risultati da questo.

La procedura può anche essere eseguita con un programma software di lettura ELISA con procedure di adattamento della curva. La procedura da scegliere consiste nell'usare assi lineari x e y con adattamento della curva logistica a 4 parametri. Campioni diluiti che danno un'assorbenza media al di sopra di quella per il Calibratore NGAL Rapid 6 o al di sotto di quella per il Calibratore NGAL Rapid 2, sono fuori dal range del test e le loro concentrazioni devono essere annotate rispettivamente come >20 ng/mL e $<0,2$ ng/mL. Le corrispondenti concentrazioni nei sieri non diluiti sono calcolate rispettivamente $>(20 \times \text{fattore di diluizione})$ ng/mL e $<(0,2 \times \text{fattore di diluizione})$ ng/mL. Se necessario, questi campioni possono essere ritestati a diluizioni maggiori e inferiori, rispettivamente per campioni ad alta e bassa lettura. I nuovi fattori di diluizione devono essere quelli stimati per dare valori di assorbenza rientranti nel range della curva di calibrazione, ma diluizioni inferiori a 1/25 non devono essere usate.

VALIDAZIONE DELLA CURVA DI CALIBRAZIONE

L'assorbenza media per il Calibratore NGAL Rapid 6 deve essere $>1,5$. L'assorbenza media per qualunque Calibratore NGAL Rapid deve essere maggiore di quella del precedente Calibratore NGAL Rapid:

per es. assorbenza (NGAL Rapid Calibratore 6) $>$ assorbenza(NGAL Rapid calibratore 5). La curva deve essere leggermente convessa verso sinistra quando i risultati vengono tracciati su assi lineari.

Punti fuori linea per i singoli calibratori: uno o più singoli calibratori possono dare letture di assorbenza anomale. Uno o entrambi i valori in duplicato possono essere fuori linea e la media dei duplicati può essere fuori linea. Questo errore è significativo se pregiudica il soddisfacente adattamento della curva col metodo logistico a 4 parametri che, come risultato del valore anomalo, si allontana dagli altri punti del calibratore che sono in realtà corretti. I punti del calibratore e la curva di adattamento devono essere sempre verificati prima di accettare qualsiasi calcolo delle concentrazioni. Un curva che non si adatta in modo soddisfacente sarà rivelata anche da un'alta somma di quadrati residuali. Se viene influenzato un solo calibratore che non sia il più alto, sono possibili due azioni:

i) deve essere eliminato dalla curva un risultato erroneo singolo o in duplicato e i risultati rimanenti riadattati con la procedura logistica a 4 parametri. Se si ottiene un adattamento soddisfacente, i risultati provvisori delle concentrazioni possono essere calcolati da lì.

ii) Se in questo modo non è possibile alcun adattamento soddisfacente, ma la curva è comunque coerente, risultati provvisori possono essere ottenuti dalla linee diritte o dal semplice adattamento curvilineo flessibile cubico tra le medie dei duplicati, omettendo i punti erronei.

Se sono influenzati due o più calibratori il test deve essere ripetuto.

Un risultato deviante per un singolo calibratore può essere dovuto a un errore dell'operatore o ad un deterioramento del calibratore. Se entrambi i valori in duplicato sono coerentemente fuori linea in test successivi, il calibratore è guasto e deve essere omesso.

TRACCIABILITÀ DEL VALORE DEL CALIBRATORE

La concentrazione di NGAL del materiale del calibratore diluito è stato assegnata per confronto

in ELISA con una preparazione purificata di NGAL umano ricombinante quantificato da Rigshospitalet, Copenhagen, Danimarca.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il ritrovamento di un accresciuto livello di NGAL nelle urine, nel plasma o nel siero non può essere da solo diagnostico di alcuna singola patologia. Come affermato nell'introduzione, una serie di patologie indipendenti sono associate a livelli aumentati di NGAL nelle urine o nel plasma. I medici devono interpretare il significato di qualsiasi livello di NGAL aumentato alla luce del quadro clinico di ciascun paziente.

La capacità di livelli di NGAL nelle urine e nel plasma di diagnosticare un'insufficienza renale acuta che si presuma derivi da malattia renale fu stabilita in una serie di 60 pazienti consecutivi ammessi in un'unità di cura intensiva non specializzata e classificabili, con altri criteri, come mostranti o non mostranti sintomi di insufficienza renale. Molti di questi pazienti presentavano sepsi ricorrenti e alcuni erano affetti da cancro. Livelli massimali accresciuti di NGAL furono associati con l'insufficienza renale acuta come mostrato di seguito:

INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

Campione	Urina	Plasma
Valore di cutoff	350 ng/mL	400 ng/mL
Specificità diagnostica	89,3%	96,3%
Sensibilità diagnostica	96,9%	84,8%
Valore predittivo positivo	91,2%	93,1%
Valore predittivo negativo	96,2%	83,9%

Una concentrazione di NGAL nelle urine superiore a 350 ng/mL o nel plasma superiore a 400 ng/mL

ha alte probabilità (valore predittivo positivo >90%) di essere dovuta a malattia renale e può portare a insufficienza renale acuta. Concentrazioni di NGAL al di sotto dei valori di cutoff possono indicare assenza di malattia renale o malattia renale leggera in questa popolazione di pazienti. Un improvviso aumento nella concentrazione di NGAL urinario al di sopra dei precedenti valori del paziente può indicare malattia renale anche se il valore di cutoff non viene superato si consiglia pertanto una stretta sorveglianza della funzione renale.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

I laboratori che intendono eseguire test ripetuti devono determinare i proprio sieri e le proprie urine di controllo ad alta e bassa lettura, conservati in piccole aliquote (per es. 50 µL) ad una temperatura di almeno -70°C. Un'aliquota di ciascun controllo deve essere scongelata e testata in ciascun test e devono essere registrati i risultati successivi. Questo serve da controllo della performance, dell'integrità del test e dell'affidabilità dell'operatore. I risultati devono essere esaminati per verificare lo spostamento (tendenza dei risultati successivi ad aumentare o diminuire) o una deviazione significativa dalla media dei risultati precedenti. Valori che non deviano più del 20% dalla media di quelli precedenti, possono essere presi come indicazione dell'accettabilità del test. Una volta scongelate, le aliquote di siero di controllo non devono essere ricongelate e se si esegue un ulteriore test devono essere utilizzate aliquote di controllo fresche e diluizioni fresche di campioni paziente.

LIMITI

Il ritrovamento di un accresciuto livello di NGAL nelle urine, nel plasma o nel siero non può essere da solo diagnostico di alcuna singola patologia. Come affermato nell'introduzione, una serie di patologie indipendenti sono associate con livelli aumentati di NGAL nelle urine o nel plasma. I medici devono interpretare il significato di qualsiasi livello di NGAL aumentato alla luce del quadro clinico di ciascun paziente.

I valori di cutoff indicati nella Interpretazione dei risultati si basano sui valori massimali della popola

zione di pazienti descritta, caratterizzata dalla presenza di molteplici fattori che potevano indurre a confusione. Altri cutoff, magari più bassi, possono essere appropriati per altri gruppi di pazienti con meno fattori di confusione. Improvvisi aumenti di NGAL possono indicare malattia renale acuta anche se non superano i valori di cutoff.

RISULTATI PREVISTI

La concentrazione media di NGAL in campioni di donatori sani era di 63 ng/mL (range 37-106 ng/mL, n = 80) in plasma EDTA e 5,3 ng/mL (range 0,7-9,8 ng/mL, n = 7) nelle urine. In pazienti non selezionati ammessi in terapia intensiva le concentrazioni di NGAL nelle urine oscillava tra 9 ng/mL e 40.000 ng/mL (40 µg/mL) nelle urine (n = 60) e tra 25 ng/mL e 3491 ng/mL in plasma EDTA (n = 60).

CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE

Limiti del rilevamento: La minore concentrazione di NGAL che da un valore di assorbanza maggiore di 2 SD sopra lo zero (Calibratore Rapido NGAL 1) lettura (n = 8) è stata determinata in 0,008 ng/mL, inferiore rispetto al valore del Calibratore Rapido 2 NGAL.

Precisione: la variazione intra test fu stabilita attraverso la misurazione di NGAL in 2 campioni di urina e in 2 campioni di plasma con 8 repliche. Si ottennero i seguenti risultati (CV = coefficiente di variazione).

Campioni	CV
Urina A	3,4%
Urina B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

La variazione inter test fu stabilita attraverso la misurazione di NGAL in 2 campioni di urina diluiti e 2 campioni di plasma EDTA diluiti con 2 repliche in 4 test separati. Si ottennero i seguenti risultati:

Campioni	CV
Urina A	4,7%
Urina B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Recupero analitico: i campioni di urina e plasma furono corretti con NGAL umano ricombinante e analizzati nel test. Il recupero fu calcolato da (misurato/previsto) espresso in percentuale.

Campione	Misurato (range)	Previsto (range)	Recupero (range)
Urina	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93%-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83%-90%

Linearità: NGAL fu misurato in diluizioni seriali (n = 8) di due campioni di urina e di due campioni di plasma. Il CV della media dei valori misurati corretti per la diluizione fu 9,9% e 12,5% per i due campioni di urina e 12,2% e 7,4% per i due campioni di plasma, il che dimostra una soddisfacente linearità.

Materiale campione: l'analisi di campioni di siero, plasma EDTA o urina non mostrò differenze significative nel recupero analitico, nella linearità o nella precisione. Concentrazioni di NGAL, però, sono spesso leggermente più alte nel siero che nel plasma²³, forse a causa del rilascio di NGAL da parte dei neutrofili durante la coagulazione del sangue.

Specificità: i due anticorpi monoclonali contro NGAL umano usati nel test hanno dimostrato di legarsi a diverse preparazioni di NGAL umano ricombinante e di dare una singola banda di 25 kDa su analisi Western blot di un sovrnatante postnucleare ridotto da neutrofili umani²⁵.

RESPONSABILITÀ

Per uso diagnostico *in vitro* solo in paesi autorizzati. Visitare il sito www.bioporto.com per verificare la disponibilità nel vostro paese.

Questo kit è destinato solo alla determinazione *in vitro* della NGAL nel urine, siero e nel plasma-EDTA umani.

Il kit è destinato ad essere usato solo da personale qualificato che svolge attività di ricerca o di diagnostica.

Se colui che riceve questo kit lo passa in qualunque modo a terzi, queste istruzioni devono essere allegate, e il suddetto ricevente deve a proprio rischio rendersi garante nei confronti della BioPorto Diagnostics A/S per tutti i relativi limiti e responsabilità.

BioPorto Diagnostics A/S non sarà responsabile per danni o perdite causati dall'uso di questo kit diverso da quello espressamente dichiarato in queste istruzioni.

La responsabilità di BioPorto Diagnostics A/S non andrà in alcun modo oltre il valore commerciale del kit.

In nessuna circostanza, BioPorto Diagnostics A/S sarà responsabile per danni indiretti, speciali o consequenziali, compresa, ma non solo, la perdita di profitti.

Revisión: NR2010-05-EN-ES

Le rogamos lea atentamente estas instrucciones antes de utilizar el kit

USO PREVISTO

Determinación *in vitro* de la proteína NGAL humana en orina, plasma o suero como marcador de lesión renal aguda que pueda conducir a una insuficiencia renal aguda.

INTRODUCCIÓN

Descubierta en 1989¹, la proteína NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila) pertenece, como su nombre indica, a la familia de las lipocalinas. Son proteínas de secreción, generalmente de pequeño tamaño que se caracterizan por su capacidad de unir moléculas hidrofóbicas en un sitio de unión conservado formado por una hoja plegada β , por su capacidad para unirse a receptores específicos de superficie celular y de formar complejos macromoleculares. NGAL fue completamente caracterizada y denominada como tal en 1993², si bien cuenta con varios sinónimos: NL (lipocalina neutrófila; HNL: NL humana)³, lipocalina 2, proteína oncogénica 24p3⁴ o uterocalina⁵ (en el ratón) y lipocalina relacionada con *neu*⁶ o proteína relacionada con $\alpha 2$ -microglobulina de 25 kDa⁷ (en la rata). La proteína NGAL humana consta de una única cadena polipeptídica de 178 residuos de aminoácidos con un puente disulfuro, masa molecular calculada de 22 kDa, pero su glicosilación incrementa su masa molecular aparente hasta 25 kDa. En los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos) aparece en forma de monómeros y de dímeros, con un pequeño porcentaje de trímeros, y también formando un complejo con la colagenasa tipo IV de 92 kDa de los neutrófilos humanos (denominada asimismo gelatinasa B o metaloproteinasa de matriz 9, MMP-9)⁸.

NGAL se aisló por primera vez a partir del sobrenadante de neutrófilos humanos activados¹, pero también se expresa, a niveles bajos, en otros tejidos humanos, como el riñón, la próstata y el epitelio de las vías respiratorias y del tubo digestivo¹⁰. Se expresa abundantemente en los adenomas y en el epitelio inflamado del intestino¹¹,

en los adenocarcinomas de mama¹², y en los carcinomas uroteliales¹³.

Debido a su pequeño tamaño molecular y a su resistencia a la degradación, la proteína NGAL se excreta y se detecta fácilmente en la orina, tanto en su forma libre como formando complejo con MMP-9. Los niveles urinarios se correlacionan con los niveles en plasma, independientemente de la causa del aumento de producción de NGAL¹⁴, si bien se pueden esperar unos niveles urinarios particularmente altos en los casos en los que se libere NGAL directamente en la orina desde los túbulos renales o los carcinomas uroteliales. Se desconoce hasta qué punto los complejos NGAL-MMP-9 procedentes de fuentes alejadas de las vías urinarias se excretan como tales en la orina o se forman en la orina tras la excreción independiente de NGAL y MMP-9⁸.

Si bien las funciones de la proteína NGAL no se comprenden completamente, parece que NGAL se regula al alza en las células sometidas a estrés, por ejemplo, por infección, inflamación o transformación neoplásica, o bien en tejidos sometidos a involución, como puede ser el útero postparto del ratón y las glándulas mamarias durante el destete⁵. En relación con una posible función antibacteriana, se une a enterobactina y otros sideróforos, privando a los microorganismos de Fe³⁺, una necesidad nutricional importante¹⁵. La formación de complejos con MMP-9 protege la actividad enzimática de MMP-9 de la degradación⁸. La regulación al alza de NGAL en tejidos en involución ha llevado a postular una función de la proteína NGAL en la apoptosis, aunque parece más probable que NGAL esté asociada con una respuesta de supervivencia¹⁶.

NGAL y el riñón. Ya en 1989, se descubrió que NGAL (24p3) se expresaba en células renales de ratón y sufría una temprana y espectacular regulación al alza (entre 14 y 20 veces) como respuesta a la infección vírica por SV40¹⁷. Posteriormente se observó una regulación similar en otros tipos de daño renal, determinándose que los niveles plasmáticos de NGAL estaban estrechamente correlacionados con una función renal disminuida en pacientes con daño renal, debido a una vasculitis sistémica¹⁸. Los niveles de NGAL en orina sirven

como marcador temprano del fallo renal agudo tras el bypass cardiopulmonar^{19,20}, asimismo, los niveles de NGAL en orina y en plasma se pueden utilizar para la detección temprana del fallo renal agudo en pacientes no seleccionados ingresados en cuidados intensivos²¹. También se han observado valores elevados de NGAL en orina y en plasma de pacientes con enfermedades renales crónicas²². Los pacientes con injertos renales funcionales también mostraron unos mayores niveles urinarios (detectables mediante Western)¹³. Por consiguiente, resulta obvio que hay numerosos trastornos renales asociados con unos niveles elevados de la proteína NGAL en orina y en plasma. Si bien los niveles de NGAL en orina y en plasma están correlacionados en varias afecciones agudas, es de esperar que los niveles urinarios de NGAL sean particularmente elevados tras producirse una lesión renal lo suficientemente grave como para provocar una insuficiencia renal aguda, en necrosis tubular aguda o en una nefropatía tubulointersticial. Sin embargo, para emplear la NGAL urinaria como marcador de estos estados patológicos es necesario tener en cuenta otras afecciones concurrentes que estén asociadas independientemente con niveles elevados de NGAL.

NGAL en inflamación/infección. La proteína NGAL se libera desde gránulos específicos de neutrófilos activados^{1,2} y los niveles de NGAL en suero aumentan en las afecciones inflamatorias o infecciosas, especialmente en el caso de las infecciones bacterianas²³. De ahí que se haya propuesto el uso de los niveles de NGAL en suero como marcador de estas infecciones. No obstante, dado que los niveles de NGAL también pueden aumentar durante las afecciones neoplásicas y los trastornos renales, independientemente de cualquier proceso infeccioso, es necesario tener esto en cuenta a la hora de considerar esta propuesta. De igual modo, NGAL puede también aumentar durante una infección en un paciente con un número de neutrófilos extremadamente bajo, debido a una leucemia o a una leucemia en tratamiento, lo que demuestra que el origen del aumento de NGAL durante las infecciones no se debe exclusivamente

a los neutrófilos.

NGAL y neoplasia. Anteriormente, se han descrito los diversos tipos de cáncer en los que los niveles de NGAL pueden estar elevados (con frecuencia con MMP-9). Esto ha quedado reflejado por su expresión en las células tumorales y por sus altos niveles urinarios, tanto en forma libre como formando complejos con MMP-9². De hecho, se ha propuesto que los complejos urinarios de NGAL-MMP-9 pueden servir como marcador del estado de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama²⁴. Habitualmente, en estos casos no se han medido los niveles plasmáticos.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

El análisis consiste en un ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) realizado en micropocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra NGAL humana. La NGAL unida al recubrimiento se detecta mediante un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y finalmente se incuba con un sustrato formador de color. El análisis consiste en un procedimiento rápido en dos etapas:

Etapas 1. En los micropocillos recubiertos se pipetea e incuban alícuotas de los calibradores, de las muestras diluidas y de los controles necesarios junto con el anticuerpo de detección conjugado con HRP. Únicamente la NGAL se unirá tanto al recubrimiento como al anticuerpo de detección, mientras que todo material no unido se elimina mediante lavado.

Etapas 2. Se añade a cada pocillo un sustrato cromógeno de la peroxidasa que contiene tetrametilbenzidina (TMB). La HRP, enlazada al anticuerpo de detección fijado, reacciona con el sustrato para dar lugar a un producto con color. La reacción enzimática se detiene químicamente y se lee la intensidad de color en cada pocillo a 450 nm utilizando un lector ELISA. La intensidad de color (absorbancia) es función de la concentración de NGAL añadida a cada pocillo en la etapa 1. Los resultados obtenidos con los calibradores se emplean para dibujar una curva de calibración en la que se leen las concentraciones de NGAL en las muestras problema.

COMPONENTES DEL KIT

Elemento	Contenido	Cantidad
①	12 x 8 micropocillos recubiertos + Marco	96 pocillos
②	Diluyente de muestras conc. 5x	1 x 60 mL
③-③'	Calibradores NGAL Rapid 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	Solución de lavado, conc. 25x	1 x 30 mL
⑤	Anticuerpo NGAL conjugado con HRP	1 x 6 mL
⑥	Sustrato TMB	1 x 12 mL
⑦	Solución de parada	1 x 16 mL
⑧	Placa de micropocillos en U de polipropileno	96 pocillos

Nota: los reactivos líquidos contienen los conservantes timerosal o Bronidox L. Estos compuestos pueden resultar nocivos por ingestión.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

1. Micropipetas ajustables que cubran un intervalo de 1-1000 μ L y las correspondientes puntas de pipeta desechables
2. Tubos de polipropileno con capacidad de hasta 1000 μ L
3. Gradillas para tubos
4. Micropipeta de 8 ó 12 canales ajustables (intervalo 50-250 μ L) o micropipetas de repetición (opcional)
5. Probetas graduadas de 1 l y 500 mL limpias
6. Agua desionizada o destilada
7. Cubierta para microplacas
8. Envase limpio para la Solución de lavado diluida
9. Aparato para el llenado de los pocillos durante el procedimiento de lavado (opcional)
10. Toallitas de papel sin pelusa o papel absorbente
11. Recipientes con pipetas desechables

12. Cronómetro (intervalo de 60 minutos)
13. Lector de placas de ELISA calibrado para leer a 450 nm (preferiblemente con capacidad para restar valores de referencia medidos a 650 ó 620 nm)
14. Hipoclorito sódico (lejía doméstica diluida 1:10) para la descontaminación de muestras, reactivos y materiales

PRECAUCIONES
Sólo para diagnóstico *in vitro*

1. Este kit sólo debe ser utilizado por personal de laboratorio cualificado.
2. Utilice puntas de pipeta nuevas para cada muestra, calibrador y reactivo, a fin de evitar la contaminación cruzada.
3. Utilice depósitos separados para cada reactivo, en especial para el Sustrato TMB.
4. Una vez utilizados, descontamine todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y con los reactivos sumergiéndolos durante al menos 30 minutos en solución de hipoclorito sódico (lejía doméstica diluida 1:10).
5. Para evitar la formación de gotas durante el lavado, aspire la solución de lavado en un frasco que contenga lejía.
6. Evítese su liberación al medio ambiente. Deseche los recipientes y todo contenido no utilizado de forma segura y con arreglo a las reglamentaciones nacionales y locales.
7. La Solución de Parada contiene ácido sulfúrico 0,5 mol/L y puede provocar irritación o quemaduras en la piel y en los ojos. Si ocurriera el contacto, aclárese inmediatamente con agua abundante y consulte con un médico.
8. No intercambie componentes procedentes de kits con números de lote distintos. Los componentes de cada lote se han estandarizado para su funcionamiento como una unidad.
9. Las muestras hemolizadas, hiperlipidémicas y sometidas a tratamiento térmico pueden proporcionar resultados erróneos.
10. No diluya las muestras clínicas directamente

en los micropocillos recubiertos.

11. No toque ni rasque el fondo de los micropocillos recubiertos al pipetear o aspirar el líquido.
12. Si se utilizan tiempos y las temperaturas de incubación diferentes a los que se especifican, se pueden obtener resultados erróneos.
13. Una vez comenzado el análisis, no se debe dejar que los pocillos se sequen.
14. El Sustrato TMB es fotosensible. Manténgalo protegido de la luz intensa.
15. No reutilice los micropocillos ni vierta nuevamente los reactivos en sus frascos una vez utilizados.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

1. Conserve el kit con todos los reactivos a 2-8°C. No lo congele.
2. Utilice todos los reactivos antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del estuche.
3. La Solución de Lavado una vez diluida permanece estable durante 4 semanas a 2-8°C. Si no se van a emplear todos los micropocillos, diluya únicamente la cantidad de Solución de Lavado concentrada que necesite.
4. El Diluyente de Muestras una vez diluido permanece estable durante 24 horas a 2-8°C. Si no se van a emplear todos los micropocillos, diluya únicamente la cantidad de Diluyente de Muestras concentrado que necesite.
5. Para su uso posterior, almacene los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con el desecante suministrado y séllela nuevamente. Deje que la bolsa de aluminio se establezca a temperatura ambiente antes de abrirla a fin de evitar la condensación en o sobre los micropocillos recubiertos.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Manipule y deseche todas las muestras derivadas de sangre u orina como si fueran potencialmente infecciosas. Consulte las Precauciones, apartados 2, 4 y 5.

Para la determinación de NGAL en una única muestra se necesitan 10 µL de orina, plasma o suero. Las muestras de sangre deben recogerse asepticamente

en un tubo con EDTA o en tubos vacíos por personal cualificado y mediante técnicas de venopunción aprobadas. El plasma o el suero deben prepararse mediante técnicas estándar para pruebas clínicas de laboratorio. La orina se ha de centrifugar. Las muestras clínicas preparadas deben taparse adecuadamente. En caso de que el análisis no se pueda realizar antes de 24 horas, o si es necesario enviar las muestras, éstas deben mantenerse congeladas a una temperatura inferior a -20°C. Para conservar las muestras clínicas durante períodos prolongados, se recomienda una temperatura de -70°C o inferior. Debe evitarse congelar y descongelar las muestras repetidamente. No deben utilizarse muestras hemolizadas, hiperlipidémicas, sometidas a tratamiento térmico o contaminadas.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Deje que todas las muestras y los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25°C). Mezcle bien las muestras invirtiendo los tubos suavemente y si es necesario elimine las partículas visibles mediante centrifugación a baja velocidad.
2. Determine el número de muestras que hay que analizar (por duplicado), más las muestra de control interno del laboratorio (por duplicado), más los pocillos para el blanco del reactivo. Los pocillos recubiertos pueden utilizarse bien como tiras de 8 o bien como pocillos individuales. Los pocillos individuales se consiguen separando los pocillos uno por uno y colocando cada pocillo en el marco en una posición adecuada. Las letras y las marcas de los pocillos permiten la identificación de los pocillos individuales. Añada 12 pocillos para los 6 calibradores (por duplicado). Tome el número de micropocillos necesario y guarde el resto en la bolsa de aluminio con desecante; conservarlos a una temperatura de 2-8°C.
3. Preparación de la Solución de lavado: diluya la Solución de Lavado concentrada 25x vertiendo todo el contenido del frasco (30 mL) en una probeta graduada de 1 L y añada agua destilada o desionizada hasta un volumen final



de 750 mL. Mezcle bien y conserve la solución diluida a 2-8°C después de su uso. Si no se van a emplear todos los micropocillos, diluya únicamente el volumen de Solución de Lavado concentrada necesario con 24 volúmenes de agua para conseguir una dilución 1/25.

4. Preparación del Diluyente de Muestras: diluya el Diluyente de Muestras concentrado 5x (contiene un colorante rojo que facilita el pipeteo) vertiendo todo el contenido del frasco (60 mL) en una probeta graduada de 500 mL y añada agua destilada o desionizada hasta un volumen final de 300 mL. Mezcle bien y conserve la solución a una temperatura de 2-8°C después de su uso. Si no se van a emplear todos los pocillos, diluya únicamente el volumen de Diluyente de Muestras concentrado necesario con 4 volúmenes de agua para conseguir una dilución 1/5.
5. Calibradores NGAL **Rapid: las concentraciones** asignadas se indican en sus etiquetas (contienen un colorante rojo que facilita el pipeteo). Están preparados para su uso directamente. No los diluya adicionalmente.
6. Anticuerpo NGAL conjugado con HRP (listo para su uso): no lo diluya adicionalmente.
7. Sustrato TMB: está preparado para su uso directamente. No lo diluya adicionalmente.
8. Solución de Parada: está preparada para su uso directamente. No la diluya adicionalmente.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El intervalo de la curva de calibración es de 0,2-20 ng/mL y el intervalo de importancia diagnóstica es de 100-500 ng/mL para plasma o suero y de 50-500 ng/mL para orina (consulte Interpretación de los resultados). Por consiguiente, para la correcta detección de los niveles de NGAL se recomienda una dilución inicial de 1/100 para plasma o suero y de 1/50 para orina. La dilución de 1/100 se puede preparar diluyendo 10 µL de plasma o suero en 990 µL de Diluyente de Muestras y la dilución de 1/50 se puede preparar diluyendo 10 µL de orina en 490 µL de Diluyente de Muestras. Las diluciones se mezclan por inversión o mezclando moderadamente con

ayuda de un mezclador con vórtice. Puede que sea necesario repetir el ensayo con las muestras que se encuentren fuera del intervalo de la curva patrón, utilizando una dilución distinta, menor o mayor. No deben emplearse diluciones inferiores a 1/25.

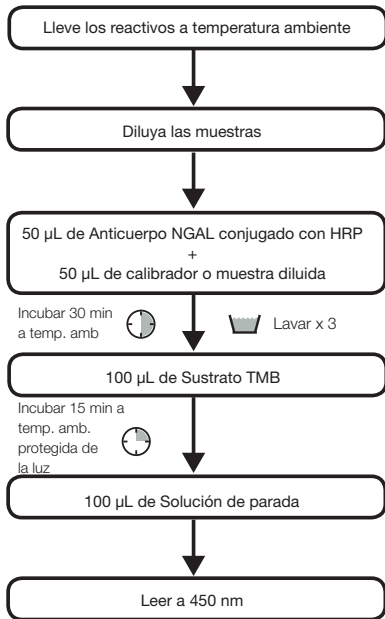
PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

1. Prepare el protocolo del análisis, designando los micropocillos destinados para contener los calibradores, las muestras de pacientes diluidas y los controles internos del laboratorio, todos por duplicado. En caso de que el lector de ELISA no cuente con una longitud de onda de referencia de 650 ó 620 nm, puede añadirse un pocillo como blanco del reactivo: a éste se le añaden 50 µL de Diluyente de Muestras, en lugar de la muestra diluida, y se procesa de igual forma que el resto de los pocillos.
2. Diluya las muestras según las concentraciones de NGAL esperadas (1/100 para plasma o suero y 1/50 para orina resultará adecuado para la mayor parte de las muestras).
3. Pipetee un volumen suficiente de cada calibrador, muestra diluida y control interno del laboratorio en los pocillos correspondientes de la microplaca de polipropileno con pocillos de U de tal manera que se posibilite la transferencia posterior de volúmenes de 50 µL a los micropocillos recubiertos correspondientes.
4. Pipetee volúmenes de 50 µL de Anticuerpo NGAL conjugado con HRP en los micropocillos recubiertos designados. A continuación, con ayuda de una pipeta multicanal, transfiera rápidamente volúmenes de 50 µL de las soluciones de calibrador, de las muestras diluidas y de los controles internos desde los pocillos U a los pocillos recubiertos correspondientes que ya contienen el anticuerpo de detección. Se recomienda este método de adición de las muestras con objeto de reducir la diferencia en el tiempo de incubación entre las primeras y las últimas muestras que se añaden a los pocillos recubiertos.
5. Cubra los pocillos e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente en una plataforma de

agitación fijada a 200/minuto.

6. Aspire el contenido de los micropocillos y lávelos tres veces con al menos 300 μL /pocillo de la Solución de Lavado diluida previamente. Si el lavado se realiza de forma manual, vacíe los micropocillos invirtiéndolos y agitándolos suavemente sobre un recipiente adecuado, dejándolos reposar en posición invertida sobre una toallita de papel. Se recomienda un tiempo de reposo de 1 minuto antes del vaciado al menos durante el último lavado del ciclo. La fuerza con la que se añade o se vacía la Solución de Lavado diluida de los pocillos influye sobre la intensidad del color final que se obtiene. El pipeteo manual, que puede ser muy suave y conducir a una elevada formación de color, sólo se recomienda ante la ausencia de alternativas, como el llenado de los pocillos por inmersión, el uso de un dispensador de lavado manual multicanal o el uso de un aparato de lavado automático.
7. Añada 100 μL de Sustrato TMB (suministrado para su uso sin diluir) en cada micropocillo. Se recomienda utilizar una micropipeta multicanal a fin de reducir el tiempo de pipeteo. Cubra los pocillos e incúbelos durante 15 minutos exactamente a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Ponga en marcha el cronómetro al llenar el primer pocillo.
8. Añada 100 μL de Solución de Parada (suministrado para su uso sin diluir) a cada pocillo, manteniendo la misma secuencia y ritmo de pipeteo que en la etapa 7. Mezcle el contenido agitando suavemente durante 20 segundos, evitando provocar salpicaduras. Lea los pocillos antes de que hayan transcurrido 30 minutos.
9. Lea las absorbancias de los pocillos a 450 nm en un lector de placas de ELISA utilizando una longitud de onda de referencia 650 ó 620 nm. Si no se dispone de una longitud de onda de referencia, el valor de absorbancia obtenido en el pocillo de blanco del reactivo se resta de cada uno de los demás valores antes de realizar otros cálculos.

RESUMEN ESQUEMÁTICO



CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Para calcular los resultados, se deben utilizar los valores exactos impresos en las etiquetas de los calibradores y en el certificado de QC.

El principio básico consiste en dibujar una curva de calibración representando la media de los valores duplicados de la absorbancia para cada Calibrador NGAL Rapid en el eje y, en función de las correspondientes concentraciones de NGAL en ng/mL en el eje x. La curva de calibración debe cumplir los requerimientos de validación (véase más

abajo). Posteriormente se calcula la concentración de NGAL de cada muestra diluida localizando el punto sobre la curva correspondiente a la media de los valores duplicados de la absorbancia para la muestra diluida y leyendo en el eje x su concentración correspondiente en ng/mL. La concentración de NGAL en la muestra sin diluir se calcula multiplicando este resultado por el factor de dilución de la muestra.

Este procedimiento puede realizarse de forma manual empleando un papel gráfico con escalas x e y lineales. Puede dibujarse una curva suavizada a través de los puntos o se pueden unir los puntos adyacentes mediante líneas rectas. Es posible que este último procedimiento estime por exceso los valores de concentración entre los puntos cuando la curva sea ligeramente convexa hacia la izquierda, lo que ocurre habitualmente. Aunque la curva puede aproximarse a una línea recta, es incorrecto, desde el punto de vista tanto práctico como teórico, calcular y dibujar la línea recta que mejor se ajuste y leer los resultados a partir de la misma.

De igual modo, el procedimiento puede realizarse con ayuda de un programa de software incluido en el lector de placas de ELISA que incorpore procedimientos de ajuste de curvas. Debe elegirse el procedimiento que emplee ejes x e y lineales con un ajuste de curva logística de 4 parámetros. Las muestras diluidas que proporcionen un valor medio de la absorbancia superior al correspondiente al Calibrador NGAL Rapid 6, o inferior al correspondiente al Calibrador NGAL Rapid 2, se encuentran fuera del intervalo del ensayo y sus concentraciones han de indicarse como >20 ng/mL y <0,2 ng/mL, respectivamente. Las concentraciones correspondientes de las muestras sin diluir se calculan como >(20 x factor de dilución) ng/mL y <(0,2 x factor de dilución) ng/mL, respectivamente. En caso necesario, se pueden repetir los análisis de estas muestras con diluciones mayores o menores para las muestras con lecturas altas y bajas, respectivamente. Los nuevos factores de dilución deben ser aquellos que se estimen necesarios para conseguir unos valores de absorbancia que se encuentren holgadamente dentro del intervalo de

la curva de calibración, pero no deben emplearse diluciones inferiores a 1/25.

VALIDACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

La absorbancia media del Calibrador NGAL Rapid 6 debe ser $>1,5$. La absorbancia media de cualquier Calibrador NGAL Rapid debe ser superior a la del Calibrador NGAL Rapid anterior. Por ejemplo, absorbancia (Calibrador NGAL Rapid 6) $>$ absorbancia (Calibrador NGAL Rapid 5). Al representar los resultados en ejes lineares la curva debe ser ligeramente convexa.

Puntos desalineados para calibradores individuales:

es posible que uno o más calibradores individuales produzcan unas lecturas de absorbancia anómalas. Uno o ambos valores duplicados pueden estar desalineados y es posible que la media de los duplicados se encuentre desalineada. Este error es significativo siempre que perjudique el ajuste satisfactorio de la curva mediante el método logístico de 4 parámetros que, como resultado del valor anómalo, se separa de otros puntos de calibradores que son realmente correctos. Deben examinarse siempre los puntos de los calibradores y la curva ajustada a fin de comprobar que el ajuste es correcto antes de aceptar cualquier cálculo de concentración obtenido a partir de estos. Asimismo, un valor elevado de la suma de cuadrados residuales pondrá de manifiesto una curva mal ajustada. En el caso de que sólo se vea afectado un calibrador, siempre que no sea el calibrador más alto, se pueden tomar dos acciones:

i) Puede eliminarse de la curva un valor simple o duplicado erróneo y ajustar de nuevo el resto de los valores mediante el procedimiento logístico de 4 parámetros. Si se obtiene una curva satisfactoria, es posible calcular resultados de concentración provisionales a partir de la misma.

ii) Si no se puede obtener un ajuste satisfactorio de esta forma, pero la curva parece coherente por lo demás, pueden obtenerse resultados provisionales mediante líneas rectas o realizando un ajuste simple de spline cúbico entre las medias de los duplicados, omitiendo el punto erróneo.

En caso de que dos o más calibradores se vean afectados, debe repetirse el análisis.

Un resultado desviado de un calibrador individual puede deberse a un error del investigador o al deterioro del calibrador. Si ambos valores duplicados se encuentran constantemente desalineados en los análisis sucesivos, se deduce que el calibrador no es correcto y debe omitirse.

TRAZABILIDAD DEL VALOR DEL CALIBRADOR

La concentración de NGAL del material calibrador diluido se ha asignado por comparación en un ELISA con una preparación purificada de NGAL humana recombinante cuantificada en Rigshospitalet, Copenhague, Dinamarca.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La detección de un nivel elevado de NGAL en orina, plasma o suero no indica por sí sola la presencia de ninguna patología única. Según se indicó en la introducción, numerosas patologías independientes están asociadas con unos niveles elevados de NGAL en orina o en plasma. Los médicos deben interpretar el significado de cualquier nivel elevado de NGAL a la vista de las características clínicas de cada paciente.

Se determinó la capacidad de los niveles de NGAL en orina y en plasma para diagnosticar la insuficiencia renal aguda como consecuencia, supuestamente, de una lesión renal en 60 pacientes ingresados consecutivamente en una unidad de cuidados intensivos no especializada. Los pacientes fueron clasificados en función de mostrar o no signos de insuficiencia renal determinados por otros criterios. Muchos de estos pacientes presentaron septicemia concurrente y algunos de ellos padecían cáncer. Los niveles más elevados de NGAL en cada paciente se asociaron con la insuficiencia renal aguda, según se muestra:

INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

Muestra	Orina	Plasma
Valor límite	350 ng/mL	400 ng/mL
Especificidad diagnóstica	89,3%	96,3%
Sensibilidad diagnóstica	96,9%	84,8%
Valor predictivo positivo	91,2%	93,1%
Valore predictivo negativo	96,2%	83,9%

Una concentración de NGAL en orina superior a 350 ng/mL o en plasma superior a 400 ng/mL se debe muy probablemente (>90%, valor predictivo positivo) a una lesión renal que puede conducir a una insuficiencia renal aguda.

Las concentraciones de NGAL inferiores al valor límite pueden indicar la ausencia total de lesión renal, o una leve lesión, en esta población de pacientes.

Un aumento repentino de la concentración urinaria de NGAL por encima de los valores previos del paciente puede indicar una lesión renal, incluso si no se supera el valor límite, y en este caso se recomienda un seguimiento exhaustivo de la función renal.

CONTROL DE CALIDAD

Los laboratorios que pretendan realizar análisis repetidos deben establecer sus propios sueros u orinas de control de lectura alta y de lectura baja, almacenados en pequeñas alícuotas (por ejemplo 50 µL) y a temperaturas de -70°C o inferiores. Debe descongelarse una alícuota de cada uno de ellos y analizarse en cada análisis, manteniendo un registro de los resultados sucesivos. Esto sirve como control del funcionamiento de la prueba, de su integridad y de la fiabilidad del investigador. Deben examinarse los resultados para comprobar

la presencia de desplazamientos (tendencia a que los valores obtenidos sucesivamente aumenten o disminuyan) o de desviaciones significativas con respecto a la media de los resultados previos. Puede considerarse que los valores que no se desvíen más de un 20% de la media de los valores previos indican la aceptabilidad del análisis. Las alícuotas del suero control no deben volver a congelarse (para repetir el análisis) una vez descongelados y, en caso de que se realice un análisis adicional, deben emplearse nuevas alícuotas de control, así como diluciones recién preparadas de las muestras de los pacientes.

LIMITACIONES

La detección de un nivel elevado de NGAL en orina, plasma o suero no indica por sí sola la presencia de ninguna patología única. Según se indicó en la introducción, numerosas patologías independientes están asociadas con unos niveles elevados de NGAL en orina o en plasma. Los médicos deben interpretar la significación de cualquier nivel elevado de NGAL a la vista de las características clínicas de cada paciente.

Los valores límites indicados en el apartado de Interpretación de los resultados se basan en los valores máximos de la población de pacientes descrita, caracterizada por la presencia de numerosos factores de confusión. Otros valores límite, quizás inferiores, pueden resultar adecuados para otros grupos de pacientes que presenten un menor número de factores de confusión. Los aumentos repentinos de NGAL pueden indicar una lesión renal aguda, aun cuando no superen los valores límite.

RESULTADOS ESPERADOS

La concentración media de NGAL en las muestras procedentes de donantes sanos fue de 63 ng/mL (intervalo 37–106 ng/mL, n = 80) en plasma EDTA y de 5,3 ng/mL (intervalo 0,7–9,8 ng/mL, n = 7) en orina. En los pacientes no seleccionados, ingresados en la unidad de cuidados intensivos, las concentraciones de NGAL se encontraron entre 9 ng/mL y 40.000 ng/mL (40 µg/mL) en orina (n = 60) y entre 25 ng/mL y

3491 ng/mL en plasma EDTA (n = 60).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección: La concentración mínima de NGAL que produjo una lectura de absorbancia superior a 2 SD por encima de la lectura media del cero (NGAL Rapid Calibrator 1) (n = 8) resultó ser 0,008 ng/mL, siendo este resultado inferior al valor del NGAL Rapid Calibrator 2.

Precisión: la variación intraanálisis se determinó mediante la valoración de NGAL en 2 muestras de orina y en 2 muestras de plasma, con 8 replicados en cada caso. Se obtuvieron los siguientes resultados (CV = coeficiente de variación):

Muestras	CV
Orina A	3,4%
Orina B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

La variación interanálisis de determinó mediante la valoración de NGAL en 2 muestras de orina diluidas y en 2 muestras de plasma EDTA diluidas, con 2 repeticiones cada una, en 4 análisis independientes. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras	CV
Orina A	4,7%
Orina B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Recuperación analítica: se añadió NGAL humana recombinante a distintas muestras de orina y de plasma, y se analizaron siguiendo el análisis. Se calculó la recuperación como valor medido/valor esperado, expresado como porcentaje.

Muestra	Medido (intervalo)	Esperado (intervalo)	Recuperación (intervalo)
Orina	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93%-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83%-90%

Linealidad: se midió la proteína NGAL en diluciones en serie (n = 8) de 2 muestras de orina y 2 muestras de plasma. El CV de la media de los valores medidos, corregido según la dilución, fue de 9,9% y 12,5% en el caso de las dos muestras de orina y de 12,2% y 7,4% en el caso de las dos muestras de plasma, demostrando una linealidad satisfactoria.

Material de muestra: los análisis de las muestras de suero, plasma EDTA u orina no mostraron diferencias significativas en cuando a recuperación analítica, linealidad o precisión. No obstante, las concentraciones de NGAL son con frecuencia ligeramente superiores en suero que en plasma²³, esto se debe, probablemente, a la liberación de NGAL desde los neutrófilos durante la coagulación de la sangre.

Especificidad: se ha demostrado que los dos anticuerpos monoclonales frente a NGAL humana empleados en este análisis se unen a distintas preparaciones de NGAL humana recombinante, dando lugar a una única banda de 25 kDa en un análisis de transferencia Western de un sobrenadante posnuclear reducido procedente de neutrófilos humanos²⁵.

RESPONSABILIDAD

Destinado únicamente para uso diagnóstico *in vitro* en determinados países. Visite www.bioporto.com para consultar la disponibilidad en su país.

Este kit está pensado únicamente para la determinación cuantitativa *in vitro* de NGAL en orina, suero o plasma EDTA humano.

El kit sólo está pensado para su uso por parte de personal cualificado que realice actividades de investigación y diagnóstico.

Si el receptor de este kit lo transfiere de cualquier forma a un tercero, es imperativo incluir estas instrucciones, y dicho receptor debe por su cuenta y riesgo garantizar en favor de BioPorto Diagnostics A/S todas las limitaciones de responsabilidad respecto al mismo.

BioPorto Diagnostics A/S no será responsable de cualquier daño o pérdida debido al uso de este kit de cualquier modo distinto a lo indicado expresamente en estas instrucciones.

La responsabilidad de BioPorto Diagnostics A/S no excederá en ningún caso del valor comercial del kit.

BioPorto Diagnostics A/S no será responsable, bajo ninguna circunstancia, de los daños indirectos, especiales o resultantes incluyendo, sin limitación, la pérdida de beneficios.

Revision: NR2010-05-EN-DA
Læs venligst vejledningen nøje

TILSIGTET ANVENDELSE

Til *in vitro*-bestemmelse af human NGAL i urin, plasma eller serum som marker af akut nyreskade, som kan medføre akut nyresvigt.

INDLEDNING

NGAL (neutrofil gelatinase-associeret lipokalin) blev opdaget for første gang i 1989¹, og som det fremgår af navnet, tilhører det lipocalin-familien af proteiner. Disse er typisk små udskilte proteiner, som er karakteriseret ved deres evne til at binde små, hydrofobe molekyler i en strukturelt bevaret lomme formet af β -Sheets, samt at binde sig til specifikke celleoverfladerceptorer og at danne makromolekylære komplekser. NGAL blev fuldt karakteriseret og navngivet i 1993², men har mange synonymer: Det er også kendt som NL (neutrofil lipokalin; HNL: Human NL)³, lipokalin 2, onkogen protein 24p3⁴ eller uterocalin⁵ (hos mus) og *neu*-relateret lipokalin⁶ eller 25 kDa α_2 -microglobulin-relateret protein⁷ (hos rotter). Humant NGAL består af en enkelt disulfid-koblet polypeptidkæde af 178 aminosyrerester med en beregnet molekylærmasse på 22 kDa², men glycosylering øger dets molekylærmasse til 25 kDa. I neutrofiler (neutrofile polymorfnukleare leukocytter) forekommer NGAL som monomere og dimere, med en lille procentdel af trimere, og det forekommer også i kompleks med 92-kDa human neutrofil type IV collagenase, også kaldet gelatinase B eller matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)⁸.

NGAL blev oprindeligt isoleret fra supernatanten af aktiverede humane neutrofiler¹, men det udtrykkes også på lavt niveau i andet humant væv, herunder nyrerne, prostata og epiteler i luftvejene og mave-tarmkanalen^{9,10}. Det udtrykkes stærkt i adenomer og inflammert epitel i tarmene¹¹, adenokarcinomer i brystet¹² og uroteliale karcinomer¹³.

På grund af den ringe molekylstørrelse og modstand mod nedbrydning udskilles og detekteres NGAL nemt i urinen, både i fri form og i kompleks med

MMP-9. Urinniveauer korrelerer med plasmaniveauer uanset årsagen til den øgede NGAL-produktion¹⁴, men der kan forventes specielt høje urinniveauer når NGAL frigives direkte til urinen af nyretubuli eller uroteliale karcinomer. Det er uvist, i hvor høj grad NGAL-MMP-9 komplekser fra kilder uden for urinvejene udskilles som sådan i urinen eller gendannes i urinen efter uafhængig udskillelse af NGAL og MMP-9⁸.

NGAL's funktioner er ikke fuldstændigt forstået, men det lader til at NGAL blive opreguleret i cellerne under "stress", f.eks. fra infektion, inflammation eller neoplastisk transformation, eller i væv, der gennemgår involuotion, så som postpartum museuterus og mælkekirter ved afvænning⁵. I relation til en mulig antibakteriel rolle binder NGAL enterobactin og andre siderophorer, og derved berøver mikroorganismerne Fe^{3+} , et vigtigt ernæringsbehov¹⁵. Komplekسدannelsen med MMP-9 lader til at beskytte MMP-9 enzymatisk aktivitet mod nedbrydning⁸. Opreguleringen af NGAL ved involuotion af væv har medført postulatet om, at det spiller en rolle ved apoptose, men det virker mere sandsynligt, at NGAL er forbundet med en overlevelsereaktion¹⁶.

NGAL og nyren. Så tidligt som i 1989 fandtes NGAL (24p3) at blive udtrykt af muse-nyreceller, hvor det gennemgik en tidlig, drastisk opregulering (14 til 20 gange) som reaktion på SV40 viral infektion¹⁷. En tilsvarende tidlig og drastisk opregulering blev efterfølgende observeret i andre former for nyreskade, og forhøjede plasmaniveauer af NGAL var stærkt korreleret med nedsat nyrefunktion hos patienter med nyreskade som følge af systemisk vaskulit¹⁸. NGAL-niveauer i urin fungerer som en tidlig marker af akut nyreskade efter cardiopulmonal bypasskirurgi^{19,20}, og både urin- og plasmaniveauer giver en tidlig varsel om akut nyreskade hos uselektede kritisk syge patienter under intensiv behandling²¹. Forhøjede NGAL-niveauer i urin og plasma er også observeret hos patienter med kroniske nyresygdomme²² og patienter med fungerende nyretransplantater udviste ligeledes forhøjede urinniveauer (detekterbare med Western blotting)¹³. Det lader således til, at en række forskellige nyreilidelser er forbundet med forhøjede NGAL-niveauer i plasma og urin. Selvom NGAL-niveauer er nøje

korreleret ved akutte lidelser, må det forventes at NGAL-niveauer i urin vil være særligt høje efter en nyreskade, som er tilstrækkeligt alvorlig til at medføre akut nyresvigt, akut tubulær nekrose eller akut tubulo-interstitiel nefropati. Ved anvendelse af NGAL i urin som markør af nyrelidelser forudsættes dog, at der er taget højde for andre samtidige sygdomstilstande, som er uafhængigt forbundet med forhøjede NGAL-niveauer.

NGAL ved inflammation/infektion. NGAL udløses af de specifikke granula i aktiverede neutrofiler^{1,2} og niveauer i serum stiger i inflammatoriske eller infektiøse tilstande, specielt ved bakterielle infektioner²³. Serum NGAL er således blevet foreslået som en markør for bakteriel infektion. Men da NGAL-niveauer også kan være forhøjede ved neoplastiske lidelser og nyresygdomme, uafhængigt af infektionsprocesser, skal den foreslåede anvendelse behandles med forsigtighed. NGAL kan også være forhøjet ved infektioner hos patienter med et umåleligt lavt antal neutrofiler som følge af leukæmi eller behandlet leukæmi, hvilket viser, at kilden til det forhøjede NGAL ved infektioner ikke alene er neutrofilerne.

NGAL og neoplas. De forskellige typer cancer, hvor NGAL kan opreguleres (ofte med MMP-9) er blevet nævnt ovenstående. Dette har vist sig ved udtryk i tumorceller og dets høje niveauer i urin såvel i fri form som kompleks med MMP-9⁸. Det er blevet foreslået, at NGAL-MMP-9 komplekser i urin kan fungere som sygdomsstatusmarkør for brystcancerpatienter²⁴. Plasma-niveauer er normalt ikke blevet målt i disse tilfælde.

PRINCIPPET I ANALYSE-PROCEDUREN

Analysen er en ELISA udført i mikrotiterbrønde coated med et monoklonalt antistof mod humant NGAL. Bundet NGAL detekteres med et peberrod-speroxidase (HRP)-konjugeret monoklonalt antistof, og analysen fremkaldes ved inkubation med et farvedannende substrat. Analysen er en hurtig 2-trins procedure:

Trin 1. Alikvoter af kalibratorer, fortyndede prøver og eventuelle kontroller inkuberes med HRP-konjugeret detektionsantistof i de coatede

mikrotiterbrønde. Kun NGAL vil binde sig til både coating og detektionsantistof, mens ubundet materiale fjernes ved vask.

Trin 2. Et kromogent peroxidasesubstrat indeholdende tetramethylbenzidin (TMB) tilsættes til hver mikrotiterbrønd. Det HRP, der er knyttet til det bundne detektionsantistof, reagerer med substratet og genererer et farvet produkt. Den enzymatiske reaktion stoppes kemisk, og farveintensiteten aflæses ved 450 nm i en ELISA-læser. Farveintensiteten (absorbans) er en funktion af koncentrationen af NGAL, der oprindeligt blev tilsat hver enkelt brønd. Resultaterne for kalibratorerne bruges til at konstruere en kalibreringskurve hvorfra koncentrationerne af NGAL i prøverne aflæses.

KIT-KOMPONENTER

Enhed	Indhold	Antal
①	12 x 8 coatede Mikrotiterbrønde + Ramme	96 brønde
②	5x Prøvediluent konc.	1 x 60 mL
③-⑤	NGAL Rapid kalibrator 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	25x Vaskeopløsningskonc.	1 x 30 mL
⑤	HRP-konjugeret NGAL Antistof	1 x 6 mL
⑥	TMB Substrat	1 x 12 mL
⑦	Stop-opløsning	1 x 16 mL
⑧	Polypropylen U-Mikrotiterplade	96 brønde

Bemærk: Flydende reagenser indeholder konserveringsmidlerne thimerosal eller Bronidox L. Disse kan være sundhedsskadelige ved indtagelse.

NØDVENDIGE MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER

1. Justerbare mikropipetter, der dækker området 1-1000 µL, og tilsvarende engangspipettespidser
2. Polypropylenflasker, der kan rumme op til 1000 µL
3. Reagensglasracks
4. Justerbar 8- eller 12-kanals mikropipette (50-250 µL-området) eller repeterende mikropipette (valgfri)
5. Rene 1 L og 500 mL cylinderglas
6. Deioniseret eller destilleret vand
7. Låg til mikrotiterplade
8. Ren beholder til fortyndet vaskeopløsning
9. Apparat til fyldning af brønde under vaskeproceduren (valgfrit)
10. Fugfri papirservietter eller sugende papir
11. Engangs pipetteringsbeholdere
12. Timer (60 min.-område)
13. Kalibreret ELISA pladeaflæser, som kan aflæse ved 450 nm (og helst fratrække referenceværdier ved 650 eller 620 nm)
14. Natriumhypochlorit (husholdningsblegemiddel i opløsning 1:10) til dekontaminering af prøver, reagenser og materialer

FORSIGTIGHEDSREGLER

Kun til *in vitro* diagnostisk anvendelse.

1. Dette kit bør kun anvendes af uddannet laboratoriepersonale.
2. Brug separate pipettespidser for hver enkelt prøve, kalibrator og reagens for at undgå krydskontamination.
3. Brug separate beholdere for hvert enkelt reagens. Dette gælder især for TMB-Substratet.
4. Dekontaminer alle prøver, reagenser og materialer efter brug ved at lægge dem i natriumhypochlorit-opløsning (husholdningsblegemiddel i opløsning 1:10) i mindst 30 minutter.
5. For at undgå dråbedannelse under vaskningen suges vaskeopløsningen op i en flaske med blegemiddel.
6. Undgå udledning til miljøet. Bortskaf beholdere og ubrugt indhold på en sikker måde og i

- overensstemmelse med nationale og lokale bestemmelser.
7. Stop-opløsningen indeholder 0,5 mol/L svovlsyre og kan forårsage irritation eller ætsninger på hud og øjne. Ved kontakt skylles der straks grundigt med rigeligt vand, og læge kontaktes.
8. Byt ikke rundt på komponenter fra kits med forskellige batch-numre. Komponenterne er standardiseret som en enhed for et givet batch.
9. Hæmolyserede hyperlipæmiske, varmebehandlede eller kontaminerede prøver kan give fejlbehæftede resultater.
10. Fortynd ikke kliniske prøver direkte i coatede mikrotiterbrønde.
11. Undgå at berøre eller skrabe bunden af de coatede mikrotiterbrønde ved pipettering eller aspiration af væske.
12. Andre inkubationstider og temperaturer end de angivne kan medføre fejlbehæftede resultater.
13. Lad ikke brøndene tørre ud, når analysen er påbegyndt.
14. TMB-Substratet er lysfølsomt. Opbevares beskyttet mod stærkt lys.
15. Undgå at genbruge mikrotiterbrønde eller hælde reagenser tilbage i deres flasker, når de først er hældt op.

STABILITET OG OPBEVARING

1. Opbevar kittet med alle reagenser ved 2-8°C. Må ikke nedfryses.
2. Brug alle reagenser før udløbsdatoen på kit-kasse etiketten.
3. Fortyndet Vaskeopløsning er holdbar i 4 uger ved 2-8°C. Hvis ikke alle brønde skal bruges, fortyndes kun den nødvendige del af Vaskeopløsningskoncentratet.
4. Fortyndt Prøvediluentkoncentrat er holdbart i 24 timer ved 2-8°C. Hvis ikke alle brønde skal bruges, fortyndes kun den nødvendige del af Prøvediluentkoncentratet.
5. Til senere brug opbevares ubrugte brønde i foliebrevet med det medfølgende tørremiddel og forsejles. Lad altid foliebrevet varme op til stuetemperatur, før det åbnes, for at undgå

kondens i/på de coatede mikrotiterbrønde.

PRØVETAGNING

Alle blod-deriverede prøver eller urinprøver skal behandles og bortkastes, som om de var potentielt smittefarlige. Se Sikkerhedsforsaltninger, afsnit 2, 4 og 5.

Bestemmelse af NGAL i en enkelt prøve kræver 10 µL urin, plasma eller serum. Blodprøver bør tages aseptisk i EDTA-glas eller almindelige glas af kvalificeret personale med godkendt venepunkturteknikker. Plasma eller serum bør præpareres efter standardteknikker for klinisk laboratorietestning. Urin bør centrifugeres. Sæt hætte på de præparerede kliniske prøver. Hvis analysen ikke kan gennemføres inden for 24 timer, eller prøverne skal sendes, fryses prøverne ned til -20°C eller derunder. For langtidsopbevaring af kliniske prøver anbefales -70°C eller derunder. Undgå gentagen nedfrysning og optøning. Brug aldrig hæmolyserede, hyperlipæmiske, varmebehandlede eller kontaminerede prøver.

PRÆPARERING AF REAGENSER

- Lad alle prøver og reagenser varme op til stuetemperatur (20-25°C) før brug. Bland prøverne omhyggeligt ved forsigtigt at vende dem og fjern om nødvendigt synlige partikler ved lavhastigheds-centrifugering.
- Bestem antallet af prøver, der skal testes (som dobbeltbestemmelse) plus eventuelle interne laboratoriekontrolprøver (som dobbeltbestemmelse) plus eventuelle blankprøver. De coatede brønde kan benyttes som strips med 8 eller som individuelle brønde. Enkelbrønde behandles ved at brække de enkelte brønde fra hinanden og placere hver enkelt brønd i rammen på et passende sted. De enkelte brønde kan identificeres med bogstaver og hak. Tilføj 12 brønde til de 6 kalibratorer (dobbeltbestemmelse). Udtag det antal brønde, der skal bruges, og læg resten tilbage i foliebrevet igen sammen med tørremidlet og opbevar det ved 2-8°C.
- Vaskeopløsning: Fortynd 25x Vaskeopløsningskoncentratet ved at hælde hele indholdet

af flasken (30 mL) i en 1-L målecylinder og tilsætte destilleret eller deioniseret vand til et endeligt volumen på 750 mL. Bland omhyggeligt og opbevar ved 2-8°C efter brug. Hvis ikke alle brøndene skal bruges, fortyndes kun den påkrævede mængde vaskeopløsningskoncentrat med 24 dele vand, så man får en opløsning 1:25.

- Prøvediluent: Fortynd 5x Prøvefortyndingskoncentratet (indeholder rød farve for at hjælpe ved pipettering) ved at hælde hele indholdet af flasken (60 mL) i en 500-mL målecylinder og tilsætte destilleret eller deioniseret vand til et endeligt volumen på 300 mL. Bland omhyggeligt og opbevar ved 2-8°C efter brug. Hvis ikke alle brøndene skal bruges, fortyndes kun den påkrævede mængde prøvefortyndingskoncentrat med 4 dele vand, så man får en opløsning 1:5.
- NGAL Rapid-kalibratorer (indeholder rød farve for at hjælpe ved pipettering): De aktuelle koncentrationer er angivet på etiketterne. Fortynd ikke yderligere.
- HRP-konjugeret NGAL-Antistof (klar til brug): Fortynd ikke yderligere.
- TMB-Substrat (klar til brug): Fortynd ikke yderligere.
- Stop-opløsning (klar til brug): Fortynd ikke yderligere.

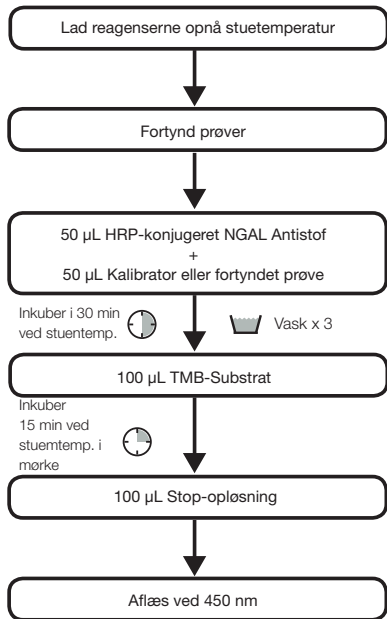
PRÆPARERING AF PRØVER

Det område for standardkurven er 0,2-20 ng/mL og det diagnostisk relevante område er 100-500 ng/mL for plasma eller serum og 50-500 ng/mL for urin (se Resultatfortolkning). Derfor anbefales en indledende screeningsfortynding på 1:100 for plasma eller serum og 1:50 for urin. 1:100-fortyndingen kan klargøres ved at fortynde 10 µL plasma eller serum i 990 µL prøvediluent og fortyndingen 1:50 kan klargøres ved at fortynde 10 µL urin i 490 µL prøvediluent. Fortyndingerne blandes ved inversion eller moderat vortex-blanding. Det kan være nødvendigt at gentage analysen ved prøver, der ligger uden for standardkurvens område, ved lavere eller højere fortynding. Der bør ikke anvendes

anvendes fortyndinger lavere end 1:25.

ANALYSEPROCEDURE

1. Klargør analyseprotokollen ved at tildele et passende antal brønde til opsætning af kalibratorer, fortyndede patientprøver og eventuelle interne laboratoriekontroller til dobbeltbestemmelse. Hvis en referencebølgelængde på 650 eller 620 nm ikke er tilgængelig på ELISA-aflæseren, kan der tildeles en blankprøve. Denne opsættes med 50 µL prøvediluent i stedet for fortyndet prøve og behandles som de øvrige brønde.
2. Fortynd prøver i henhold til de forventede NGAL-koncentrationer (1:100 for plasma eller serum og 1:50 for urin vil være velegnet for de fleste prøver).
3. Pipetter et tilstrækkeligt volumen af hver enkelt kalibrator, hver enkelt fortyndet prøve og eventuelle interne laboratoriekontroller i de tildelte brønde på polypropylen-U-Mikrotiterpladen for at muliggøre efterfølgende overførsel af 50 µL voluminer til de tilsvarende coatede mikrotiterbrønde.
4. Pipetter 50 µL voluminer HRP-konjugeret NGAL-Antistof i de tilsvarende positioner i de coatede mikrotiterbrønde. Overfør dernæst med en flerkanals pipette hurtigt 50 µL voluminer af kalibratoropløsningerne, de fortyndede prøver og de interne kontroller fra U-brøndene til de tilsvarende coatede brønde, som allerede indeholder detektionsantistoffet. Denne form for prøvetilsætning anbefales for at reducere forskellen i inkubationstid mellem de første og de sidste prøver, der tilføres de coatede mikrotiterbrønde.
5. Tildæk brøndene og inkubér i **30 minutter** ved stuetemperatur på et rystebord ved 200/minut.
6. Aspirér indholdet af mikrotiterbrøndene og vask mikrotiterbrøndene tre gange med mindst 300 µL af den i forvejen fortyndede vaskeopløsning. Hvis vasken foretages manuelt, tømmes mikrotiterbrøndene ved vende pladen om og ryste den forsigtigt i en egnet beholder og derefter duppe pladen i vendt tilstand på en papirserviet. En hviletid på 1 minut anbefales før tømning, i hvert fald ved cyklussens sidste vaskecyklus. Den kraft, hvormed den fortyndede vaskeopløsning fyldes i eller tømmes ud fra brøndene, påvirker den endelige farveudvikling. Manuel pipettering, som kan være meget skånsom kan medføre en høj farveudvikling og anbefales kun, hvis der ikke er andre alternativer, så som påfyldning af brøndene ved nedsmækning, brug af flerkanals manuel vaskedispenser, eller brug af automatisk vaskeapparat.
7. Fordel 100 µL TMB-Substrat (klar til brug) i hver mikrotiterbrønd. Det anbefales at bruge en flerkanals mikropipette for at mindske pipetteringstiden. Tildæk brøndene og inkubér i **nøjagtigt 15 minutter** ved stuetemperatur i mørke. Start uret ved fyldning af den første brønd.
8. Tilsæt 100 µL Stop-opløsning (klar til brug) til hver enkelt brønd og følg den samme pipetteringsrækkefølge og hastighed som i Trin 7. Bland ved at ryste forsigtigt i 20 sekunder, undgå at spilde. Aflæs brøndene inden for 30 minutter.
9. Aflæs brøndenes absorbans ved 450 nm i en egnet mikrotiterpladeaflæser (referencebølgelængde 650 eller 620 nm). Hvis en referencelængde ikke er tilgængelig, trækkes værdien af blankprøven fra de øvrige værdier, før der foretages andre beregninger.

SKEMATISK OVERSICHT**BEREGNING AF RESULTATER**

Til beregning af resultater bør man anvende de nøjagtige værdier af kalibratorerne, der er trykt på kalibratorernes etiketter og på QC-certifikatet.

Det grundlæggende princip er at konstruere en kalibreringskurve ved at indføre gennemsnit af dobbeltbestemelses-absorbansværdier for hver enkelt NGAL Rapid-kalibrator på y-aksen mod de tilsvarende NGAL-koncentrationer i ng/mL på x-aksen. Kalibreringskurven skal opfylde valideringskravene. NGAL-koncentrationen af hver enkelt

fortyndet prøve findes dernæst ved at lokalisere det punkt på kurven, der svarer til gennemsnittet af de dobbeltbestemte absorbansværdier for den fortyndede prøve og aflæse dens tilsvarende koncentration i ng/mL ud fra x-aksen. Koncentrationen af NGAL i den ufortyndede prøve beregnes ved at multiplicere dette resultat med prøvefortyndingsfaktoren.

Denne procedure kan foretages manuelt ved hjælp af kurvepapir med lineære x- og y-skalaer. Der kan trækkes en jævn kurve gennem punkterne, eller nærliggende punkter kan forenes med lige linjer. Sidstnævnte procedure kan overvurdere koncentrationens værdierne mellem punkterne en smule, hvis kurven er lidt konveks til venstre, hvilket er det typiske fund. Selv om kurven kan nærme sig en lige linje, er det både praktisk og teoretisk ukorrekt at beregne og trække en lige linje med den bedste tilpasning og aflæse resultaterne ud fra dette.

Proceduren kan også foretages af en ELISA-læseres software-program, der indeholder kurvepasningsprocedurer. Den foretrukne procedure er at benytte lineære x- og y-akser med 4-parameter logistisk kurvepasning. Fortyndede prøver, som giver en gennemsnitsabsorbans over det, der gælder for NGAL Rapid Kalibrator 6 eller under det, der gælder for NGAL Rapid Kalibrator 2, er uden for analyseområdet, og deres koncentrationer bør noteres som henholdsvis >20 ng/mL og $<0,2$ ng/mL. De tilsvarende koncentrationer i de ufortyndede sera beregnes, henholdsvis $>(20 \times \text{fortyndingsfaktor})$ ng/mL og $<(0,2 \times \text{fortyndingsfaktor})$ ng/mL. Om nødvendigt kan disse prøver omanalyseres ved højere eller lavere fortyndinger for henholdsvis for højt eller for lavt flæste prøver. De nye fortyndingsfaktorer bør være dem, der er skønnet at give absorbansværdier, der falder inden for kalibreringskurvens område, men der bør ikke anvendes fortyndinger på mindre end 1:25.

VALIDERING AF KALIBRERINGSKURVEN

Den gennemsnitlige absorbans for NGAL Rapid Kalibrator 6 bør være $>1,5$. Den gennemsnitlige absorbans for enhver NGAL Rapid-kalibrator bør være højere end absorbansen for den foregående NGAL-kalibrator, f.eks. absorbans (NGAL Rapid

Kalibrator 6) > absorptions (NGAL Rapid Kalibrator 5). Kurven skal være let konvex til venstre, når resultaterne indføres på lineære akser.

Punkter uden for linjen for individuelle kalibratorer:

En eller flere individuelle kalibratorer kan give anormale absorptionsaflysninger. Den ene eller begge dobbeltbestemmelsesværdier kan være uden for linjen, og gennemsnittet af dobbeltbestemmelserne kan være uden for linjen. Denne fejl er signifikant, hvis den hæmmer tilfredsstillende kurvepasning efter den 4-parameters logistiske metode, der – som følge af den anormale værdi – flyttes væk fra de andre kalibratorpunkter, som faktisk er korrekte. Kalibratorpunkterne og den tilpassede kurve skal altid undersøges for korrekt pasning, før der accepteres nogen beregninger af koncentration ud fra dem. En kurve med dårlig pasning vil også blive afsløret ved en høj residual kvadratsumsafvigelse. Hvis kun en kalibrator påvirkes, og det ikke er den højeste kalibrator, er der to mulige handlingsforløb:

i) Et fejlbehæftet enkelt- eller dobbeltbestemmelsesresultat skal fjernes fra kurven, og de resterende resultater genindsættes efter den 4-parameters logistiske procedure. Hvis der opnås en tilfredsstillende pasning, kan der beregnes provisoriske koncentrationsresultater ud fra dem.

ii) Hvis der ikke kan opnås nogen tilfredsstillende pasning på denne måde, men kurven i øvrigt er konsistent, kan provisoriske resultater opnås fra lige linjer eller simpel "kubisk spline" pasning mellem gennemsnittet af dobbeltbestemmelserne, hvor det fejlbehæftede punkt udelades.

Hvis to eller flere kalibratorer påvirkes, bør analysen laves om.

Et afvigende resultat for en enkelt kalibrator kan skyldes en betjeningsfejl eller en ødelagt kalibrator. Hvis begge dobbeltbestemmelses værdier konsekvent er uden for linjen ved flere på hinanden følgende analyser, er kalibratoren fejlbehæftet og bør udelades.

KALIBRATORVÆRDIENS SPORBARHED

NGAL-koncentrationen i fortyndet kalibratormate-

riale er opnået ved sammenligning i ELISA med et oprenset præparat af rekombinant humant NGAL kvantificeret af Rigshospitalet i København.

RESULTATFORTOLKNING

Fundet af et forhøjet NGAL-niveau i urin, plasma eller serum kan ikke tjene som en uafhængig diagnosticering af en enkelt patologi. Som nævnt i indledningen er en række forskellige enkelte patologier forbundet med forhøjede NGAL-niveauer i urin eller plasma. Læger skal fortolke betydningen af et eventuelt forhøjet NGAL-niveau i lyset af den enkelte patients kliniske tilstand.

Muligheden for at bruge NGAL-niveauer i urin og plasma til diagnosticering af akut nyresvigt, der formodes at stamme fra nyreskade er bestemt i en serie på 60 på hinanden følgende patienter, der blev indlagt på en ikke-specialiseret intensiv afdeling, og som efter andre kriterier kunne påvises at have nyresvigt eller ikke at have nyresvigt. Mange af disse patienter havde samtidig sepsis, og visse havde cancer. Forhøjede maksimale NGAL-niveauer var forbundet med akut nyresvigt som påvist herunder:

AKUT NYRESVIGT

Prøve	Urin	Plasma
Grænseværdi	350 ng/mL	400 ng/mL
Diagnostisk specificitet	89,3%	96,3%
Diagnostisk sensitivitet	96,9%	84,8%
Positiv prædiktiv værdi	91,2%	93,1%
Negativ prædiktiv værdi	96,2%	83,9%

En NGAL-koncentration i urin på over 350 ng/mL eller i plasma på over 400 ng/mL vil med stor sandsynlighed (>90%, positive forudsigtelig værdi) skyldes nyreskade, som kan føre til akut nyresvigt.

NGAL-koncentrationer under grænseværdierne kan være tegn på ingen eller kun mindre nyreskade hos denne patientpopulation. En pludselig stigning i NGAL-koncentrationen i urin over patientens tidligere værdier kan være tegn på nyreskade, selv om grænseværdien ikke overskrides, og det anbefales at følge nyrefunktionen nøje.

KVALITETSKONTROL

Laboratorier der agter at gennemføre gentagne analyser, bør etablere deres egne serum- eller urinkontroller til måling af høje og lave aflæsninger; disse bør opbevares i små (f.eks. 50 µL) alikvoter ved -70°C eller derunder. En alikvot af hver af disse skal toes op og testes ved hver analyse, og der skal føres optegnelser over resultatet og efterfølgende resultater. Dette fungerer som kontrol af testdygtighed, testintegritet og operatorpålidelighed. Resultaterne bør undersøges for vandring (tendens til, at løbende resultater stiger eller falder) eller signifikant afvigelse fra gennemsnittet af foregående resultater. Værdier, der ikke afviger mere end 20% fra gennemsnittet af tidligere værdier, kan tages som indikation på, at analysen kan godtages. Alikvoter af kontrolserum bør ikke fryses ned igen til gentagne analyser, når først de er tøet op, og hvis der gennemføres yderligere en analyse, skal der bruges friske kontrolaliquoter og friske fortyndinger af patientprøver.

BEGRÆNSNINGER

Fundet af et forhøjet NGAL-niveau i urin, plasma eller serum kan ikke bruges uafhængigt til diagnosticering af en enkelt patologi. Som nævnt i indledningen er en række uafhængige patologier forbundet med forhøjede NGAL-niveauer i urin eller plasma. Læger skal fortolke betydningen af et eventuelt forhøjet NGAL-niveau i lyset af den enkelte patients kliniske tilstand.

De grænseværdier, der er angivet i resultatfortolkningen, er baseret på de maksimale værdier i den beskrevne patientpopulation, som var karakteriseret ved tilstedeværelse af samtidige sygdomstilstande. Andre grænseværdier, måske lavere, kan være velegnede til andre patientgrupper med færre

samtidige sygdomstilstande. Pludselige stigninger i NGAL kan være tegn på akut nyreskade, selv om de ikke overskrider grænseværdierne.

FORVENTEDE RESULTATER

Den gennemsnitlige NGAL-koncentration i prøver fra raske donorer var 63 ng/mL (område 37-106 ng/mL, n = 80) i EDTA-plasma og 5,3 ng/mL (område 0,7-9,8 ng/mL, n = 7) i urin. Hos ikke-udvalgte patienter, der var indlagt på intensivafdeling, lå NGAL-koncentrationerne i urin mellem 9 ng/mL og 40.000 ng/mL (40 µg/mL) i urin (n = 60) og fra 25 ng/mL til 3491 ng/mL i EDTA-plasma (n = 60).

YDEEVNE

Detektionsgrænse: Den laveste koncentration af NGAL, der gav en absorptionsaflysning på mere end 2 SD over den gennemsnitlige absorptionsaflysning (n = 8) for nul-kalibratoren (NGAL Rapid Calibrator 1), blev bestemt til 0,008 ng/mL, hvilket var lavere end værdien af NGAL Rapid Calibrator 2.

Præcision: Variationen inden for analysen blev bestemt ved måling af NGAL i to urinprøver og to serumprøver med 8 gentagelser. Følgende resultater blev opnået (CV = variationskoefficient):

Prover	CV
Urin A	3,4%
Urin B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

Variationen mellem analyserne blev bestemt ved måling af NGAL i 2 fortyndede urinprøver og 2 fortyndede EDTA-plasmaprøver med 2 gentagelser ved 4 separate analyser. Følgende resultater blev opnået:

Prøver	CV
Urin A	4,7%
Urin B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Analytisk genfindning: Urin- og plasmaprøver blev tilsat rekombinant human NGAL og analyseret med analysen. Genfindning blev beregnet ud fra (Målt/Forventet) udtrykt som en procentdel.

Prøve	Målt (område)	Forventet (område)	Genfindning (område)
Urin	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93%-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83%-90%

Linearitet: NGAL blev målt i serielle fortyndinger (n = 8) af to urinprøver og to plasmaprøver. CV for gennemsnittet af de målte værdier, korrigeret for fortyndingen, var 9,9% og 12,5% for urin og 12,2% og 7,4% for serum, hvilket påviser tilfredsstillende linearitet.

Prøvemateriale: Analyse af prøver af serum, EDTA-plasma eller urin viste ingen signifikante forskelle i analytisk genfindning, linearitet eller præcision. NGAL-koncentrationer er dog ofte lidt højere i serum end i plasma²³, sandsynligvis på grund af frigivelse af NGAL fra neutrofiler ved blodkoagulation.

Specifitet: De to monoklonale antistoffer mod human NGAL, der anvendes i analysen, har vist sig at binde sig til forskellige præparater af rekombinant human NGAL og at give en enkelt bånd ved 25 kDa ved Western blot-analyse af en reduceret postnukleær supernatant fra humane neutrofiler²⁵.

ANSVAR

Kun til in vitro diagnostisk anvendelse i bestemte lande. Se venligst www-bioporto.com for tilgængelighed i forskellige lande. Dette udstyr er kun beregnet til in vitro bestemmelse af NGAL i human urin, serum eller EDTA-plasma.

Udstyret er kun beregnet til brug af kvalificeret personale, der udfører forskning eller diagnostiske aktiviteter.

Såfremt modtageren af dette udstyr videregiver det på nogen måde til tredjepart, skal denne instruktion medsendes, og nævnte modtager skal for egen risiko sikre i BioPorto Diagnostics A/S' favør alle begrænsninger i ansvar heri.

BioPorto Diagnostics A/S skal ikke være ansvarlig for skader eller tab, der skyldes brug af udstyret på anden måde end udtrykkeligt nævnt i disse instruktioner.

BioPorto Diagnostics A/S' ansvar skal i intet tilfælde overstige udstyrets kommercielle værdi.

BioPorto Diagnostics A/S skal under ingen omstændigheder være ansvarlig for indirekte, specielle eller følgeskader, deriblandt, men ikke begrænset til, gevinsttab.

Revidering: NR2010-05-EN-SE
Läs dessa anvisningar noggrant

AVSEDD ANVÄNDNING

För *in vitro*-bestämning av human NGAL i urin, plasma eller serum som en markör av akut njurskada som kan leda till akut njursvikt.

INLEDNING

NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) upptäcktes 1989¹ och är ett protein som precis som namnet indikerar tillhör familjen lipocalin. Dessa är vanligtvis små sekurerade proteiner som karakteriseras av sin förmåga att binda små hydrofobiska molekyler i en strukturellt bevarad ficka, bildad av β -veckade lager, för att binda till specifika cellyt-receptorer och bilda makromolekylära komplex. NGAL karakteriserades och namngavs 1993², men har många synonymer: det är också känt som NL (neutrofil lipocalin; HNL: human NL)³, lipocalin 2, onkogent protein 24p3⁴ eller utocalin⁵ (hos mus) och *neu*-relaterad lipocalin⁶ eller 25 kDa α_2 -mikroglobulin-relaterat protein⁷ (hos råttan). Human NGAL består av en enda polypeptidkedja med disulfidbryggor på 178 aminosyror med en beräknad molekylmassa på 22 kDa², men glykosylering ökar molekylmassan till 25 kDa. I neutrofiler (neutrofilia polymorfonukleära leukocyter) förekommer det i monomera och dimeriska former, med en liten andel trimer, och det förekommer också i komplex med 92-kDa mänskligt neutrofil typ IV-kollagenas (gelatinas B eller matrixmetalloproteinaser-9, MMP-9)⁸.

NGAL isolerades ursprungligen från supernatanten av aktiverade humana neutrofiler¹, men uttrycks också vid låga nivåer i andra humana vävnader, inklusive njure, prostata och epitel i andnings- och matsmältningsvägarna^{9,10}. Den uttrycks också starkt i adenom och inflammerat epitel i buken¹¹, adenokarcinom i bröstet¹² och urotelkarcinom¹³.

På grund av dess lilla molekylstorlek och resistans mot degradering utsöndras och detekteras NGAL lätt i urin, både i fri form och i komplex med MMP-9. Urinnivåer korrelerar med plasmanivåer oavsett orsaken till ökad NGAL-produktion¹⁴,

men särskilt höga urinnivåer kan förväntas när NGAL frigörs direkt i urinen av njurtubuli eller urotelkarcinom. Det är osäkert i hur stor utsträckning NGAL-MMP-9-komplex från källor långt från urinvägarna utsöndras i urin eller ombildas i urin efter beroende utsöndring av NGAL och MMP-9⁸.

Även om funktionerna av NGAL inte är helt kända, verkar NGAL uppregleras i celler under "stress", t.ex. vid infektion, inflammation eller neoplastisk transformation, eller i vävnader som genomgår tillbakabildning, som hos postnatal livmoder hos mus och mjölkkörtlar vid avvänjning⁵. I relation till en möjlig antibakteriell roll binder den enterobaktin och andra sideroforer, vilket minskar förekomsten av Fe³⁺, ett viktigt näringsbehov, för mikroorganismer¹⁵. Dess komplexbildning med MMP-9 verkar skydda den enzymatiska aktiviteten för MMP-9 mot degradering⁸. Uppregleringen av NGAL i tillbakabildande vävnader har lett till antagandet att det är en del i apoptos, men det verkar mer troligt att NGAL associeras med ett överlevnadssvar¹⁶.

NGAL och njuren. Så tidigt som 1989 fann man NGAL (24p3) i njurcellerna hos möss och att dessa genogick en tidig dramatisk uppreglering (14 till 20 gånger) som svar på SV40 viral infektion¹⁷. En liknande tidig och dramatisk uppreglering observerades senare vid andra typer av njurskador och ökade plasmanivåer av NGAL befanns vara starkt korrelerat med minskad njurfunktion hos patienter med njurskada på grund av systemisk vaskulit¹⁸. Urin-NGAL-nivåer fungerar som en tidig markör för akut njurskada efter hjärt-lung-bypass^{19,20} och både urin- och plasmanivåer av NGAL ger en tidig indikation på akut njurskada hos omarkerade endstadiumsvårdspatienter²¹. Förhöjd urin- och plasma-NGAL har också observerats hos patienter med kronisk njursvikt²². Patienter med fungerande njurtransplanterat uppvisade också höjda urinnivåer (detekterade med Western blotting)¹³. Det verkar därför som om flera olika njurrubningar associeras med höjda plasma- och urinnivåer av NGAL. Då NGAL-nivåer i plasma och urin är starkt korrelerade i akuta fall är det mycket troligt att NGAL-nivåerna i urinet kommer vara särskilt höga efter en njurskada som är tillräckligt allvarlig för att orsaka akut njursvikt, akut

tubulinekros eller akut tubulo-interstitial nefropati. Användning av urin-NGAL som markör för njurrubbingar är emellertid föremål för förbehållat att andra samtidiga tillstånd som är oberoende associerade med höjda NGAL-nivåer måste tas i beaktande.

NGAL i inflammation/infektion. NGAL utsöndras från särskilda korn av aktiva neutrofiler^{1,2} och serumnivåerna stiger vid inflammationer eller infektioner, särskilt vid bakterieinfektioner²³. NGAL-serum har därför föreslagits som en indikator för bakterieinfektion. Eftersom nivåer av NGAL också kan stiga i neoplastiska tillstånd och vid njurrubbingar oberoende av infektiiv process, bör denna föreslagna tillämpning hanteras med försiktighet. NGAL kan också stiga vid infektioner hos patienter med ett oräkneligt lågt antal neutrofiler på grund av leukemi eller behandlad leukemi, vilket visar att det inte bara är neutrofiler som är källan till höjda NGAL-nivåer i infektioner.

NGAL och neoplas. De olika typerna av cancer då NGAL kan uppregleras (ofta med MMP-9) har angivits ovan. Detta har visat sig genom dess uttryck i tumörceller och höga urinnivåer, både i fri form och i komplex med MMP-9⁸. Det har föreslagits att NGAL-MMP-9-komplex i urin kan fungera som en markör av sjukdomsstatus för bröstcancerpatienter²⁴. Plasmanivåer har vanligtvis inte mätts i dessa fall.

ANALYSPROCEDURENS PRINCIP

Analysen är ELISA med mikrobrunnar belagda med en monoklonal antikropp mot human NGAL. Bunden NGAL detekteras med en pepparrotsperoxidas (HRP)-konjugerad monoklonal antikropp och analysen utvecklas genom inkubation med ett färgbildande substrat. Analysen är en snabb tvåstegsprocedure:

Steg 1. Alikvoter av kalibratorer, spädda prov och kontroller inkuberas med HRP-konjugerad detektionsantikropp i belagda mikrobrunnar. Endast NGAL binder till både beläggning och detektionsantikropp medan obundet material avlägsnas genom tvättning.

Steg 2. Ett kromogent peroxidassubstrat innehållande tetrametylbendidin (TMB) tillsätts

till varje testbrunn. HRP bundet till den bundna detektionsantikroppen reagerar med substratet och genererar en färgad produkt. Den enzymatiska reaktionen stoppas på kemisk väg och färgintensiteten avläses vid 450 nm i en ELISA-avläsare. Färgintensiteten (absorbansen) är en funktion av koncentrationen av NGAL som ursprungligen tillsattes till varje brunn. Resultaten för kalibratorerna används för att konstruera en kalibreringskurva från vilken koncentrationerna av NGAL i testproverna kan läsas av.

KITETS KOMPONENTER

Artikel	Innehåll	Kvantitet
①	12 x 8 belagda mikrobrunnar + ram	96 brunnar
②	5x konc. provspädningsmedel	1 x 60 mL
③-③	NGAL Rapid kalibrator 1-6 0, 0,2, 2, 5, 10, 20 ng/mL	6 x 1 mL
④	25x konc. tvättlösning	1 x 30 mL
⑤	HRP-konjugerad NGAL-antikropp	1 x 6 mL
⑥	TMB-substrat	1 x 12 mL
⑦	Stopplösning	1 x 16 mL
⑧	U-mikrobrunnplatta av polypropylen	96 brunnar

Obs: Reagenser i vätskeform innehåller konserveringsmedlen timerosal eller Bronidox L. Dessa kan vara hälsoskadliga vid förtäring.

NÖDVÄNDIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER

1. Justerbara mikropipetter i intervallet 1-1000 µL och motsvarande pipettspetsar för engångsbruk
2. Provrör av polypropylen som kan innehålla upp till 1000 µL
3. Provrörställ
4. Justerbar mikropipett med åtta eller tolv kanaler (i intervallet 50-250 µL) eller repeterande mikropipett (valfri)
5. Rena graderade bägare på 1 L och 500 mL
6. Avjoniserat eller destillerat vatten
7. Lock för mikroplatta
8. Ren behållare för spädd tvättlösning
9. Apparat för att fylla brunnarna under tvättproceduren (valfri)
10. Luddfria pappershanddukar eller absorberande papper
11. Pipettbehållare för engångsbruk
12. Timer (i 60 minuters intervall)
13. Kalibrerad ELISA-plattavläsare med möjlighet att avläsa vid 450 nm (helst kunna subtrahera referensvärden vid 650 eller 620 nm)
14. Natriumhypoklorit (hushållsblekmedel med spädning 1:10) för dekontaminering av prover, reagenser och material

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Endast för *in vitro*-diagnostik

1. Detta kit bör endast användas av kvalificerad laboratoriepersonal.
2. Använd separata pipettspetsar för varje prov, kalibrator och reagens för att undvika korskontamination.
3. Använd separata behållare för varje reagens. Detta tillämpas särskilt på TMB-substrat.
4. Dekontaminera alla prover, reagenser och material efter användning genom att blötlägga i minst 30 minuter i natriumhypokloritlösning (hushållsblekmedel spätt 1:10).
5. För att undvika droppbildning vid tvättning ska tvättlösningen aspireras till en flaska med blekmedel.
6. Undvik utsläpp till miljön. Kassera behållare och oanvänt innehåll på ett säkert sätt och i enlighet med nationella och lokala regler.

7. Stopplösningen innehåller 0,5 mol/L svavelsyra och kan orsaka irritation eller frätskador på hud och i ögon. Vid kontakt ska man omedelbart skölja med mycket vatten och kontakta läkare.
8. Blanda inte samma komponenter från kit med olika satsnummer. Komponenterna har standardiserats som en enhet för en given sats.
9. Hemolyserade, hyperlipemiska, värmebehandlade eller kontaminerade prover kan ge felaktiga resultat.
10. Späd inte kliniska prover direkt i de belagda mikrobrunnarna.
11. Rör inte vid eller skrapa de belagda mikrobrunnarnas botten vid pipettering eller aspirering av vätska.
12. Andra inkubationstider och temperaturer än dem som specificeras kan ge felaktiga resultat.
13. Låt inte brunnarna torka när analysen startats.
14. TMB-substratet är ljuskänsligt. Utsätt inte för starkt ljus.
15. Återanvänd inte mikrobrunnar eller håll inte reagenser tillbaka i flaskorna när de väl dispenserats.

STABILITET OCH FÖRVARING

1. Förvara kitet med alla reagenser vid 2-8°C. Frys inte ned.
2. Använd alla reagenser före utgångsdatumet på kit etikett.
3. Spädd tvättlösning bibehålls stabil i fyra veckor vid 2-8°C. Om inte alla brunnarna ska användas, späd endast den del av tvättlösningen som krävs.
4. Spädd provspädningsmedel bibehålls stabilt i 24 timmer vid 2-8°C. Om inte alla brunnarna ska användas, späd endast den del av provspädningsmedlet som krävs.
5. Förvara oanvända brunnar i foliepåsen med det medföljande torkmedlet och återförsegla för senare användning. Låt alltid foliepåsen komma i jämvikt vid rumstemperatur före öppnande för att undvika kondensation i/på de belagda mikrobrunnarna.

PROVINSSAMLING

Hantera och kassera alla blodhärledda prov eller urinprov som om de var potentiellt smittsamma. Se Försiktighetsåtgärder, avsnitt 2, 4 och 5.

Bestämning av NGAL i ett enda prov kräver 10 µL urin, plasma eller serum. Blodprov bör tas aseptiskt i EDTA-provrör eller enkla provrör av kvalificerad personal med användning av godkända venpunktionstekniker. Plasma eller serum bör beredas med standardtekniker för klinisk laboratorietestning. Urin bör centrifugeras. Sätt lock på beredda kliniska prov. Om analysen inte kan utföras inom 24 timmar eller om prov ska transporteras, frys prover vid -20°C eller lägre. För långtidsförvaring av kliniska prov rekommenderas -70°C eller lägre. Undvik upprepade infrysning och upptining. Använd inte hemolyserade, hyperlipemiska, värmebehandlade eller kontaminerade prover.

BEREDNING AV REAGENSER

- Låt alla prov och reagenser anta rumstemperatur (20-25°C). Blanda prov noggrant genom att försiktigt vända dem upp och ned och avlägsna partiklar med låghastighetscentrifugering vid behov.
- Bestäm antalet prov som ska testas (dubbelt) plus interna laboratoriekontrollprov (dubbelt) plus reagensblankprov. De förbelagda brunnarna kan användas som remсор på åtta stycken eller som enskilda brunnar. Enskilda brunnar hanteras genom att de bryts ut och placeras i ramen på lämplig plats. Bokstäver och skåror på brunnarna medger att enskilda brunnar kan identifieras. Lägg till tolv brunnar för de sex kalibratorerna (dubbla). Ta bort det antal brunnar som krävs och lägg de återstående i foliepåsen med torkmedel för förvaring vid 2-8°C.
- Tvättlösning: Späd 25x konc. tvättlösning genom att hålla hela innehållet i flaskan (30 mL) i en graderad bägare på 1 L och tillsätt destillerat eller avjoniserat vatten till en slutlig volym på 750 mL. Blanda ordentligt och förvara vid 2-8°C efter användning. Om inte alla brunnar ska användas, späd endast den nödvändiga

volymen av konc. tvättlösning med 24 volymer av vatten för att få en spädning på 1/25.

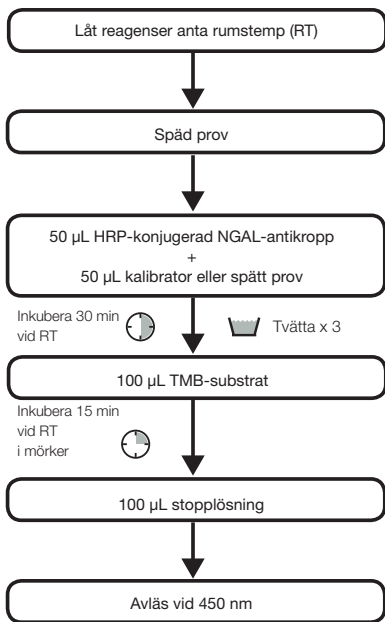
- Provspädningsmedel: Späd 5x konc. provspädningsmedel (innehåller röd färg för att hjälpa till vid pipettering) genom att hålla hela innehållet i flaskan (60 mL) i en graderad bägare på 500 mL och tillsätt destillerat eller avjoniserat vatten till en slutlig volym på 300 mL. Blanda ordentligt och förvara vid 2-8°C efter användning. Om inte alla brunnar ska användas, späd endast den nödvändiga volymen av konc. provspädningsmedel med fyra volymer av vatten för att få en spädning på 1/5.
- NGAL Rapid-kalibratorer (innehåller röd färg för att hjälpa till vid pipettering): De tilldelade koncentrationerna anges på etiketterna. Späd inte mer.
- HRP-konjugerat NGAL-antikropp (bruksfärdigt): Späd inte mer.
- TMB-substrat (bruksfärdigt): Späd inte mer.
- Stopplösning (bruksfärdigt): Späd inte mer.

BEREDNING AV PROVER

Det intervallet för standardkurvan är 0,2 ng/mL-20 ng/mL och det diagnostiska relevanta intervallet är 100-500 ng/mL för plasma eller serum och 50-500 ng/mL för urin (se Tolkning av resultat). Därför rekommenderas en initial undersökningsspädning för plasma eller serum på 1/100 och för urin 1/50. Spädningen på 1/100 kan beredas genom att späda 10 µL av plasma eller serum i 990 µL provspädningsmedel och spädningen på 1/50 kan beredas genom att späda 10 µL av urin i 490 µL provspädningsmedel. Spädningar blandas genom att vändas upp och ned eller med måttlig vortexblandning. Omanlys av prov som hamnar utanför intervallet vid lägre eller högre spädning kan bli nödvändig. Spädningar lägre än 1/25 bör inte användas.

ANALYSPROCEDUR

1. Bered analysprotokollet och tilldela lämpliga brunnar för kalibratorer, spädda patientprov och interna laboratoriekontroller i duplikat. Om en referensväglängd på 650 eller 620 nm inte finns tillgänglig på ELISA-avläsaren kan en reagensblankbrunn tilldelas. Den består av 50 µL provspådningsmedel istället för spätt prov och bearbetas precis som de andra brunnarna.
2. Späd prover enligt de förväntade NGAL-koncentrationerna (1/100 för plasma eller serum och 1/50 för urin är lämpligt för de flesta prov).
3. Pipettera en tillräcklig volym av varje kalibrator, spätt prov och interna laboratoriekontroller i lämpliga brunnar på U-mikrobrunnplattan av polypropylen för att tillåta efterföljande överföring av volymer på 50 µL till motsvarande belagda mikrobrunnar.
4. Pipettera volymer på 50 µL av HRP-konjugerad NGAL-antikropp på motsvarande positioner i belagda mikrobrunnar. Överför sedan snabbt volymer på 50 µL av kalibratorlösningar, spädda prover och interna kontroller från U-brunnarna med hjälp av en flerkanalspipett till motsvarande belagda brunnar som redan innehåller detektionsantikropp. Denna metod av provtillsats rekommenderas för att minska inkubationstiden mellan de första och sista proverna som tillsätts till de belagda mikrobrunnarna.
5. Täck över brunnarna och inkubera i **30 minuter** vid rumstemperatur på en skakplattform vid 200/minut.
6. Aspirera innehållet i mikrobrunnarna och tvätta mikrobrunnarna tre gånger med minst 300 µL av den tidigare spädda tvättlösningen. Om tvättning utförs manuellt ska mikrobrunnarna tömmas genom att vändas upp och ned och skakas försiktigt över en lämplig behållare, följt av avtorkning upp och ned med en pappershandduk. En väntetid på en minut rekommenderas innan tömning, åtminstone för den sista tvättningen i cykeln. Sättet på vilket spädd tvättlösning fylls i eller töms från brunnarna påverkar den slutliga färgutvecklingen. Manuell pipettering, som kan utföras mycket försiktigt och leda till hög färgutveckling, rekommenderas endast i frånvar av alternativ som att fylla brunnarna genom nedsänkning, med en manuell tvätt dispenser med flera kanaler eller med en automatisk tvättapparat.
7. Dispensera 100 µL TMB-substrat (bruksfärdigt) i varje mikrobrunn. Användning av en flerkanalsmikropipett rekommenderas för att minska pipetteringstiden. Täck över brunnarna och inkubera i **exakt 15 minuter** vid rumstemperatur i mörker. Starta klockan när den första brunnen fylls.
8. Tillsätt 100 µL Stopplösning (bruksfärdig) till varje brunn och bibehåll samma pipetteringssekvens och hastighet som i steg 7. Blanda genom att försiktigt skaka i 20 sekunder och undvik stänk. Avläs brunnarna inom 30 minuter.
9. Avläs absorbansen för brunnarna vid 450 nm i en lämplig avläsare för mikroplattor (referensväglängd 650 eller 620 nm). Om ingen referensväglängd finns tillgänglig ska värdet för reagensblankbrunnen subtraheras från varje annat värde innan andra beräkningar utförs.

SCHEMATISK ÖVERSIKT**BERÄKNING AV RESULTAT**

För beräkning av resultat ska de exakta värdena för kalibratorerna, som är angivna på etiketterna och på QC-certifikatet, användas.

Huvudprincipen är att konstruera en kalibreringskurva genom att plotta medelvärdet för de dubbla absorptionsvärdena för varje NGAL Rapid-kalibrator på y-axeln och motsvarande NGAL-koncentrationer i ng/mL på x-axeln. Kalibreringskurvan måste överensstämma med valideringskrav. NGAL-koncentrationen för varje

spätt prov hittas sedan genom att man lokaliserar punkten på kurvan som motsvarar medelvärdet för de dubbla absorptionsvärdena för det spädda provet och avläser motsvarande koncentration i ng/mL på x-axeln. Koncentrationen av NGAL i det ospädda provet beräknas genom att multiplicera resultatet med provets spädningsfaktor.

Denna procedur kan utföras manuellt med grafpapper med linjära x- och y-skalar. En jämn kurva kan dras genom punkterna eller närliggande punkter kan sammanlänkas med räta linjer. Den senare proceduren kan lätt överskatta koncentrationvärdena mellan punkter när kurvan är en aning konvex mot vänster, vilket är vanligt. Även om kurvan kan approximeras till en rät linje är det både praktiskt och teoretiskt inkorrekt att beräkna och dra en absolut rak linje och avläsa resultaten från denna.

Proceduren kan också utföras med en programvara för ELISA-avläsare med kurvanpassningsprocedurer. Den valda proceduren är att använda linjära x- och y-axlar med 4-parameters logistisk kurvanpassning. Spädda prover som ger ett medelabsorptionsvärde över det för NGAL Rapid-kalibrator 6 eller under det för NGAL Rapid-kalibrator 2 ligger utanför analysens intervall och koncentrationerna bör antecknas som >20 ng/mL respektive <0,2 ng/mL. Motsvarande koncentrationer i ospädda prover beräknas >(20 x spädningsfaktor) ng/mL respektive <(0,2 x spädningsfaktor) ng/mL. Dessa prover kan omanalyseras om nödvändigt vid högre eller lägre spädningsgrad för hög- respektive lågvälsta prover. De nya spädningsfaktorerna bör vara de som uppskattas ge absorptionsvärden som kommer att ligga inom kalibreringskurvas intervall, men spädningsgrad lägre än 1/25 bör inte användas.

VALIDERING AV KALIBRERINGSKURVA

Medelabsorbansen för NGAL Rapid-kalibrator 6 bör vara >1,5. Medelabsorbansen för en NGAL Rapid-kalibrator bör vara högre än den för föregående NGAL Rapid-kalibrator, t.ex. absorptions(NGAL Rapid-kalibrator 6) >absorbans(NGAL Rapid-kalibrator 5). Kurvan bör vara en aning konvex mot vänster när resultaten plottas på linjära axlar.

Punkter utanför linjen för enskilda kalibratorer:

En eller flera enskilda kalibratorer kan ge onormala absorbansavläsningar. En eller båda av de dubbla värdena kan ligga utanför linjen och medelvärdet för duplikaten kan ligga utanför linjen. Detta fel är signifikant om det försämrar en tillfredsställande kurvanpassning med en 4-parameters logistisk metod som förskjuts bort från andra korrekta kalibratorpunkter på grund av det onormala värdet. Kalibratorpunkter och kurvanpassning bör alltid undersökas för korrekt anpassning innan några beräkningar av koncentrationen accepteras. En dåligt anpassad kurva avslöjas också av en hög summa av kvadratiske rester. Om endast en kalibrator påverkas, som inte är den högsta kalibratoren, är två vägar möjliga:

i) Ett felaktigt enkelt eller dubbelt resultat bör elimineras från kurvan och återstående resultat omanpassas med en 4-parameters logistisk procedur. Om en tillfredsställande anpassning erhålls kan tillfälliga koncentrationsresultat beräknas från den.

ii) Om ingen tillfredsställande anpassning erhålls, men kurvan annars är konsekvent, kan tillfälliga resultat erhållas från räta linjer eller enkel kubisk spline-anpassning mellan medelvärdena för duplikat med utslutning av den felaktiga punkten.

Om två eller flera kalibratorer påverkas måste analysen upprepas.

Ett avvikande resultat för en enskild kalibrator kan bero på operatörsfel eller försämring av kalibratoren. Om de båda dubbla värdena konsekvent ligger utanför linjen i efterföljande analyser är det fel på kalibratoren och den ska utslutas.

SPÅRBARHET FÖR KALIBRATORVÄRDE

NGAL-koncentrationen av spätt kalibratormaterial har tilldelats med jämförelse i ELISA med ett renat preparat av rekombinant human NGAL kvantifierad av Rigshospitalet, Köpenhamn, Danmark.

TOLKNING AV RESULTAT

Upptäckten av höjd urin-, plasma- eller serumnivå av NGAL kan inte oberoende diagnostiseras för en enda patologi. Som angivet i inledningen kan flera

olika oberoende patologier associeras med höjda urin- eller plasmanivåer av NGAL. Läkare måste tolka signifikansen av höjda NGAL-nivåer utifrån varje patients kliniska egenskaper.

Kapaciteten för urin- och plasmanivåer av NGAL för att diagnostisera akut njursvikt som resulterat av njurskada bestämdes i en serie på 60 patienter i följd inlagda på en allmän intensivvårdsklinik och klassificerbara med andra kriterier som uppvisning eller inte uppvisning av tecken på njursvikt. Flera av dessa patienter hade samtidig sepsis och vissa hade cancer. Höjda maximala NGAL-nivåer associerades med akut njursvikt enligt:

AKUT NJURSVIKT

Prov	Urin	Plasma
Cutoff-värde	350 ng/mL	400 ng/mL
Diagnostisk specificitet	89,3%	96,3%
Diagnostisk sensitivitet	96,9%	84,8%
Positivt förväntat värde	91,2%	93,1%
Negativt förväntat värde	96,2%	83,9%

En NGAL-koncentration i urin över 350 ng/mL eller i plasma över 400 ng/mL är mycket trolig (>90%, positivt förväntat värde) på grund av njurskada som kan leda till akut njursvikt. NGAL-koncentrationer under cutoff-värden kan ange antingen ingen eller bara en liten njurskada i denna patientpopulation. En plötslig förhöjning av NGAL-koncentration i urin över patientens tidigare värden kan ange njurskada även om cutoff-värdet inte överskrids och en noga kontroll av njurfunktionen rekommenderas.

KVALITETSKONTROLL

Laboratorier som vill utföra upprepade analyser bör fastställa egna högavläsnings- och lågavläs-

ningskontrollsera eller urin som förvaras i små (t.ex. 50 µL) alikvoter vid -70 °C eller lägre. En alikvot av vardera bör tinas upp och testas i varje analys och efterföljande resultat bör antecknas. Detta fungerar som en kontroll av testprestanda, testintegritet och operatörspålitlighet. Resultaten bör undersökas för drivning (tendens att efterföljande resultat stiger eller faller) eller signifikant avvikelser från medelvärdet av tidigare resultat. Värdet som inte avviker mer än 20% från medelvärdet för tidigare resultat kan antas ange att analysen är acceptabel. Alikvoter av kontrollserum bör inte frysas ned igen för upprepade analyser när det väl har tinats upp en gång och om vidare analys utförs bör färska kontrollaliquoter och spädningar av patientprover användas.

BEGRÄNSNINGAR

Upptäckten av höjd urin-, plasma- eller serumnivå av NGAL kan inte oberoende diagnostiseras för en enda patologi. Som angivet i inledningen kan flera olika oberoende patologier associeras med höjda urin- eller plasmanivåer av NGAL. Läkare måste tolka signifikansen av höjda NGAL-nivåer utifrån varje patients kliniska egenskaper.

Cutoff-värden som är givna i Tolkning av resultat baseras på maximala värden i patientpopulationen som beskrivs, vilka karakteriserades av förekomsten av flera förbryllande faktorer. Andra cutoff-värden, kanske lägre, kan vara lämpliga för andra patientgrupper med färre förbryllande faktorer. Plötslig förhöjning av NGAL-värden kan ange akut njurskada även om de inte överskrider cutoff-värdena.

FÖRVÄNTADE RESULTAT

NGAL-medelkoncentrationen i prover från friska givare var 63 ng/mL (intervall 37-106 ng/mL, n = 80) i EDTA-plasma och 5,3 ng/mL (intervall 0,7-9,8 ng/mL, n = 7) i urin. Hos icke-utvalda patienter i intensivvården var NGAL-koncentrationerna från 9 ng/mL till 40 000 ng/mL (40 µg/mL) i urin (n = 60) och från 25 ng/mL till 3491 ng/mL i EDTA-plasma (n = 60).

PRESTANDAEGENSKAPER

Detektionsgräns: Den lägsta NGAL-koncentration som ger ett absorberingsvärde som är mer än 2 SD

över nollvärdet (NGAL Rapid Calibrator 1) (n = 8) fastställdes till 0,008 ng/mL och är lägre än värdet hos NGAL Rapid Calibrator 2.

Precision: Variation inom analyser bestämdes med mätning av NGAL i två urinprov och två plasmaprover med 8 replikat. Följande resultat erhöles (CV = variationskoefficient):

Prover	CV
Urin A	3,4%
Urin B	4,3%
Plasma A	2,9%
Plasma B	1,9%

Variation mellan analyser bestämdes med mätning av NGAL i två spädda urinprov och två spädda EDTA-plasmaprover med två replikat i fyra separata analyser. Man fick följande resultat:

Prover	CV
Urin A	4,7%
Urin B	22,7%
Plasma A	11,4%
Plasma B	12,4%

Analytiskt utbyte: Urin- och plasmaprover tillsattes rekombinant human NGAL och analyserades i analysen. Utbyte beräknades från (mätt/förväntat) uttryckt som en procentandel.

Prov	Mätt (intervall)	Förväntat (intervall)	Utbyte (intervall)
Urin	4,3-12,0 ng/mL	4,5-12,4 ng/mL	93%-98%
Plasma	4,2-10,5 ng/mL	4,6-12,6 ng/mL	83%-90%

Linjäritet: NGAL mättes i seriespädningar (n = 8) av två urinprov och två plasmavprov. CV för medelvärden av de mätta värdena korrigerat för spädning var 9,9% och 12,5% för urin och 8,5% och 7,4% för plasma, vilket ger tillfredsställande linjäritet.

Provmaterial: Analys av serum-, EDTA-plasma- eller urinprover visade inga signifikanta skillnader i analytiskt utbyte, linjäritet eller precision. NGAL-koncentrationer är emellertid lite högre i serum än i plasma²³, troligen beroende på frigöring av NGAL från neutrofiler vid blodkoagulation.

Specifitet: De två monoklonala antikropparna mot human NGAL som används i denna analys har visat sig binda till olika preparat av rekombinant human NGAL och ger ett enkelt band på 25 kDa vid Western blotting av en reducerad postnukleär supernatant från humana neutrofiler²⁵.

FRISKRIVNING

Får endast användas in vitro i vissa länder. Gå till www.bioporto.com för att kontrollera tillgänglighet i ditt land.

Detta kit är endast avsett för in vitro-bestämning av NGAL i human urin, serum eller EDTA-plasma.

Kitet är endast avsett att användas av kvalificerad personal med forsknings- eller diagnosfunktioner.

Om mottagaren av detta kit överläter det på något sätt till tredje part måste denna instruktion ingå och mottagaren ska på egen risk ansvara för friskrivning för BioPorto Diagnostics A/S räkning.

BioPorto Diagnostics A/S ska inte hållas ansvarigt för någon skada eller förlust som orsakas av en annan användning av detta kit än vad som uttryckligen angivits i dessa instruktioner.

Ansvarsskyldigheten för BioPorto Diagnostics A/S ska under inga omständigheter övergå det kommersiella värdet för kitet.

BioPorto Diagnostics A/S ska inte under några omständigheter hållas ansvarigt för indirekta, särskilda skador eller följdsador inklusive, men inte begränsat till, vinstförlust.

**REFERENCES
LITERATUR
RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAFIA
BIBLIOGRAFÍA
REFERENCER
REFERENSER**

1. Allen RA, Erickson RW, Jesaitis AJ (1989) Identification of a human neutrophil protein of Mr 24000 that binds *N*-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules. *Biochim Biophys Acta* 991:123-133.
2. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268:10425-10432.
3. Xu SY, Carlson M, Engstrom A, Garcia R, Peterson CG, Venge P (1994) Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 54:365-376.
4. Flower DR, North AC, Attwood TK (1991) Mouse oncogene protein 24p3 is a member of the lipocalin protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 180:69-74.
5. Liu Q, Ryon J, Nilsen-Hamilton M (1997) Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol Reprod Dev* 46:507-514.
6. Stoesz SP, Gould MN (1995) Overexpression of neu-related lipocalin (NRL) in neu-initiated but not ras or chemically initiated rat mammary carcinomas. *Oncogene* 11:2233-2241.
7. Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H (1992) A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314:386-388.
8. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001) The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 276:37258-37265.
9. Cowland JB, Borregaard N (1997) Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45:17-23.
10. Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN (1999) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* 31:433-441.
11. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L (1996) Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 38:414-420.
12. Stoesz SP, Friedl A, Haag JD, Lindstrom MJ, Clark GM, Gould MN (1998) Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer* 79:565-572.
13. Monier F, Surla A, Guillot M, Morel F (2000) Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients. *Clin Chim Acta* 299:11-23.
14. Bangert K, Ghiglionone M, Heslet L, Uttenenthal LO (2005) Urinary NGAL is dramatically increased in acute renal failure. *Intensive Care Med* 31(Suppl 1):S65.
15. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10:1033-1043.
16. Tong Z, Wu X, Ovcharenko D, Zhu J, Chen CS, Kehrer JP (2005) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J* 391:441-448.
17. Hraba-Renevey S, Turler H, Kress M, Salomon C, Weil R (1989) SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* 4:601-608.
18. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M (2003) Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic auto-antibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol* 131:528-535.
19. Xin C, Yulong X, Yu C, Changchun C, Feng Z, Xinwei M (2008) Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 predict

- acute kidney injury after cardiac surgery. *Renal fail* 30:904-913.
20. Tuladhar SM, Püntmann VO, Soni M, Punjabi PP, Bogle RG (2009) Rapid detection of acute kidney injury by plasma and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin after cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Pharmacol* 53:261-266.
 21. Bangert K, Heslet L, Ghiglione M, Uttenthal LO (2006) NGAL is significantly increased in urine and plasma in acute renal failure. *Intensive Care Med* 32(Suppl 1):S10.
 22. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M (2008) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis* 52:595-605.
 23. Xu SY, Pauksen K, Venge P (1995) Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest* 55:125-131.
 24. Fernandez CA, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA (2005) The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:5390-5395.
 25. Kjeldsen L, Koch C, Arnijots K, Borregaard N (1996) Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods* 196:155-164.

Method patented/patent pending in selected countries. See list below for details.

Die Methode ist in ausgewählten Ländern patentiert/als Patent angemeldet.

Siehe untenstehende Liste für Einzelheiten.

Méthode brevetée ou en attente de brevet dans les pays sélectionnés.

Consulter la liste suivante pour plus de détails.

Metodo brevettato/in attesa di brevetto nei paesi scelti. Vedere la lista in basso per i dettagli.

Método patentado/patente pendiente en varios países. Consulte la lista de países a continuación.

Metode patenteret/patent ansøgt i udvalgte lande. For yderligere detaljer, se tabellen nedenfor.

Metod patenterad /patentsökt i utvalda länder. Se listan nedan för mer information.

Patentovaná metoda/metoda s projednáváním patentem ve vybraných zemích.

Pro podrobnější informace viz seznam níže.

已经申请专利方法/正在申请专利方法的國家名单如下。

選択された国では特許取得済、または特許出願中の方式。詳細は以下のリストを参照。

특허사용이 허용된 나라/ 신청중인 나라의 세부적인 내역은 다음과 같습니다.

Метод запатентован/патент заявлен в нескольких странах. Смотрите список ниже.

Patents granted in the following countries

In folgenden Ländern wurden Patente erteilt

Brevets attribués dans les pays suivants

Brevetto concesso nei seguenti paesi

Patentes concedidas en los siguientes países

Patenter udstedt i de følgende lande

Patent beviljad i följande länder

Patenty udělené v následujících zemích

已批准使用专利的國家包括

以下の各国では特許取得済

특허 사용을 허용한 나라는 다음과 같습니다.

Патенты предоставлены в следующих странах

AT (E 448 484)

BE, CH, CZ (EP1831699)

DE (60 2005 013 288.0)

DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT (EP1831699)

KR (10-0971305)

LU, NL (EP1831699)

NZ (555 926)

PL, RO, SE (EP1831699)

SG (133124)

SI, TR (EP1831699)

ZA (2007/05776)

Patents pending in the following countries

In folgenden Ländern wurden Patente angemeldet

Brevets en attente dans les pays suivants

In attesa di brevetto nei seguenti paesi

Patentes pendientes en los siguientes países

Patenter ansøgt i de følgende lande

Ansökan om patent i följande länder

Patenty projednáváné v následujících zemích

正在申请专利的國家包括

以下の各国では特許出願中

특허 신청중인 나라는 다음과 같습니다.

Патенты заявлены в следующих странах

AU (2005318689)

CA (2591113)

CN (200580048175.9)

HK (07113788.2)

IL (183872)

IN (2645/CHENP/2007)

JP (2007-547181)

US (11/722,025)



Catalogue number



Use by



In vitro diagnostic medical device



Manufacturer



Batch code



Keep away from sunlight



Consult instructions for use



Temperature limitation



European Conformity



Do not reuse



Caution, consult accompanying documents



Biological risk



Do not use if package is damaged

WASH SOLUTION | 25X

Concentrated Wash Solution. Dilute before use.

SAMPLE DILUENT | 5X

Concentrated Sample Diluent. Dilute before use.



BIOPORTO[®]
Diagnostics



BioPorto Diagnostics A/S
Grusbakken 8
DK-2820 Gentofte
Denmark

Phone (+45) 4529 0000
Fax (+45) 4529 0001
E-mail info@bioporto.com
Web www.bioporto.com
www.ngal.com