

Order information:

Catalog No.	Contents
H9601 Hit 1 / 917 (ILab* / AU*)	R1 6 x 20 ml R2 6 x 9 ml

(*) Kit contains only reagent barcode for Hitachi system.

System information:

Hitachi 911: ACN 171
Hitachi 917: ACN 769

For application on the Hitachi 912, please use an open system or contact the Analyticon Customer Support.

Intended use:

For the quantitative determination of protein in urine and cerebrospinal fluid on automated clinical chemistry analyzers.

Summary:

Urine is formed by ultrafiltration of plasma across the glomerular capillary wall. Proteins with a relative molecule mass > 40 000 are almost completely retained, while smaller substances easily enter the glomerular filtrate.

Most CSF protein originates by diffusion from plasma across the blood-CSF barrier. Elevated levels occur as a result of increased permeability of the blood-CSF barrier or with increased local synthesis of immunoglobulins.

Turbidimetric methods using trichloroacetic acid (TCA) or sulfosalicylic acid (SSA) require precipitation of the protein in the sample; the resulting turbidity may be unstable and flocculate. Dye-binding methods such as Coomassie blue and pyrogallol red-molybdate exhibit different sensitivities to various proteins and the reagent may stain glassware. The Analyticon U/CSF assay is based on the method described by Iwata and Nishikaze, later modified by Luxton, Patel, Keir and Thompson. In this method, benzethonium chloride reacts with protein in a basic medium to produce a turbidity that is more stable and evenly distributed than that observed with the SSA or TCA methodologies. This direct assay shows similar reactivity to albumin and gamma-globulin, and no interference due to short peptides. Interference from magnesium ions has been eliminated by the addition of EDTA.

Protein measurements in urine are used in the diagnosis and treatment of disease conditions such as renal or heart diseases, or thyroid disorders, which are characterized by proteinuria or albuminuria.

CSF protein measurements are used in the diagnosis and treatment of conditions such as meningitis, brain tumors, and infections of the central nervous systems.

Test principle:

The sample is preincubated in an alkaline solution containing EDTA, which denatures the protein and eliminates interference from magnesium ions. Benzethonium chloride is then added, producing a turbidity that is read at 505 nm. U/CSF protein determinations can be performed as an endpoint assay with sample blank or a rate assay.

Reagent Concentration:

R1:	
Sodium hydroxide	530 mmol/l
EDTA	74 mmol/l
R2:	
Benzethonium chloride	32 mmol/l

Preparation and stability:

R1: ready to use.

R2: ready to use.

The reagents are stable up to the stated expiry date:
at +2° to +8°C and protected from light.

Onboard stability:

R1: 21 days opened and refrigerated on the analyzer

R2: 21 days opened and refrigerated on the analyzer

Notes:

For in vitro diagnostic use.

The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Specimen:

Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Collection and preparation:

Urine:

Use random or 24 hour urine specimens. Use no preservatives.

Refrigerate specimen during collection.

Cerebrospinal Fluid (CSF):

No special additives are required. Blood in a CSF specimen invalidates the protein value.

Specimens may be stored at temperatures between +2° and +8°C for 48 hours.

Limitations – interference:

Criterion: recovery ± 10 % of initial values

Icterus: No significant interference up to an index I of 20 (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: (20 mg/dl).

Hemolysis: Due to protein nature of haemoglobin hemolysis leads elevated values dependent on the degree of lysis of the erythrocytes.

The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases.

In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

No significant interference from:

Ascorbic Acid	Creatinine	Glucose
Phosphorus	Urea	Magnesium
Sodium Citrate	Caffeine	Cefazolin Sodium
Chlorpromazine	Calcium	L-Dopa Gentamicin
Sulfate	Sodium Oxalate	Uric Acid

Testing procedure:

Applications for automated systems are available on request.

Materials provided:

• Working solutions as described above

Additional materials required

• Calibrators and controls as indicated below

• 0.9% NaCl

Manual procedure:		
Wavelength:	505 nm	
Temperature:	37°C	
Cuvette:	1 cm	
Zero adjustment:	against reagent blank	
	Blank	Sample/Calibrator
R1	500µl	500 µl
R2	200 µl	200 µl
Mix, read absorbance (A ₁), then add:		
Sample/Calibrator	---	30 µl
NaCl (0,9%)	30 µl	---
Mix, incubate 10 min. and read absorbance A ₂ .		
Calculation:		
$\Delta A = (A_2 - A_1)$ sample or calibrator		
The protein concentration in patient samples has to be calculated from ΔA using mathematic function as logit/log or can be read from a graph using values of 6 levels of standards. For zero value is recommended to use saline solution (0,9%).		

Measuring /reportable range:

Rate Assay:

6-200 mg/dl (60-2000 mg/l)

Endpoint Assay:

2-200 mg/dl (20-2000 mg/l)

Determine samples with U/CSF protein concentrations > 200 mg/dl (2000 mg/l) via the rerun function. On instruments without rerun function, manually dilute samples with 0.9% NaCl (eg. 1 + 3). Multiply the result by the appropriate dilution factor (eg. 4).

Expected values:

Urine:

Random	< 12 mg/dl (< 120 mg/l)
24 hr	< 150 mg/day

Cerebrospinal Fluid:

15 – 45 mg/dl (150 – 450 mg/l)

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes, the U/CSF results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examinations and other findings.

Analytical sensitivity (lower detection limit)

Detection limit: 6 mg/ dl or 60mg/l

The lower detection limit represents the lowest measurable U/CSF protein concentration that can be distinguished from zero. It is calculated as the concentration lying three standard deviations above that of the lowest standard.

Fluitest[®] U/CSF

ULTRASENSITIVE PROTEIN



Imprecision:

Reproducibility between day was determined by an internal protocol using human controls. The following results were obtained (n = 15).

<i>Urine</i>		Between day	
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Control 1	20.0	0.32	1.61
Control 2	63.0	0.98	1.56
Control 3	98.0	2.03	2.08

Reproducibility within run was determined by an internal protocol using human controls. The following results were obtained (n = 21).

<i>Urine</i>		Within run	
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Control 1	23.0	0.67	2.89
Control 4	79.4	0.50	0.63

Method comparison:

A comparison of the Analyticon[®] Fluitest[®] U/CSF (y) with a commercial obtainable assay (x) gave the following result:

$$y = 0.976 x + 2.091 ; \quad r = 0.996$$

Quality Control:

Human Urine Control:

Urine control Set 8 x 5 ml #1507

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

Calibration:

S1: 0.9% NaCl

S2 -S6: Bio Cal U/CSF 5 x 1 ml #14960

Calibration frequency

Recalibration is recommended

- After bottle change
- As required following quality control procedures
- After 7 days, the use of Chimneys in R1 can extend calibration stability to 14 days

Disposal:

Please note the legal regulations.

Literature:

1. Iwata I, Nishikaze O. Clin Chem. 1979;25/7:1317 – 1319.
2. Koumantakis G. Fluorescein Interference with Urinary Creatinine and Protein Measurements. Clin Chem. 1991;37/10:1799.
3. Luxton R, Patel P, Keir G, Thompson E. Clin Chem. 1989; 35/8: 1731 – 1734.
4. Tietz NW. clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia, Pa. WB Saunders co; 1995;520.
5. Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saundes co; 1987:336,339,340,341.

Bestellinformation:

Katalog-Nr.	Inhalt
H9601	Hit 1 / 917 (ILab* / AU*)
	R1 6 x 20 ml R2 6 x 9 ml

(*) Kit enthält nur Reagenzien-Barcodes für Hitachi-System.

Systeminformation:

Hitachi 911: ACN 171
Hitachi 917: ACN 769

Für die Benutzung am Hitachi 912 verwenden Sie bitte ein offenes System oder wenden Sie sich an den Analyticon Kundensupport.

Anwendungszweck:

In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Protein in Urin und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) mit klinischen Analysenautomaten.

Zusammenfassung:

Urin wird durch Ultrafiltration des Plasmas durch die glomerulären Kapillarwände gebildet. Proteine mit einer relativen molekularen Masse > 40 000 werden nahezu vollständig zurückgehalten während kleinere Substanzen problemlos als glomeruläres Filtrat passieren.

Die meisten Liquor-Proteine diffundieren aus dem Plasma durch die Blut-Hirn-Schranke. Erhöhte Konzentrationen ergeben sich aus einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke oder durch eine Zunahme der lokalen Immunglobulin-Synthese.

Turbidimetrische Verfahren mit Trichloressigsäure (TCA) oder Sulfosalicylsäure (SSA) beruhen auch einer Präzipitation des Proteins in der Probe; die resultierende Trübung kann instabil und flockig sein. Farbbindungsreaktionen mit Coomassie-Blau und Pyrogallol-Molybdatrot zeigen gegenüber verschiedenen Proteinen unterschiedliche Sensitivitäten und können Glasgeräte anfärben. Die Analyticon U/CSF Methode basiert auf der Methode von Iwata and Nishikaze, die später von Luxton, Patel, Keir und Thompson modifiziert wurde. Bei diesem Verfahren reagiert das Protein in alkalischer Lösung mit Benzethonium-Chlorid. Die entstehende Trübung ist stabiler und gleichmäßiger verteilt, als bei den Verfahren mit SSA und TCA. Dieser direkte Test zeigt eine vergleichbare Reaktion mit Albumin und Gamma-Globulin, und wird durch kurzkettige Peptide nicht gestört. Durch Zugabe von EDTA wird eine Beeinflussung durch Magnesiumionen vermieden.

Proteinbestimmungen im Urin dienen der Diagnose und Behandlung von Nieren- oder Herzerkrankungen oder Störungen der Schild-drüsenfunktion, die durch Proteinurie bzw. Albuminurie gekennzeichnet sind. CSF-Proteinbestimmungen dienen der Diagnose und Behandlung von Meningitis, Hirntumoren und Infektionen des Zentralen Nervensystems.

Testprinzip:

Die Probe wird in alkalischer, EDTA-haltiger Lösung vorinkubiert, um die Proteine zu denaturieren und Störungen durch Magnesiumionen zu verhindern. Durch Zugabe von Benzethonium-Chlorid bildet sich eine Trübung, deren Intensität bei 505 nm gemessen wird.

Konzentration der gebrauchsfertigen Lösung:

R1:	
Natriumhydroxid	530 mmol/l
EDTA	74 mmol/l
R2:	
Benzethonium-Chlorid	32 mmol/l

Herstellung und Haltbarkeit:

R1: gebrauchsfertig
R2: gebrauchsfertig

Die Reagenzien sind bei Lagerung im Dunkeln bei +2° bis +8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Onboard Stabilität:

R1: 21 Tage, geöffnet im Kühlfach der Analysengeräts
R2: 21 Tage, geöffnet im Kühlfach der Analysengeräts

Hinweis:

In vitro Diagnostikum.

Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.

Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Untersuchungsgut

Proben, die Präzipitate enthalten, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Urin:

Spontan- oder 24h –Urin verwenden.
Keine Konservierungsmittel verwenden.
Während der Probensammlung kühlen.

Cerebrospinalflüssigkeit:

Es werden keine speziellen Zusatzstoffe benötigt. Blut in der Probe macht die Probenbestimmung wertlos.

Haltbarkeit der Proben: 48 Stunden bei +2° bis +8°C

Einschränkungen des Verfahrens - Interferenzen:

Als Bewertung gilt: Wiederfindung \pm vom Ausgangswert.

Ikterus: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 20 (ca. 20 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).

Hämolyse: Aufgrund der Proteinnatur des Hämoglobins führt Hämolyse in Abhängigkeit von der Intaktheit der Erythrozyten zu erhöhten Messwerten.

Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

Das Messverfahren zeigt keine deutliche Interferenz mit:

Ascorbinsäure	Calcium	Cefazolin, Natriumsalz
Chlorpromazine	Creatinine	Gentamicin
Coffein	Glucose	Harnsäure
Harnstoff	L-Dopa	Magnesium
Natriumcitrat	Natriumoxalat	Phosphat, anorg.
Sulfat		

Testverfahren:

Anwendungen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

Gelieferte Materialien

• Reagenzien wie vorher angegeben.

Zusätzlich benötigte Materialien

• Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben.

• Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

Manuelle Testdurchführung:		
Wellenlänge:		505 nm
Reaktionstemperatur:		37°C
Schichtdicke:		1 cm
Messung:		gegen Reagenzienleerwert (RLW)
	RLW	Probe/ Kalibrator
Reagenz R1	500 μ l	500 μ l
Reagenz R2	200 μ l	200 μ l
Mischen, Extinktion (E_1) ablesen, dann zugeben:		
Probe/ Kalibrator	30 μ l	
NaCl (0,9%)	30 μ l	---
Mischen.		
10 Minuten inkubieren und Extinktion (E_2) ablesen.		
Berechnung:		
$\Delta E = (E_2 - E_1) \text{Probe oder Kalibrator}$		
Die Protein-Konzentration in Patientenproben sollte aus dem ΔE der Probe mit Hilfe eines mathematischen Modells wie logit/log berechnet oder aus einer Kalibrationskurve abgelesen werden, beruhend auf den Messergebnissen von 5 Standards. Für den Nullpunkt wird die Verwendung einer NaCl-Lösung (0,9%) empfohlen.		

Messbereich:

Kinetische Messung:

6 - 200 mg/dl (60 - 2000 mg/l)

Endpunkt Test:

2 - 200 mg/dl (20 - 2000 mg/l)

Bei höheren Konzentrationen als 200 mg/dl (2000 mg/l) die Proben mit Rerun-Funktion nachbestimmen. Bei Geräten ohne Rerun-Funktion die Proben manuell mit Natriumchlorid-Lösung (0,9%) verdünnen (z.B. 1 + 3) und die Messung wiederholen. Das Ergebnis ist mit einem geeigneten Faktor (z.B. 4) zu multiplizieren.

Referenzbereich:

Urin:

Spontan	< 12 mg/dl (< 120 mg/l)
24 Std.	< 150 mg/Tag

Cerebrospinalflüssigkeit:

15 – 45 mg/dl (150 – 450 mg/l)

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln. Für diagnostische Zwecke sind die Ergebnisse der ultrasensitiven Proteinbestimmung stets im Zusammenhang mit der Anamnese, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.

Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

6 mg/dl bzw. 60 mg/l

Die Nachweisgrenze entspricht dem niedrigsten messbaren Signal des U/CSF-Reagenz, das von Null unterschieden werden kann. Sie ist berechnet als die Konzentration, die drei Standardabweichungen oberhalb des niedrigsten Standards liegt.

Impräzision:

Die Reproduzierbarkeit in der Serie wurde mit Kontrollproben (n = 15) gemäß eines internen Protokolls bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

Urin		Tag / Tag	
Probe	MW mg / dl	SD mg / dl	CV %
Kontrolle 1	20,0	0,32	1,61
Kontrolle 2	63,0	0,98	1,56
Kontrolle 3	98,0	2,03	2,08

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde mit Kontrollproben (n = 21) gemäß eines internen Protokolls bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

Urin		In der Serie	
Probe	MW mg / dl	SD mg / dl	CV %
Kontrolle 1	23,0	0,67	2,89
Kontrolle 4	79,4	0,50	0,63

Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon® Fluitest® U/CSF (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden folgende Ergebnisse erhalten:

$$y = 0,976 x + 2,091 ; \quad r = 0,996$$

Qualitätskontrolle:

Humaner Kontrollurin:

Urine control Set 8 x 5 ml #1507

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors und den länderspezifischen Richtlinien anzupassen. Die Ergebnisse müssen innerhalb der festgesetzten Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb des Bereichs liegen.

Kalibration:

S1: 0,9% NaCl

S2-S6: Bio Cal U/CSF 5 x 1 ml #14960

Kalibrationshäufigkeit

Die Rekalibrierung wird empfohlen:

- Nach Reagenzienwechsel
- Nach 7 Tagen, durch Benutzung von "Chimneys" in R1 kann die Kalibrationsstabilität auf 14 Tage erhöht werden.

Entsorgung:

Bitte beachten Sie die jeweiligen gesetzlichen Vorschriften.

Literatur:

1. Iwata I, Nishikaze O. Clin Chem. 1979;25/7:1317 – 1319.
2. Koumantakis G. Fluorescein Interference with Urinary Creatinine and Protein Measurements. Clin Chem. 1991;37/10:1799.
3. Luxton R, Patel P, Keir G, Thompson E. Clin Chem. 1989; 35/8:1731– 1734.
4. Tietz NW. clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia, Pa. WB Saunders co; 1995;520.
5. Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saundes co; 1987:336,339,340,341.