

Instructions for Use

Cystatin C (human) ELISA

IVD

CE

REF EIA-4394



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Utilize apenas a versão válida das Instruções de Utilização fornecidas com o kit.

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas

The following changes have been made in comparison to the previous version:
Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen:
Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche:
Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior:
Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente :
Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:

9 PREPARATION OF REAGENTS:	Added: "Centrifuge liquid containing microtube vials before opening."
----------------------------	---

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	3
2	STORAGE, EXPIRATION	3
3	INTRODUCTION.....	3
4	TEST PRINCIPLE	3
5	PRECAUTIONS	4
6	TECHNICAL HINTS	4
7	REAGENT SUPPLIED	4
8	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	5
9	PREPARATION OF REAGENTS	5
10	PREPARATION OF SAMPLES.....	7
11	ASSAY PROCEDURE	8
12	CALCULATIONS.....	9
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	10
14	DEFINITION OF THE STANDARD	14
15	URINE CYSTATIN C DETERMINATION	14
16	PRELIMINARY POPULATION AND CLINICAL DATA.....	16
17	METHOD COMPARISON	19
18	TROUBLESHOOTING AND FAQS.....	20
1	VERWENDUNGSZWECK.....	21
2	LAGERUNG, HALTBARKEIT.....	21
3	EINLEITUNG.....	21
4	TESTPRINZIP	21
5	VORSICHTSMAßNAHMEN	21
6	TECHNISCHE HINWEISE	21
7	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	22
8	BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	22
9	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	22
10	PROBENVORBEREITUNG	24
11	DURCHFÜHRUNG DES TESTS.....	25
12	BERECHNUNG.....	26
13	LEISTUNGSDATEN.....	26
14	DEFINITION DES STANDARDS.....	26
15	BESTIMMUNG VON CYSTATIN C IM URIN	26
16	VORLÄUFIGE BEVÖLKERUNGSBEZOGENE UND KLINISCHE DATEN.....	26
17	METHODENVERGLEICH	26
18	FEHLERBEHEBUNG UND HÄUFIGE FRAGEN (FAQS)	27
19	REFERENCES / LITERATURE.....	28
20	PLATE LAYOUT.....	29
	SYMBOLS USED.....	30

1 INTENDED USE

The Cystatin C (human) ELISA is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human cystatin C

Features

- The total assay time is less than 2 hours.
- The kit measures total cystatin C in serum, plasma (EDTA, citrate, heparin), urine and cerebrospinal fluid.
- Assay format is 96 wells.
- Quality Controls are human serum or human urine native protein based. No animal sera are used.
- Standard is purified native protein based.
- Components of the kit are provided ready to use or concentrated.

2 STORAGE, EXPIRATION

Store the complete kit at 2 °C - 8 °C. Under these conditions, the kit is stable until the expiration date (see label on the box).

For stability of opened reagents see Chapter 9.

3 INTRODUCTION

Cysteine proteinase inhibitors, cystatins superfamily, have been identified in animals, plants and protozoa. All cystatins inactivate lysosomal cysteine proteinases, e.g. cathepsin B, H, K, L and S as well as some structurally related plant proteinases, such as papain and actininidin. Human cystatin C is produced at a constant rate by all nucleated body cells and occurs in all body fluids abundantly. It is a non-glycosilated basic single-chain protein consisting of 120 amino acids with a molecular weight of 13.36 kDa and is characterized by two disulfide bonds in the carboxy-terminal region. The protein is encoded by the CS73 gene located on the short arm of chromosome 20.

Biological function of human cystatin C, and its role in various pathological states, has been the subject of numerous studies. Imbalance between cystatin C and cysteine proteinases is associated with diseases such as inflammation, renal failure, cancer, Alzheimer disease, multiple sclerosis and hereditary cystatin C amyloid angiopathy. Its increased level has been found in patients with autoimmune diseases, with colorectal tumors and metastases, patients with inflammation and in patients on dialysis. Serum cystatin C concentration correlates negatively with glomerular filtration rate (GFR) as well as or better than creatinine, therefore was recently proposed as a new, very sensitive, marker of changes in GFR.

On the other hand, low levels of cystatin C come along the breakdown of the elastic laminae and, subsequently, the atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm, as indicate latest publications. Results make evident association of cystatin C levels with the incidence of myocardial infarction, coronary death and angina pectoris. Furthermore, cystatin C correlates with triglycerides, LDL-cholesterol, BMI and age of individuals. Thus, low concentration of cystatin C presents a risk factor for secondary cardiovascular events.

Areas of investigation:

Renal disease

4 TEST PRINCIPLE

In the Human Cystatin C ELISA, standards, quality controls and samples are incubated in microtitrate plate wells pre-coated with polyclonal anti-human cystatin C antibody.

After 30 minutes incubation and washing, polyclonal anti-human cystatin C antibody, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) is added to the wells and incubated for 30 minutes with captured cystatin C. Following another washing step, the remaining HRP conjugate is allowed to react with the substrate solution (TMB). The reaction is stopped by addition of acidic solution and absorbance of the resulting yellow product is measured

The absorbance is proportional to the concentration of cystatin C.

A standard curve is constructed by plotting absorbance values against concentrations of cystatin C standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

5 PRECAUTIONS

- **For professional use only.**
- Wear gloves and laboratory coats when handling immunodiagnostic materials.
- Do not drink, eat or smoke in the areas where immunodiagnostic materials are being handled.
- This kit contains components of human origin. These materials were found non-reactive for HBsAg, HCV antibody and for HIV 1/2 antigen and antibody. However, these materials should be handled as potentially infectious, as no test can guarantee the complete absence of infectious agents.
- Avoid contact with the acidic Stop Solution and Substrate Solution, which contains hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine (TMB). Wear gloves and eye and clothing protection when handling these reagents. Stop and/or Substrate Solutions may cause skin/eyes irritation. In case of contact with the Stop Solution and the Substrate Solution wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention, when necessary.
- The materials must not be pipetted by mouth.

6 TECHNICAL HINTS

- Reagents with different lot numbers should not be mixed.
- Use thoroughly clean glassware.
- Use deionized (distilled) water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples and reagents. For this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.
- Substrate Solution should remain colourless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light.
- Stop Solution should remain colourless until added to the plate. The colour developed in the wells will turn from blue to yellow immediately after the addition of the Stop Solution. Wells that are green in colour indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.
- Dispose of consumable materials and unused contents in accordance with applicable national regulatory requirements.

7 REAGENT SUPPLIED

Kit Components	State	Quantity
Antibody Coated Microtiter Strips	ready to use	96 wells
Conjugate Solution Conc. (50x)	concentrated	0.26 mL
Conjugate Diluent	ready to use	13 mL
Set of Standards	concentrated	6 x 0.1 mL
Quality Control HIGH	concentrated	0.1 mL
Quality Control LOW	concentrated	0.1 mL
Dilution Buffer Conc. (10x)	concentrated	10 mL
Wash Solution Conc. (10x)	concentrated	100 mL
Substrate Solution	ready to use	13 mL
Stop Solution	ready to use	13 mL

8 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized (distilled) water
- Test tubes for diluting samples
- Glassware (graduated cylinder and bottle) for Wash Solution (Dilution Buffer)
- Precision pipettes to deliver 10-1000 µL with disposable tips
- Multichannel pipette to deliver 100 µL with disposable tips
- Absorbent material (e.g. paper towels) for blotting the microtitrate plate after washing
- Vortex mixer
- Orbital microplate shaker capable of approximately 300 rpm
- Microplate washer (optional). [Manual washing is possible but not preferable.]
- Microplate reader with 450 ± 10 nm filter, preferably with reference wavelength 630 nm (alternatively another one from the interval 550 - 650 nm)
- Software package facilitating data generation and analysis (optional)

9 PREPARATION OF REAGENTS

All reagents need to be brought to room temperature prior to use.

Centrifuge liquid containing microtube vials before opening.

Always prepare only the appropriate quantity of reagents for your test.

Do not use components after the expiration date marked on their label.

Assay reagents supplied ready to use:

Antibody Coated Microtiter Strips

Stability and storage:

Return the unused strips to the provided aluminium zip-sealed bag with desiccant and seal carefully. Remaining Microtiter Strips are stable 3 months stored at 2 °C - 8 °C and protected from the moisture.

Conjugate Diluent

Substrate Solution

Stop Solution

Stability and storage:

Opened reagents are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Assay reagents supplied concentrated:

Dilution Buffer Conc. (10x)

Dilute Dilution Buffer Concentrate (10x) ten-fold in 90 mL distilled water to prepare a 1x working solution, e.g. 10 mL of Dilution Buffer Concentrate (10x) + 90 mL of distilled water for use of all 96-wells.

It is recommended to dilute only such a volume of Dilution Buffer Concentrate (10x) to be used up in the one run of the test.

Stability and storage:

The diluted Dilution Buffer is stable 1 week when stored at 2 °C - 8 °C.

Opened Dilution Buffer Concentrate (10x) is stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Set of Standards

Dilute each concentration of Standard 400x with the Dilution Buffer just prior to the assay in two steps as follows:

Dilution A (10x):

Add 10 µL of Standard into 90 µL of Dilution Buffer. **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Dilution B (40x):

Add 10 µL of Dilution A into 390 µL of Dilution Buffer to prepare final dilution (400x). **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Stability and storage:

Opened Standards are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Do not store the diluted set of Standards.

Quality Controls High, Low

Refer to the Certificate of Analysis for current Quality Control concentration!!!

Dilute each Quality Control (QC) 400x with the Dilution Buffer just prior to the assay in two steps as follows:

Dilution A (10x):

Add 10 µL of QC into 90 µL of Dilution Buffer. **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Dilution B (40x):

Add 10 µL of Dilution A into 390 µL of Dilution Buffer to prepare final dilution (400x). **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Stability and storage:

Opened Quality Controls are stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Do not store the diluted Quality Controls.

Note:

Concentration of analyte in Quality Controls need not be anyhow associated with normal and/or pathological concentrations in serum or another body fluid. Quality Controls serve just for control that the kit works in accordance with the IFU and CoA and that ELISA test was carried out properly.

It is recommended to supplement two or three negative sample controls of customer's own (in addition to those provided with this kit). They can serve as evidence of the difference between positive and negative samples (see Figure 6 and Figure 7).

Conjugate Solution Conc. (50x)

Prepare the working Conjugate Solution by adding 1 part concentrated Conjugate Solution Concentrate (50x) with 49 parts Conjugate Diluent.

Example:

0.25 mL of Conjugate Solution Concentrate (50x) + 12.25 mL of Conjugate Diluent for use of all 96-wells.

Prepare only the volume needed for the test. **Mix well** (not to foam).

Stability and storage:

Opened Conjugate Solution Concentrate (50x) is stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Do not store the diluted Conjugate Solution.

Wash Solution Conc. (10x)

Dilute Wash Solution Concentrate (10x) ten-fold in 900 mL of distilled water to prepare a 1x working solution, e.g. 100 mL of Wash Solution Concentrate (10x) + 900 mL of distilled water for use of all 96-wells.

Stability and storage:

The diluted Wash Solution is stable 1 month when stored at 2 °C - 8 °C.

Opened Wash Solution Concentrate (10x) is stable 3 months when stored at 2 °C - 8 °C.

10 PREPARATION OF SAMPLES

The kit measures cystatin C in serum, plasma (EDTA, citrate, heparin), urine and cerebrospinal fluid.

Samples should be assayed immediately after collection or should be stored at -20 °C.

Mix thoroughly thawed samples just prior to the assay and avoid repeated freeze/thaw cycles, which may cause erroneous results. Avoid using hemolyzed or lipemic samples.

Dilute samples (serum, plasma) 400x with the Dilution Buffer just prior to the assay in two steps as follows:

Dilution A (10x):

Add 10 µL of sample into 90 µL of Dilution Buffer. **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Dilution B (40x):

Add 10 µL of Dilution A into 390 µL of Dilution Buffer to prepare final dilution (400x). **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Dilute samples (CSF) 1600x with the Dilution Buffer just prior to the assay as follows:

Dilution A (40x):

Add 10 µL of sample into 390 µL of Dilution Buffer. **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Dilution B (40x):

Add 10 µL of Dilution A into 390 µL of Dilution Buffer to prepare final dilution (1600x). **Mix well** (not to foam). Vortex is recommended.

Stability and storage:

Samples should be stored at -20 °C, or preferably at -70 °C for long-term storage. Avoid repeated freeze/ thaw cycles.

Do not store the diluted samples.

For dilution of urine samples see Chapter 15.

See Chapter 13 for stability of serum and plasma samples when stored at 2 °C - 8 °C, effect of freezing/thawing and effect of sample matrix (serum/plasma) on the concentration of cystatin C.

Note: It is recommended to use a precision pipette and a careful technique to perform the dilution in order to get precise results.

11 ASSAY PROCEDURE

1. Pipet **100 µL** of diluted Standards, Quality Controls, Dilution Buffer (=Blank) and samples, preferably in duplicates, into the appropriate wells. See Figure 1 for example of work sheet.
2. Incubate the plate at room temperature (ca. 25 °C) for **30 minutes**, shaking at ca. 300 rpm on an orbital microplate shaker.
3. Wash the wells **3-times** with Wash Solution (0.35 mL per well). After final wash, invert and tap the plate strongly against paper towel.
4. Add **100 µL** of Conjugate Solution into each well.
5. Incubate the plate at room temperature (ca. 25 °C) for **30 minutes**, shaking at ca. 300 rpm on an orbital microplate shaker.
6. Wash the wells **3-times** with Wash Solution (0.35 mL per well). After final wash, invert and tap the plate strongly against paper towel.
7. Add **100 µL** of Substrate Solution into each well. Avoid exposing the microtiter plate to direct sunlight. Covering the plate with e.g. aluminium foil is recommended.
8. Incubate the plate for **10 minutes** at room temperature. The incubation time may be extended [up to 20 minutes] if the reaction temperature is below than 20 °C. Do not shake with the plate during the incubation.
9. Stop the colour development by adding **100 µL** of Stop Solution.
10. Determine the absorbance of each well using a microplate reader set to 450 nm, preferably with the reference wavelength set to 630 nm (acceptable range: 550 - 650 nm). Subtract readings at 630 nm (550 - 650 nm) from the readings at 450 nm.

The absorbance should be read within 5 minutes following step 9.

Note: If some samples and standards have absorbances above the upper limit of your microplate reader, perform a second reading at 405 nm. A new standard curve, constructed using the values measured at 405 nm, is used to determine cystatin C concentration of off-scale standards and samples. The readings at 405 nm should not replace the readings for samples that were "in range" at 450 nm.

Note 2: Manual washing: Aspirate wells and pipet 0.35 mL Wash Solution into each well. Aspirate wells and repeat twice. After final wash, invert and tap the plate strongly against paper towel. Make certain that Wash Solution has been removed entirely.

	strip 1+2	strip 3+4	strip 5+6	strip 7+8	strip 9+10	strip 11+12
A	Standard 10 000	Blank	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32
B	Standard 4 000	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33
C	Standard 2 000	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34
D	Standard 1 000	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35
E	Standard 400	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36
F	Standard 200	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37
G	QC High	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38
H	QC Low	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39

Figure 1: Example of a work sheet.

12 CALCULATIONS

Most microplate readers perform automatic calculations of analyte concentration. The standard curve is constructed by plotting the mean absorbance (Y) of Standards against the known concentration (X) of Standards in logarithmic scale, using the four-parameter algorithm. Results are reported as concentration of cystatin C ng/mL in samples.

Alternatively, the logit log function can be used to linearize the standard curve i.e. logit of the mean absorbance (Y) is plotted against log of the known concentration (X) of Standards.

Use values of undiluted standard range: 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400, 200 ng/mL.

Samples, Quality Controls and Standards are all diluted 400x prior to analysis, so there is no need to take this dilution factor into account.

Results are reported as total concentration of cystatin C (ng/mL) in serum/plasma samples.

For the determination of concentration in samples diluted differently, use dilution factor for dividing/multiplying results read off the standard curve.

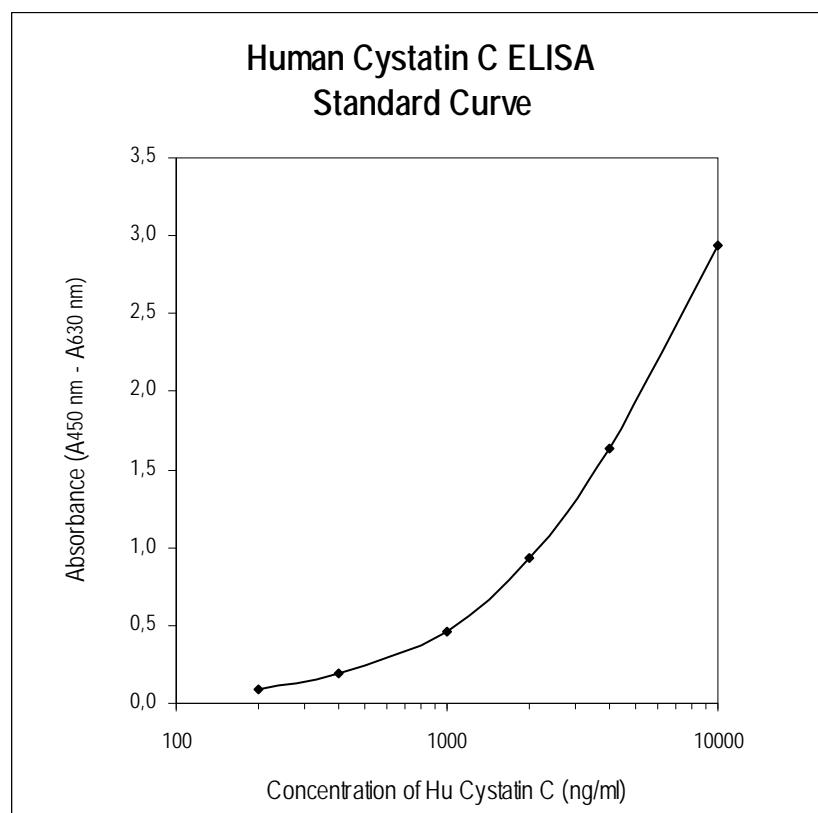


Figure 2: Typical Standard Curve for Human Cystatin C ELISA.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Typical analytical data of the Human Cystatin C ELISA are presented in this chapter.

13.1 Sensitivity

Limit of Detection (LOD) (defined as concentration of analyte giving absorbance higher than mean absorbance of blank* plus three standard deviations of the absorbance of blank: $A_{\text{blank}} + 3 \times SD_{\text{blank}}$) is calculated from the real cystatin C values in wells and is 0.25 ng/mL.

*Dilution Buffer is pipetted into blank wells.

13.2 Limit of assay

Results exceeding cystatin C level of 10 000 ng/mL should be repeated with more diluted samples. Dilution factor needs to be taken into consideration in calculating the cystatin C concentration.

Example:

Dilute samples **800x** and dilution factor needs to be taken into consideration. The result (read off standard curve) is then **multiplied by 2**.

Conversely: If a sample is diluted only **50x** instead of **400x**, due to lower concentration of analyte, the result (read off the standard curve) is **divided by** dilution factor **8**, in this case.

Standard curve is plotted without changes, in both above mentioned cases, i.e. in undiluted concentrations: 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400 and 200 ng/mL.

Note: cystatin C standard range 10 000-200 ng/mL, after 400x dilution, results in the actual concentration range 25 - 0.25 ng/mL, which represents concentration 2.5 - 0.025 ng/well.

Thus, the assay system is capable of measuring these concentrations 25 - 0.25 ng/mL in 400x diluted samples, which can help to decide what dilution choose for samples other than sera.

13.3 Specificity

The antibodies used in this ELISA are specific for human cystatin C.

Determination of cystatin C does not interfere with hemoglobin (1.0 mg/mL), bilirubin (170 umol/L) and triglycerides (5.0 mmol/L).

Sera of several mammalian species were measured in the assay. See results below.

For details please contact DRG

Mammalian serum sample	Observed Cross reactivity
Bovine	no
Cat	no
Dog	no
Goat	no
Hamster	no
Horse	no
Monkey	yes
Mouse	no
Pig	no
Rabbit	no
Rat	no
Sheep	no

13.4 Precision

Intra-assay (Within-Run) (n=8)

Sample	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
1	1510	50	3.3
2	1787	63	3.5

Inter-assay (Run-to-Run) (n=6)

Sample	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
1	1440	49	3.4
2	1712	179	10.4

13.5 Spiking Recovery

Serum samples were spiked with different amounts of human cystatin C, diluted with Dilution Buffer 400x, and assayed.

Sample	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery O/E (%)
1	771	-	-
	1146	1171	98
	1435	1571	91
	2702	2771	98
2	978	-	-
	1338	1378	97
	1566	1778	88
	2904	2978	98

13.6 Linearity

Serum samples were serially diluted with Dilution Buffer after primary dilution 400x and assayed.

Sample	Dilution	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery O/E (%)
1	-	2 773	-	-
	2x	1 340	1 387	97
	4x	662	693	95
	8x	353	347	102
2	-	2 682	-	-
	2x	1 289	1 341	96
	4x	656	671	98
	8x	331	335	99

13.7 Effect of sample matrix

EDTA, citrate and heparin plasmas were compared to respective serum samples from the same 10 individuals. Results are shown below:

Volunteer No.	Serum ng/mL	Plasma ng/mL		
		EDTA	Citrate	Heparin
1	759	744	647	903
2	763	755	749	885
3	623	610	499	829
4	491	465	444	543
5	625	707	679	815
6	1 206	737	712	862
7	676	706	574	753
8	619	646	624	690
9	605	669	668	570
10	527	631	528	619
Mean (ng/mL)	689	667	612	747
Mean Plasma/Serum (%)		97%	89%	108%

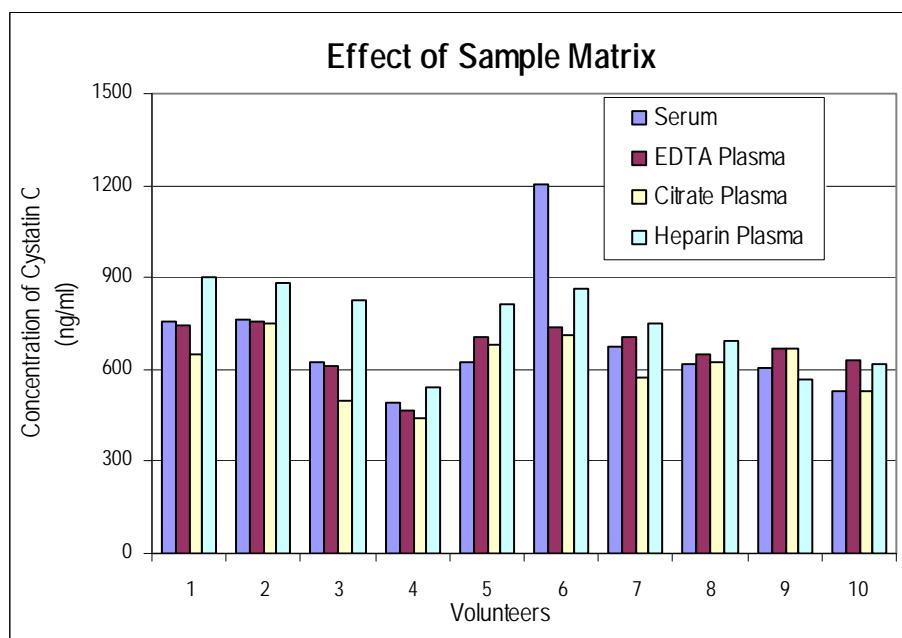


Figure. 3: Cystatin C levels measured using Human Cystatin C ELISA from 10 individuals using serum, EDTA, citrate and heparin plasma, respectively

13.8 Stability of samples stored at 2 °C - 8 °C

Samples should be stored at -80 °C. However, no decline in concentration of cystatin C was observed in serum and plasma samples after 7 days when stored at 2 °C - 8 °C. To avoid microbial contamination, samples were treated with ϵ -aminocaproic acid and sodium azide, resulting in the final concentration of 0.03% and 0.1%, respectively.

Sample Number:	Incubation: Temperature, Period	Serum (ng/mL)	Plasma (ng/mL)		
			EDTA	Citrate	Heparin
1	-80 °C	1 023	700	620	639
	2 °C - 8 °C, 1 day	921	773	592	648
	2 °C - 8 °C, 7 day	1 171	762	615	647
2	-80 °C	707	719	571	621
	2 °C - 8 °C, 1 day	725	737	568	606
	2 °C - 8 °C, 7 day	618	634	482	563
3	-80 °C	625	660	483	603
	2 °C - 8 °C, 1 day	639	637	499	620
	2 °C - 8 °C, 7 day	636	651	552	603
4	-80 °C	530	549	466	579
	2 °C - 8 °C, 1 day	561	568	518	529
	2 °C - 8 °C, 7 day	502	610	486	512

13.9 Effect of Freezing/Thawing

No decline was observed in concentration of human cystatin C in serum and plasma samples after repeated (5x) freeze/thaw cycles. However it is recommended to avoid unnecessary repeated freezing/thawing of the samples.

Sample Number:	Number of f/t Cycles	Serum (ng/mL)	Plasma (ng/mL)		
			EDTA	Citrate	Heparin
1	1x	785	774	544	867
	3x	855	765	602	783
	5x	789	755	615	746
2	1x	599	721	613	719
	3x	549	715	531	734
	5x	632	676	632	740
3	1x	618	473	310	624
	3x	523	554	260	545
	5x	593	553	855	629
4	1x	387	518	394	454
	3x	370	411	354	442
	5x	461	465	349	497

14 DEFINITION OF THE STANDARD

The Standard used in this kit is purified native protein based.

The standards used in the kit were calibrated against the European Reference Material ERM-DA471/IFCC.

15 URINE CYSTATIN C DETERMINATION

For the determination of cystatin C in urine use the serum/plasma protocol only with the following modifications:

15.1 Sample collection and storage

It is recommended to freeze down untreated urine although no significant decline was observed in concentration of human cystatin C in samples stored at 4 °C for 14 days.

15.2 Sample preparation

Dilute urine samples **20x** with Dilution Buffer just prior to use in the assay,

e.g.: 20 µL of sample + 380 µL of Dilution Buffer.

Stability and storage:

Untreated urine samples are stable for 3 months if stored at -20 °C/ -70 °C. **Do not store the diluted samples.**

15.3 Calculations of results

Standard curve is plotted using values of undiluted Standards: 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400 and 200 ng/mL.

As urine samples are diluted only **20x** whereas Standards are diluted **400x**, the result (read off the Standard curve) has to be divided by dilution factor 20 in order to obtain the real concentration in the original (undiluted) sample.

15.4 Effect of freezing/thawing on the concentration of cystatin C in urine

Cystatin C levels were determined in the morning urine from fifteen individuals who were examined because of a suspicion of renal dysfunction. All of them had urine protein < 0.3 g/day and a normal count of leukocytes in urine.

Assay results are shown below:

Sample No.	Cystatin C (ng/mL)	
	1x F/T	5x F/T
1	31	33
2	62	66
3	30	22
4	11	13
5	24	24
6	22	24
7	48	42
8	32	30
9	27	32
10	101	95
11	39	41
12	51	63
13	10	8
14	84	86
15	47	43

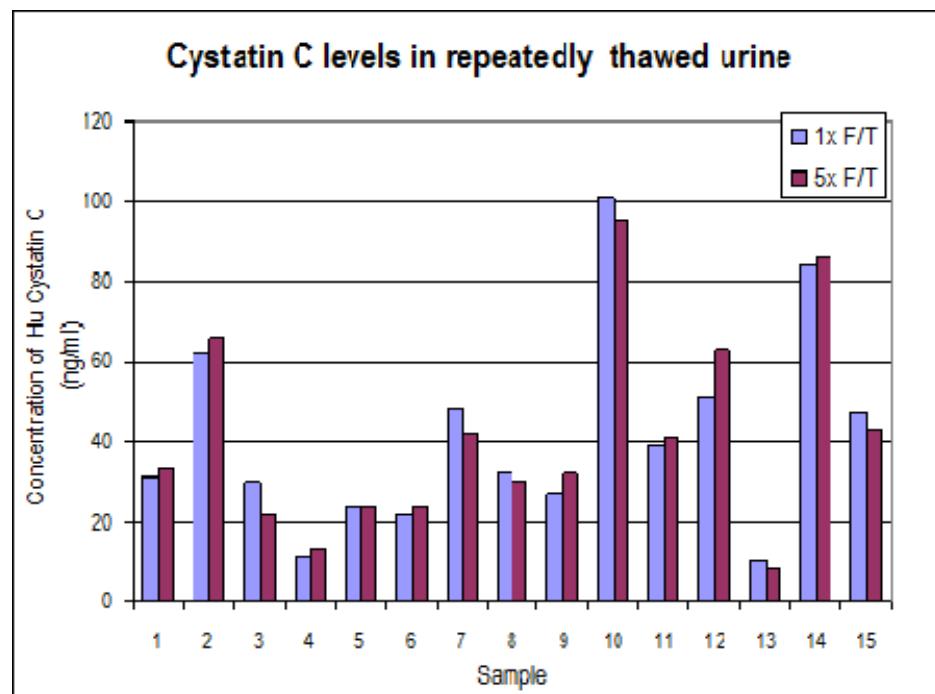


Figure 4: Cystatin C concentration was determined in urine after repeated freeze-thaw cycles. Samples were taken from fifteen individuals who were suspected to have renal dysfunction.

16 PRELIMINARY POPULATION AND CLINICAL DATA

The following results were obtained when serum samples from 155 unselected donors (89 men + 66 women) 21 - 65 years old were assayed with the Cystatin C (human) ELISA in our laboratory.

Sex	Age (years)	n	Cystatin C (ng/ml)				
			Mean	Median	SD	Min	Max
Men	20-29	17	1191.2	952.9	548.3	477.4	2225.0
	30-39	25	1204.0	1211.4	434.9	275.2	2038.5
	40-49	31	1093.6	1018.4	397.6	414.0	2353.4
	50-65	16	1208.0	960.2	639.0	529.3	3175.3
Women	20-29	12	930.2	1010.3	279.9	442.1	1263.7
	30-39	26	1082.2	1040.0	334.2	555.0	1687.5
	40-49	20	878.4	808.9	321.7	501.0	1794.4
	50-61	8	984.9	919.7	320.3	693.1	1687.5

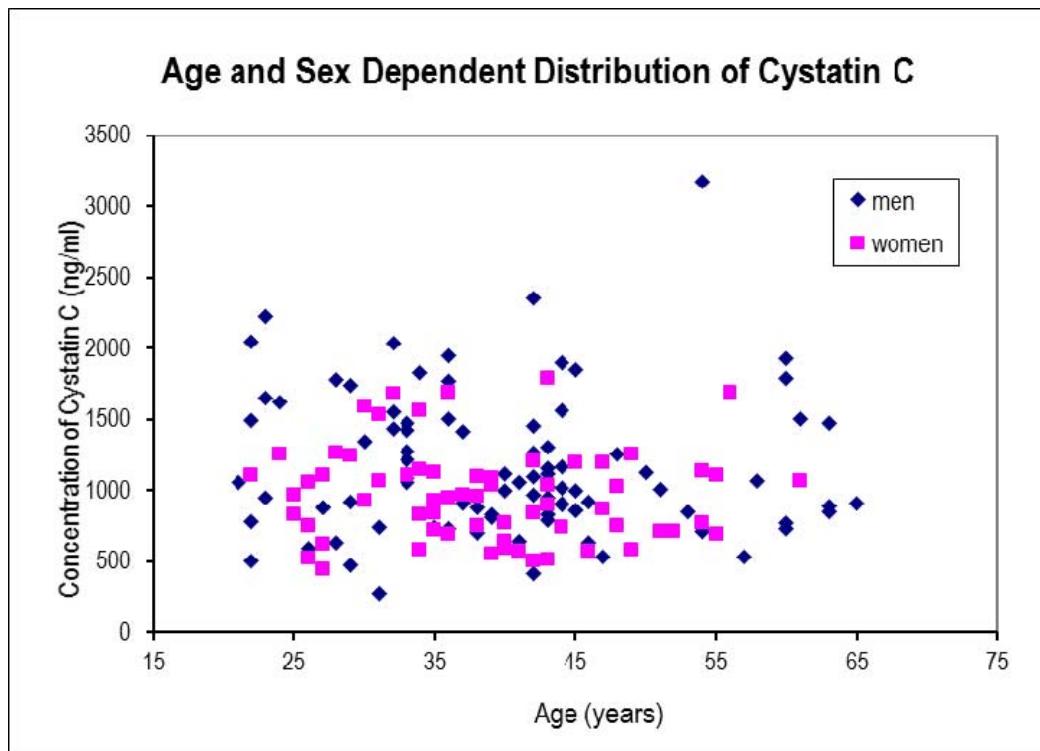


Figure 5: Human Cystatin C concentration plotted against donor age and sex.

Sera from eight patients on long-term dialysis were measured and their cystatin C levels compared to control sera from ten normal, apparently healthy individuals:

Sample No.	Cystatin C (ng/mL)	CV (%)
1	8335	6
2	8014	8
3	6822	1
4	9464	8
5	7844	8
6	3366	4
7	5955	1
8	3583	14

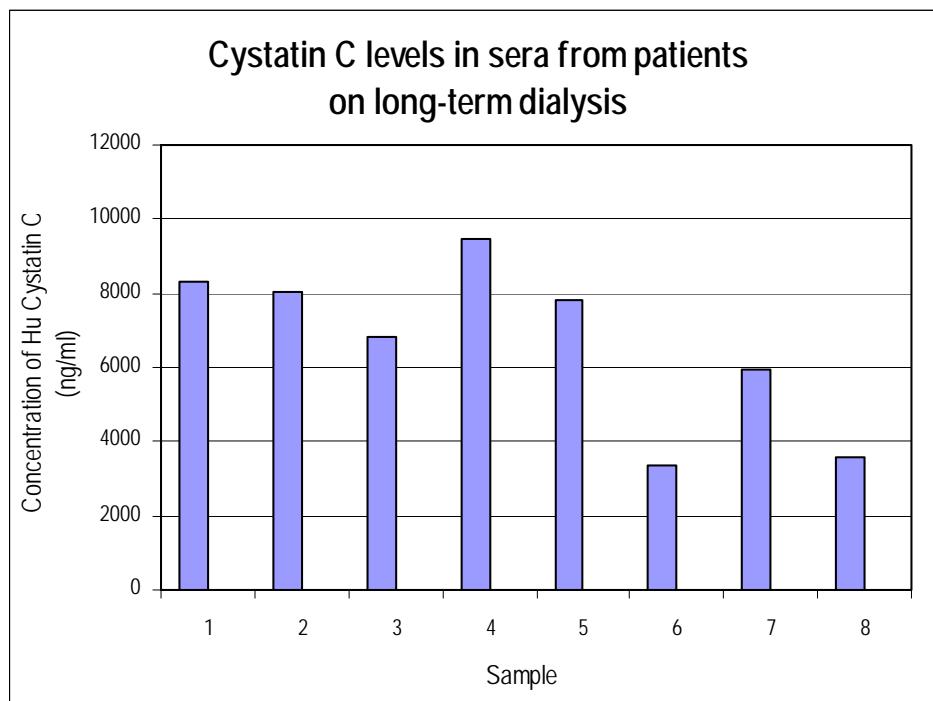


Figure 6: Cystatin C concentration was determined in serum samples from eight patients on long-term dialysis.

Sample No.	Cystatin C (ng/mL)	CV (%)
pooled serum	1032	11
1	885	9
2	979	4
3	703	8
4	1178	6
5	943	8
6	751	9
7	850	5
8	1532	6
9	1328	2

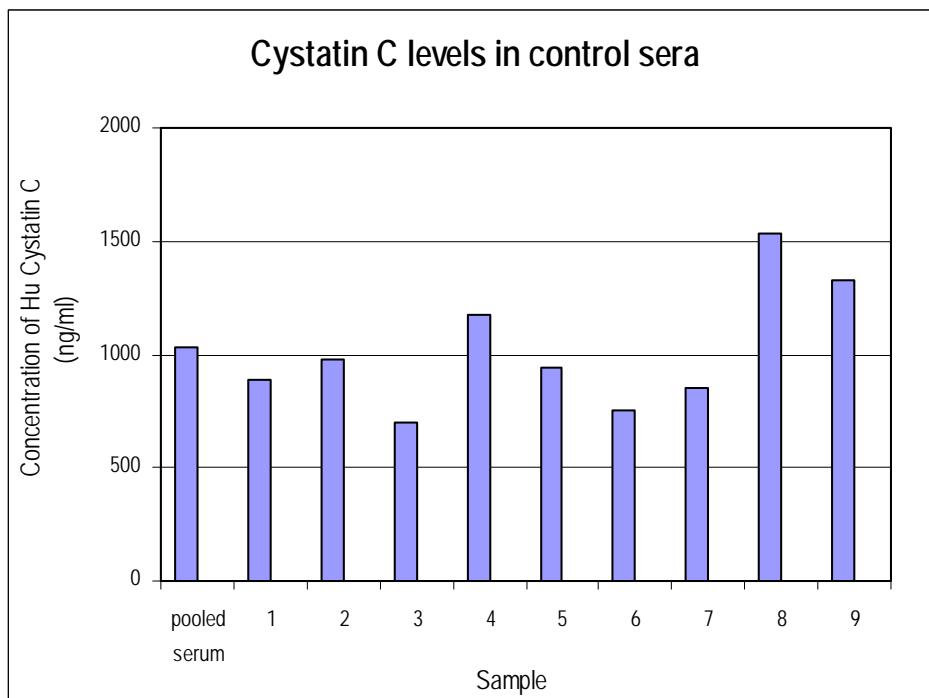


Figure 7. Samples from nine volunteers and a pooled serum were used as control sera.

Reference range

The data quoted in these instructions should be used for guidance only. It is recommended that each laboratory include its own panel of control sample in the assay. Each laboratory should establish its own normal and pathological references ranges for cystatin C levels with the assay.

17 METHOD COMPARISON

The Human cystatin C ELISA was compared to the other commercial immunoturbidimetric assay, by measuring 38 serum samples. The following correlation graph was obtained.

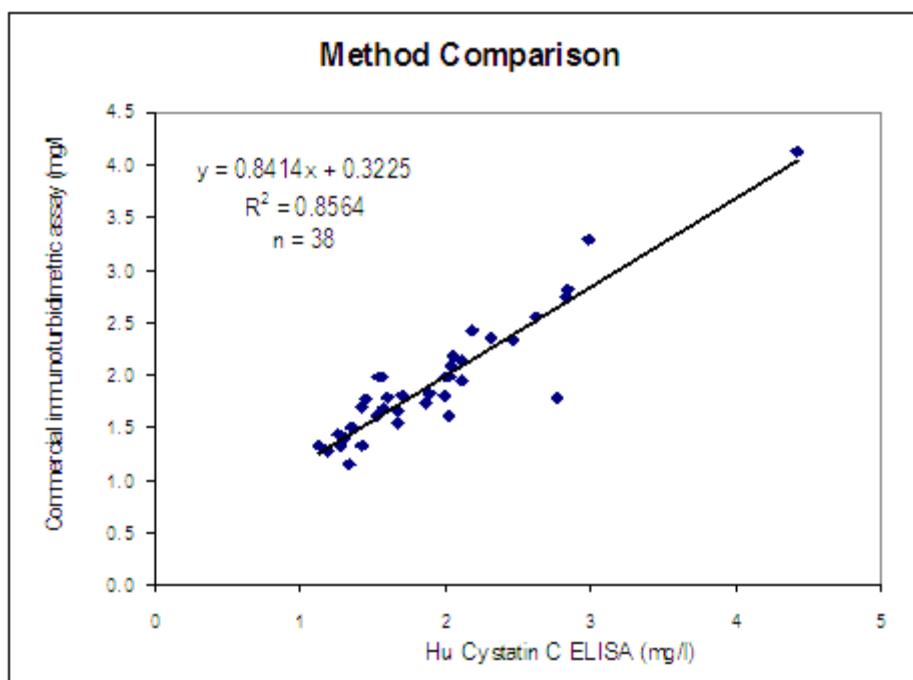


Figure 8: Method Comparison

18 TROUBLESHOOTING AND FAQS

Weak signal in all wells

Possible explanations:

- Omission of a reagent or a step
- Improper preparation or storage of a reagent
- Assay performed before reagents were allowed to come to room temperature
- Improper wavelength when reading absorbance

High signal and background in all wells

Possible explanations:

- Improper or inadequate washing
- Overdeveloping; incubation time with Substrate Solution should be decreased before addition of Stop Solution
- Incubation temperature over 30°C

High coefficient of variation (CV)

Possible explanation:

- Improper or inadequate washing
- Improper mixing Standards, Quality Controls or samples

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Cystatin C (human) ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay für die quantitative Messung von humanem Cystatin C.

Eigenschaften

- Die gesamte Testdauer beträgt weniger als 2 Stunden.
- Der Testkit misst den Gesamtgehalt an Cystatin C in Serum, Plasma (EDTA, Zitrat, Heparin), Urin und Liquor.
- Das Testformat ist eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.
- Die Qualitätskontrollen basieren auf Humanserum oder nativem Humanurinprotein. Es werden keine tierischen Seren verwendet.
- Der Standard basiert auf gereinigtem nativem Protein.
- Die Testkomponenten sind gebrauchsfertig oder Konzentrate.

2 LAGERUNG, HALTBARKEIT

Lagern Sie den kompletten Kit bei 2 °C - 8 °C. Unter diesen Bedingungen kann er bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (Etikett auf der Verpackung) verwendet werden.

Die Haltbarkeit von geöffneten Reagenzien ist in Kapitel 9 beschrieben.

3 EINLEITUNG

Siehe englische Gebrauchsanweisung

4 TESTPRINZIP

Bei dem Cystatin-C (human) ELISA werden Standards, Qualitätskontrollen und Proben in einer Mikrotiterplatte inkubiert, die mit polyklonalen Anti-Human-Cystatin-C-Antikörpern vorbeschichtet sind.

Nach 30 Minuten Inkubation und Waschen wird der polyklonale Anti-Human-Cystatin-C-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, in die Vertiefungen gegeben und 30 Minuten lang mit dem gebundenen Cystatin C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt reagiert das gebundene HRP-Konjugat mit der Substratlösung (TMB). Die Reaktion wird durch Zugabe einer Säure gestoppt und die Absorption des entstandenen gelben Reaktionsprodukts gemessen.

Die Absorption ist proportional zur Cystatin C-Konzentration.

Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Absorptionswerte gegen die Adiponectin Konzentrationen der Standards aufträgt. Die Konzentrationen in den unbekannten Proben können dann mithilfe dieser Standardkurve ermittelt werden.

5 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für den professionellen Gebrauch.**
- Tragen Sie Handschuhe und Laborkittel beim Umgang mit immundiagnostischen Materialien.
- Trinken, essen oder rauchen Sie nicht am Arbeitsplatz.
- Dieser Testkit enthält Komponenten humaner Herkunft. Dieses Material reagierte bei Tests nicht mit HbsAg (Hepatitis Oberflächen Antigen), HCV Antikörper und HIV 1/2 Antikörpern und Antigen. Dennoch sollte dieses Material, weil kein Test die vollständige Abwesenheit von infektiösen Agenzien garantieren kann, als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Vermeiden Sie den Kontakt mit der sauren Stopp Lösung und der Substrat Lösung (TMB), die Wasserstoffperoxid enthält. Wenn Sie mit diesen Reagenzien arbeiten, sollten Sie Handschuhe und eine Schutzbrille tragen. Die Stopp- und/oder Substratlösung kann Haut- oder Augenreizungen hervorrufen. Sollten Sie doch einmal mit der Stopplösung oder der Substratlösung in Kontakt kommen, so waschen Sie die Stelle gründlich mit Wasser und suchen gegebenenfalls einen Arzt auf.
- Die Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.

6 TECHNISCHE HINWEISE

- Reagenzien mit unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht gemischt werden.
- Benutzen Sie nur gründlich gereinigte Glasbehälter.
- Benutzen Sie deionisiertes (destilliertes) Wasser aus sauberen Behältern.
- Vermeiden Sie jegliche Kontamination zwischen den Proben und den Reagenzien. Verwenden Sie deshalb Einmalpipetten für jede Probe und jedes Reagenz.
- Die Substratlösung sollte farblos sein, bevor sie in die Platte pipettiert wird. Das Substrat muss vor Licht geschützt werden.

- Die Stopplösung sollte farblos sein, bevor sie in die Platte pipettiert wird. Die Farbe wechselt von Blau nach Gelb unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung. Vertiefungen mit grünlicher Farbe deuten auf unzureichende Vermischung zwischen der Substratlösung und der Stopplösung hin.
- Entsorgen Sie die Verbrauchsmaterialien und nicht gebrauchte Reagenzien entsprechend den geltenden nationalen Vorschriften.

7 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Kit Komponenten	Beschaffenheit	Menge
Antibody Coated Microtiter Strips	Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen	gebrauchsfertig	96 Wells
Conjugate Solution Conc. (50X)	Konjugatlösung (50X)	Konzentrat	0,26 mL
Conjugate Diluent	Konjugat-Diluent	gebrauchsfertig	13 mL
Set of Standards	Standard-Set	Konzentrat	6 x 0,1 mL
Quality Control HIGH	Kontrollserum Hoch	Konzentrat	0,1 mL
Quality Control LOW	Kontrollserum Niedrig	Konzentrat	0,1 mL
Dilution Buffer Conc. (10X)	Verdünnungspuffer (10X)	Konzentrat	10 mL
Wash Solution Conc. (10X)	Waschlösung (10X)	Konzentrat	100 mL
Substrate Solution	Substratlösung	gebrauchsfertig	13 mL
Stop Solution	Stopplösung	gebrauchsfertig	13 mL

8 BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Deionisiertes (destilliertes) Wasser
- Teströhrchen zur Probenverdünnung
- Glasgefäß (Messzylinder und Flasche) für die Waschlösung (Verdünnungspuffer)
- Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10-1000 µL und Einmalspitzen
- Multikanalpipette für 100 µL und Einmalspitzen
- Saugfähiges Material zum Ausschlagen und Abtupfen der Mikrotiterplatte nach dem Waschen.
- Vortex Mixer
- Orbital Mikrotiterplatten Schüttler mit ca. 300 upm
- Mikrotiterplatten Waschgerät (optional).
(Manuelles Waschen ist möglich, aber nicht zu empfehlen)
- Mikrotiterplatten Reader mit 450 ± 10 nm Filter, vorzugsweise mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm (alternativ 550-650 nm)
- Software zur Datenerfassung und -analyse (optional)

9 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung Raumtemperatur erreicht haben.

Zentrifugieren Sie Mikroreaktionsgefäß mit Flüssigkeit vor dem Öffnen.

Stellen Sie nur die jeweils benötigte Menge an Reagenzien her.

Verwenden Sie keine Komponenten mit überschrittenem Haltbarkeitsdatum.

Gebrauchsfertige Testreagenzien:

Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen

Haltbarkeit und Lagerung:

Nicht verbrauchte Streifen sollten im beiliegenden Aluminiumbeutel gut verschlossen aufbewahrt werden. Vor Feuchtigkeit geschützt sind sie 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Konjugat-Diluent

Substratlösung

Stopplösung

Haltbarkeit und Lagerung:

Die geöffneten Reagenzien sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Testreagenzien die als Konzentrat geliefert werden:**Verdünnungspuffer-Konzentrat (10x)**

Verdünnungspufferkonzentrat (10x) 10-fach in 90 mL destilliertem Wasser verdünnen, um eine 1X-Arbeitslösung herzustellen, z. B. 10 mL Dilution Buffer Concentrate (10x) + 90 mL destilliertes Wasser, wenn die ganze Platte (96 Wells) verwendet wird.

Es wird empfohlen, nur so viel Verdünnungspufferkonzentrat (10x) zu verdünnen, wie in einem Testdurchgang verbraucht wird.

Stabilität und Lagerung:

Der verdünnte Verdünnungspuffer ist 1 Woche bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Geöffnetes Dilution Buffer Concentrate (10x) 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Standard-Set

Verdünnen Sie unmittelbar vor dem Test jede Konzentration des Standards 400x mit dem Verdünnungspuffer in zwei Schritten wie folgt:

Verdünnung A (10x):

10 µL des Standards in 90 µL Verdünnungspuffer geben. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Verdünnung B (40x):

10 µL der Verdünnung A in 390 µL Verdünnungspuffer geben, um die Endverdünnung (400x) herzustellen. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Haltbarkeit und Lagerung

Die geöffneten Standards sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Die verdünnten Standards dürfen nicht gelagert werden.

Qualitätskontrollen Hoch, Niedrig**Die aktuelle Konzentration der Qualitätskontrollen ist dem Analysezertifikat zu entnehmen!!!**

Verdünnen Sie unmittelbar vor dem Test jede Qualitätskontrolle (QC) 400x mit dem Verdünnungspuffer in zwei Schritten wie folgt:

Verdünnung A (10x):

Geben Sie 10 µL der QC in 90 µL Verdünnungspuffer. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Verdünnung B (40x):

10 µL der Verdünnung A in 390 µL des Verdünnungspuffers geben, um die Endverdünnung (400x) herzustellen. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Stabilität und Lagerung:

Geöffnete Qualitätskontrollen sind 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Die verdünnten Qualitätskontrollen dürfen nicht gelagert werden.

Es wird empfohlen, zwei oder drei kundenseitige Negativkontrollen (zusätzlich zu den mit diesem Kit gelieferten) **zu verwenden**. Sie können als Nachweis für den Unterschied zwischen positiven und negativen Proben dienen (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7 der englischen Gebrauchsanweisung).

Konjugat-Konzentrat (50x)

Stellen Sie die Konjugat-Arbeitslösung her, indem Sie 1 Teil Conjugate Solution Conc. (50X) zu 49 Teilen Conjugate Diluent hinzufügen.

Beispiel:

0,25 mL Konjugat-Konzentrat (50x) + 12,25 mL Konjugat-Diluent für alle 96 Vertiefungen.

Nur das für den Test benötigte Volumen vorbereiten. Gut mischen (nicht schäumen).

Stabilität und Lagerung:

Geöffnetes Konjugat-Konzentrat (50x) ist 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Die verdünnte Konjugatlösung darf nicht gelagert werden.

Waschlösung-Konzentrat (10x)

Verdünnen Sie die Wash Solution Conc. (10x) 10-fach mit destilliertem Wasser, um die 1x-Gebrauchslösung herzustellen.

Beispiel: 100 mL 10x-Waschlösung-Konzentrat + 900 mL destilliertes Wasser für die gesamte Platte (alle 96 Vertiefungen).

Haltbarkeit und Lagerung:

Die verdünnte Waschlösung ist 1 Monat bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Das geöffnete Waschlösungskonzentrat (10x) ist 3 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

10 PROBENVORBEREITUNG

Der Testkit misst Cystatin C in Serum, Plasma (EDTA, Zitrat, Heparin), Urin und Liquor.

Die Proben sollten entweder sofort nach der Gewinnung gemessen, oder bei -20 °C gelagert werden.

Mischen Sie die aufgetauten Proben vor der Verwendung gründlich und vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Dies könnte zu falschen Ergebnissen führen. Vermeiden Sie die Verwendung von hämolytischen oder lipämischen Proben.

Verdünnen Sie die Proben (Serum, Plasma) unmittelbar vor dem Test 400-fach mit dem Verdünnungspuffer in zwei Schritten wie folgt:

Verdünnung A (10x):

Geben Sie 10 µL der Probe in 90 µL des Verdünnungspuffers. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Verdünnung B (40x):

10 µL der Verdünnung A in 390 µL des Verdünnungspuffers geben, um die Endverdünnung (400x) herzustellen. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Die Liquor-Proben (CSF) unmittelbar vor dem Test 1600x mit Verdünnungspuffer verdünnen wie folgt:

Verdünnung A (40x):

10 µL der Probe in 390 µL des Verdünnungspuffers geben. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Verdünnung B (40x):

10 µL der Verdünnung A in 390 µL des Verdünnungspuffers geben, um die Endverdünnung (1600x) herzustellen. **Gut mischen** (nicht schäumen). Vortexen wird empfohlen.

Stabilität und Lagerung:

Die Proben sollten bei -20 °C, bei Langzeitlagerung vorzugsweise bei -70 °C gelagert werden. Wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen sind zu vermeiden.

Die verdünnten Proben dürfen nicht gelagert werden.

Verdünnung von Urin-Proben – siehe Kapitel 15

Zur Stabilität von Serum- und Plasmaproben bei Lagerung bei 2 °C - 8 °C, zur Auswirkung des Einfrierens/Auftauens und zur Auswirkung der Probenmatrix (Serum/Plasma) auf die Konzentration von Cystatin C siehe Kapitel 13 der englischen Gebrauchsanweisung.

Hinweis: Es wird empfohlen, eine Präzisionspipette und eine sorgfältige Technik zur Durchführung der Verdünnung zu verwenden, um präzise Ergebnisse zu erhalten.

11 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1. Pipettieren Sie **100 µL** verdünnte Standards, Kontrollseren, Verdünnungspuffer (=Blank) und Proben am besten als Duplikate, in die vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte.
2. Inkubieren Sie die Platte bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) **30 Minuten** unter Bewegung bei etwa 300 upm auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten.
3. Waschen Sie die Platte **dreimal** mit Waschlösung (0,35 mL pro Vertiefung). Anschließend die Platte umdrehen und kräftig auf ein saugfähiges Papierhandtuch klopfen.
4. In jede Vertiefung **100 µL** Konjugatlösung zugeben.
5. Inkubieren Sie die Platte bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) **30 Minuten** unter Bewegung bei etwa 300 upm auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten.
6. Waschen Sie die Platte **dreimal** mit Waschlösung (0,35 mL pro Vertiefung). Anschließend die Platte umdrehen und kräftig auf ein saugfähiges Papierhandtuch klopfen.
7. In jede Vertiefung **100 µL** Substratlösung pipettieren. Schützen Sie die Platte vor direkter Sonneneinstrahlung, z.B. durch Bedecken mit Aluminiumfolie.
8. Inkubieren Sie die Platte für **10 Minuten** bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit kann verlängert werden (bis zu 20 Minuten), wenn die Raumtemperatur unter 20 °C liegt. Während dieser Inkubation darf die Platte nicht geschüttelt werden.
9. Stoppen Sie die Farbreaktion durch Zugabe von **100 µL** Stopplösung.
10. Bestimmen Sie die Absorption jeder Vertiefung mit einem Mikrotiterplatten Reader bei 450 nm, vorzugsweise mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm (550-650 nm sind akzeptabel). Subtrahieren Sie die Werte der Referenzwellenlänge von denen bei 450 nm. **Die Absorption sollte innerhalb von 5 Minuten nach Schritt 9 gemessen werden.**

Anmerkung 1: Wenn der Mikrotiterplatten-Reader nicht in der Lage ist die Absorption des niedrigsten Standards zu lesen, führt man eine zweite Messung bei 405 nm durch. Die neue Standardkurve, die man aus den Werten der Messung bei 405 nm erstellt, wird verwendet, um die Cystatin C-Konzentration von Proben zu bestimmen, die außerhalb des Bereichs der Standards lagen. Die Messung bei 405 nm sollte für Proben, die innerhalb der Standardkurve liegen, nicht die eigentlichen Messungen bei 450 nm ersetzen.

Anmerkung 2: Manuelles Waschen: Saugen Sie alle Vertiefungen leer und geben 0,35 mL Waschlösung zu. Wiederholen diesen Vorgang zweimal. Anschließend die Platte umdrehen und kräftig auf einem Papierhandtuch ausklopfen. Stellen Sie sicher, dass die Waschlösung vollständig entfernt wurde.

	Streifen 1+2	Streifen 3+4	Streifen 5+6	Streifen 7+8	Streifen 9+10	Streifen 11+12
A	Standard 10 000	Blank	Probe 8	Probe 16	Probe 24	Probe 32
B	Standard 4 000	Probe 1	Probe 9	Probe 17	Probe 25	Probe 33
C	Standard 2 000	Probe 2	Probe 10	Probe 18	Probe 26	Probe 34
D	Standard 1 000	Probe 3	Probe 11	Probe 19	Probe 27	Probe 35
E	Standard 400	Probe 4	Probe 12	Probe 20	Probe 28	Probe 36
F	Standard 200	Probe 5	Probe 13	Probe 21	Probe 29	Probe 37
G	QC High	Probe 6	Probe 14	Probe 22	Probe 30	Probe 38
H	QC Low	Probe 7	Probe 15	Probe 23	Probe 31	Probe 39

Abb. 1: Beispiel für ein Arbeitsblatt

12 BERECHNUNG

Die meisten Mikrotiterplatten Reader berechnen automatisch die Konzentration des Analyten. Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Absorption bei 450 nm der Standards (Y) gegen den Logarithmus (log) der bekannten Konzentrationen der Standards (X) aufträgt, unter Verwendung der Vier-Parameter-Funktion. Die Ergebnisse werden als Cystatin C-Konzentration (ng/mL) in den Proben angegeben.

Alternativ kann die logit log Funktion verwendet werden, um die Standardkurve zu linearisieren (z. B. logit der Absorption (Y) wird gegen den log der bekannten Konzentrationen (X) der Standards aufgetragen).

Verwenden Sie die Werte des unverdünnten Standardbereichs: 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400, 200 ng/mL.

Proben, Qualitätskontrollen und Standards werden alle vor der Analyse 400fach verdünnt, so dass dieser Verdünnungsfaktor nicht berücksichtigt werden muss.

Die Ergebnisse werden als Gesamtkonzentration von Cystatin C (ng/mL) in Serum-/Plasmaproben angegeben.

Für die Bestimmung der Konzentration in unterschiedlich verdünnten Proben ist der Verdünnungsfaktor zur Division/Multiplikation der aus der Standardkurve abgelesenen Ergebnisse zu verwenden.

13 LEISTUNGSDATEN

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

14 DEFINITION DES STANDARDS

Der in diesem Kit verwendete Standard basiert auf gereinigtem nativem Protein.

Die im Kit verwendeten Standards wurden gegen das Europäische Referenzmaterial ERM-DA471/IFCC kalibriert.

15 BESTIMMUNG VON CYSTATIN C IM URIN

Für die Bestimmung von Cystatin C im Urin muss das Serum/Plasma-Protokoll mit der folgenden Modifikation verwendet werden:

15.1 Probenentnahme und Lagerung

Es wird empfohlen, unbehandelten Urin einzufrieren, obwohl bei Proben, die 14 Tage lang bei 4 °C gelagert wurden, kein signifikanter Abfall der Konzentration von humanem Cystatin C beobachtet wurde.

15.2 Probenvorbereitung

Urinproben unmittelbar vor der Verwendung im Test **20-fach** mit Verdünnungspuffer verdünnen, z.B.: 20 µL Probe + 380 µL Verdünnungspuffer.

Stabilität und Lagerung:

Unbehandelte Urinproben sind 3 Monate lang stabil, wenn sie bei -20 °C/ -70 °C gelagert werden.

Die verdünnten Proben dürfen nicht gelagert werden.

15.3 Berechnungen der Ergebnisse

Die Standardkurve wird unter Verwendung der Werte der unverdünnten Standards erstellt: 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400 und 200 ng/mL.

Da die Urinproben nur **20-fach** verdünnt sind, während die Standardlösungen **400-fach** verdünnt sind, muss das Ergebnis (abgelesen aus der Standardkurve) durch den Verdünnungsfaktor 20 dividiert werden, um die tatsächliche Konzentration in der ursprünglichen (unverdünnten) Probe zu erhalten.

15.4 Einfluss des Einfrierens/Auftauens auf die Konzentration von Cystatin C im Urin

Die Cystatin-C-Konzentration wurde im Morgenurin von fünfzehn Personen bestimmt, die wegen des Verdachts auf eine Nierenfunktionsstörung untersucht wurden. Alle hatten Urinprotein < 0,3 g/Tag und eine normale Leukozytenzahl im Urin. Testergebnisse: siehe englische Gebrauchsanweisung

16 VORLÄUFIGE BEVÖLKERUNGSBEZOGENE UND KLINISCHE DATEN

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

17 METHODENVERGLEICH

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

18 FEHLERBEHEBUNG UND HÄUFIGE FRAGEN (FAQS)

Schwaches Signal in allen Vertiefungen

Mögliche Erklärung:

- Ein Reagenz oder Arbeitsschritt wurde ausgelassen
- Falsche Vorbereitung oder Lagerung eines Reagenz
- Der Test wurde durchgeführt, bevor alle Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten
- Es wurde bei einer falschen Wellenlänge gemessen

Starkes Signal und Hintergrund in allen Vertiefungen

Mögliche Erklärung:

- Falsches oder unzureichendes Waschen
- Überentwicklung: Die Inkubationszeit mit der Substratlösung vor Zugabe der Stopplösung sollte verkürzt werden
- Inkubationstemperatur über 30 °C

Hoher Variationskoeffizient (CV)

Mögliche Erklärung:

- Falsches oder unzureichendes Waschen
- Unzureichendes Mischen von Standards, Kontrollseren oder Proben

19 REFERENCES

- Ekiel I, Abrahamson M, Fulton DB, Lindahl P, Storer AC, Levadoux W, Lafrance M, Labelle S, Pomerleau Y, Groleau D, LeSauteur L, Gehring K: NMR structural studies of human cystatin C dimmers and monomers. *J Mol Biol.* **271**: 266-277 (1997)
- Tian S, Kusano E, Ohara T, Tabei K, Itoh Y, Kawai T, Asano Y: Cystatin C measurement and its practical use in patients with various renal diseases. *Clin Nephrol.* **48**: 104-108 (1997)
- Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Byrd D, Brodehl J: Cystatin C – a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics.* **101**: 875-881 (1998)
- Risch L, Blumberg A, Huber A: Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. *Nephrol Dial Transplant.* **14**: 1991-1996 (1999)
- Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW: Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **159**: 1061-1068 (2001)
- Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G: Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* **40**: 221-226 (2002)
- Mojiminiyi OA and Abdella N: Evaluation of cystatin C and beta-2 microglobulin as markers of renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* **17**: 160-168 (2003)
- Perlemoine C, Beauvieux MC, Rigalleau V, Baillet L, Barthes N, Derache P, Gin H: Interest of cystatin C in screening diabetic patients for early impairment of renal function. *Metabolism.* **52**: 1258-1264 (2003)
- Mussap M and Plebani M: Biochemistry and Clinical Role of Human Cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **41**: 467-550 (2004)
- Johnston N, Jernberg T, Lindahl B, Lindback J, Stridsberg M, Larsson A, Venge P, Wallentin L: Biochemical indicators of cardiac and renal function in a healthy elderly population. *Clin Biochem.* **37**: 210-216 (2004)
- Luc G, Bard JM, Lesueur C, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Juhan-Vague I, Fruchart JC, Ducimetiere P: Plasma cystatin-C and development of coronary heart disease: The PRIME Study. *Atherosclerosis.* (2005)
- Macisaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC, Premaratne E, Panagiotopoulos S, Smith TJ, Poon A, Jenkins MA, Ratnaike SI, Power DA Jerums G: Estimating glomerular filtration rate in diabetes: a comparison of cystatin-C- and creatinine-based methods. *Diabetologia.* **49**: 1686-1689 (2006)
- Nakashima I, Fujihara K, Fujinoki M, Kawamura T, Nishimura T, Nakamura M, Itoyama Y: Alteration of cystatin C in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* (2006)
- Delanaye P, Cavalier E, Krzesinski JM.: Cystatin C, renal function, and cardiovascular risk. *Ann Intern Med.* Jul **3**;147(1):19-27 (2007)
- Parikh NI, Hwang SJ, Yang Q, Larson MG, Guo CY, Robins SJ, Sutherland P, Benjamin EJ, Levy D, Fox CS: Clinical correlates and heritability of cystatin C (from the Framingham Offspring Study). *Am J Cardiol.* Nov 1;**102**(9):1194-8 (2008)
- Sundelöf J, Arnlöv J, Ingelsson E, Sundström J, Basu S, Zethelius B, Larsson A, Irizarry MC, Giedraitis V, Rönnemaa E, Degerman-Gunnarsson M, Hyman BT, Basun H, Kilander L, Lannfelt L: Serum cystatin C and the risk of Alzheimer disease in elderly men. *Neurology Sep 30;***71**(14):1072-9 (2008)
- Ortiz F, Harmoinen A, Paavonen T, Koskinen P, Grönhagen-Riska C, Honkanen E: Is Cystatin C more sensitive than creatinine in detecting early chronic allograft nephropathy? *Clin Nephrol.* **70**(1):18-25 (2008)
- Samouilidou EC, Grapsa E.: Relationship of serum cystatin C with C-reactive protein and apolipoprotein A1 in patients on hemodialysis. *Ren Fail.* **30**(7):711-5(2008)
- Muntner P, Mann D, Winston J, Bansilal S, Farkouh ME.: Serum cystatin C and increased coronary heart disease prevalence in US adults without chronic kidney disease. *Am J Cardiol.* Jul 1;**102**(1):54-7 (2008)
- Servais A, Giral P, Bernard M, Bruckert E, Deray G, Isnard Bagnis C.: Is serum cystatin-C a reliable marker for metabolic syndrome? *Am J Med.* May;**121**(5):426-32 (2008)
- Muntner P, Winston J, Uribarri J, Mann D, Fox CS.: Overweight, obesity, and elevated serum cystatin C levels in adults in the United States. *Am J Med.* Apr;**121**(4):341-8 (2008)
- Premaratne E, MacIsaac RJ, Finch S, Panagiotopoulos S, Ekinci E, Jerums G.: Serial measurements of cystatin C are more accurate than creatinine-based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* May;**31**(5):971-3 (2008).
- Moran A, Katz R, Smith NL, Fried LF, Sarnak MJ, Seliger SL, Psaty B, Siscovick DS, Gottdiener JS, Shlipak MG.: Cystatin C concentration as a predictor of systolic and diastolic heart failure. *J Card Fail.* Feb;**14**(1):19-26 (2008)

20 PLATE LAYOUT

1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	C	D	E	F	G	H	

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro-Diagnostikum</i> *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité