

## Набор реагентов для лабораторной диагностики *in vitro* Цистатин С (Cystatin C) (вид 129470)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор RD191009100 Human Cystatin C ELISA предназначен для количественного измерения цистатина С методом сэндвич иммуноферментного анализа.

#### Характеристики:

- Европейский союз: предназначен только для *in vitro* диагностики
- Остальные страны: предназначен только для исследовательских целей
- Общее время анализа: менее 2 часов
- Возможно измерение цистатина С в сыворотке и плазме (ЭДТА, цитрат, гепарин) крови, моче и спинномозговой жидкости
- Объем исследований составляет 96 образцов
- Контроль качества - это нативный белок на основе сыворотки или мочи человека. Сыворотка крови животных не используется.
- Стандарт приготовлен на основе очищенного нативного белка.
- Компоненты набора поставляются как готовыми к использованию, так и в концентрированном виде.

### 2. ХРАНЕНИЕ, СРОК ГОДНОСТИ

Храните набор при 2-8°C. При этом условии компоненты набора стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке набора. Информация по стабильности открытых реагентов представлена в разделе 9.

### ВВЕДЕНИЕ.

Цистатины - это суперсемейство ингибиторов цистеиновых протеаз, они обнаружены у растений, простейших, а также животных. Все цистатины инактивируют лизосомальные цистеиновые протеиназы, такие как катепсины В, Н, К, L и S, а также некоторые структурно подобные протеиназы растений, такие как папаин и актинидии. У человека цистатин С продуцируется на постоянном уровне всеми ядродержащими клетками и присутствует в больших количествах во всех биологических жидкостях. Это не гликозилированный основной одноцепочечный протеин, состоящий из 120 аминокислот, с молекулярной массой 13.36 кДа, имеются две дисульфидные связи, расположенные в С-концевом участке молекулы. Белок кодируется геном CS73, локализованном на коротком плече 20 хромосомы.

Много исследований было посвящено изучению биологических функций человеческого цистатина С, а так же его роли при различных патологических состояниях. Дисбаланс между цистатином С и цистеиновыми

протеиназами ассоциирован с воспалительными заболеваниями, почечной недостаточностью, злокачественными заболеваниями, болезнью Альцгеймера, рассеянным склерозом и наследственной цистатин С амилоидной ангиопатией. Его повышенный уровень выявляется у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, у пациентов при колоректальном раке и метастазах в кишечнике, при воспалительных заболеваниях и у пациентов, проходящих диализ. Концентрация цистатина С в сыворотке отрицательно коррелирует со скоростью клубочковой фильтрации (GFR), также, а может быть лучше, чем креатинин, поэтому цистатин С был предложен как новый, очень чувствительный маркер изменения GFR.

С другой стороны, низкий уровень цистатина С служит одной из причин снижения эластичности мембран, и, впоследствии, развития атеросклероза и аневризмы брюшной аорты, как было показано в недавних исследованиях. Их результаты сделали очевидной связь уровня цистатина С с частотой заболеваемости инфарктом миокарда, смертью от сердечной недостаточности, стенокардией. Кроме того, уровень цистатина С коррелирует с содержанием триглицеридов, холестерина ЛНП, индексом массы тела (BMI) и возрастом людей.

Таким образом, низкая концентрация цистатина С является фактором риска развития вторичных сердечно-сосудистых патологий.

#### Сфера исследований:

Заболевания почек

### 4. ПРИНЦИП МЕТОДА

В ИФА наборе BioVendor Human Cystatin C ELISA стандарты, контроли и тестируемые образцы инкубируют в лунках микропланшета. Дно лунок покрыто поликлональными антителами к цистатину С человека. После 30 минутной инкубации и промывки в лунки вносят поликлональные антитела к цистатину С человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют в течение 30 минут с захваченным цистатином С. После еще одной промывки оставшийся конъюгат HRP реагирует с раствором субстрата (ТМБ).

Реакция останавливается при добавлении стоп-раствора (кислота). Абсорбция полученного желтого раствора измеряется при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации цистатина С. Калибровочная кривая строится по значениям ОП, полученным для стандартов цистатина С, концентрации в образцах определяют с помощью построенной калибровочной кривой.

### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Только для профессионального использования.
- При работе с иммунодиагностическими реагентами используйте перчатки, очки и защитную лабораторную одежду.
- Не пейте, не ешьте и не курите в помещении, где проводится анализ.
- Этот набор содержит компоненты человеческого происхождения. Данные материалы были протестированы на наличие HBsAg, антител к вирусу гепатита С, а также антигенов и антител к ВИЧ 1/2. Тем не менее, эти материалы должны рассматриваться как потенциально инфекционно опасные, как ни один тест не может гарантировать полное отсутствие инфекционных агентов.
- Избегайте контакта со стоп-раствором (кислота) и раствором хромогенного субстрата, содержащего перекись водорода и тетраметилбензидин (ТМБ). При работе с реагентами одевайте очки защитную

лабораторную одежду. Стоп-раствор и раствор субстрата могут вызвать раздражение кожи/глаз. В случае контакта с этими реагентами тщательно промойте водой кожу/глаза, при необходимости обратитесь за медицинской помощью.

- Не пипетируйте реагенты ртом.

## 6. ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не следует смешивать реагенты из разных серий
- Используйте тщательно вымытую посуду
- Используйте деионизированную (дистиллированную) воду, храните в чистых емкостях
- Избегайте контаминации образцов и реагентов. Для этого для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники
- До внесения в лунки микропланшета раствор субстрата должен оставаться бесцветным. Держите раствор субстрата в защищенном от света месте
- До внесения в лунки микропланшета стоп-раствор должен оставаться бесцветным. Сразу после внесения стоп-раствора цвет реакционной смеси в лунках микропланшета должен поменяться с голубого на желтый. Зеленое окрашивание в лунках указывает на недостаточное перемешивание стоп-раствора с субстратом.
- Расходные материалы и неиспользованные компоненты набора утилизируйте в соответствии с действующими региональными/национальными нормативными требованиями.

## 7. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Компонент набора	Состояние	количество
Микропланшет, дно лунок покрыто антителами	Готов к использованию	96 лунок
Раствор концентрата конъюгата (50x)	Концентрат	0.26 мл
Растворитель для конъюгата	Готов к использованию	13 мл
Набор стандартов	Концентрат	6 x 0.1 мл
Контроль (QC) высокого уровня	Концентрат	0.1 мл
Контроль (QC) низкого уровня	Концентрат	0.1 мл
Концентрат буфера для разведения (10x)	Концентрат	10 мл
Концентрат буфера для промывок (10x)	Концентрат	100 мл
Раствор субстрата (ТМВ), готов к использованию	Готов к использованию	13 мл
Стоп - раствор, готов к использованию	Готов к использованию	13 мл
Инструкция к набору + сертификат анализа	Готов к использованию	1 шт.

## 8. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Пробирки для разведения образцов
- Стеклянная лабораторная посуда (градуированный цилиндр для разведения промывающего буфера)
- Калиброванные пипетки переменного объема на 10 – 1000 мкл и одноразовые наконечники к ним.
- Многоканальные пипетки переменного объема для внесения 100 мкл и одноразовые наконечники к ним.

- Фильтровальная бумага (абсорбирующий материал) для высушивания лунок микропланшета после промывки
- Вортекс
- Орбитальный микропланшетный шейкер, примерно на 300 об/мин.
- Автоматическое устройство для промывания микропланшет (опционно). Ручная промывка допустима, но не желательна.
- Микропланшетный ридер с фильтром на  $450 \pm 10$  нм, желательно при считывании ОП использовать волну сравнения 630 нм (либо в интервале от 550 до 650 нм).
- Программное обеспечение для обработки результатов (опционно).

## 9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

**Все реагенты перед использованием должны достичь комнатной температуры (20-25°C).**

**Всегда готовьте только то количество реактивов, которое необходимо для проведения теста. Не храните разведенные реагенты.**

**Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.**

- **Компоненты набора, готовые к использованию:**

**Микропланшет: 8x12 стрипов, дно лунок покрыто специфическими антителами**

**Стабильность и хранение:**

Если используется не весь микропланшет, то оставшиеся стрипы необходимо вернуть в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатать. Храните неиспользованные стрипы при 2-8°C, в защищенном от влаги месте, при этом стрипы стабильны в течение 3 месяцев.

**Растворитель для конъюгата**

**Субстратный раствор**

**Стоп-раствор**

**Стабильность и хранение:**

Реагенты стабильны в течение 3 месяцев при хранении при 2-8°C.

- **Компоненты, поставляемые в концентрированном виде:**

**Буфер для разведения (10x)**

Разведите 10 мл концентрата буфера для разведения (10x) 90 мл дистиллированной или деионизированной воды, для приготовления 100 мл готового буфера (1x). Рекомендовано разводить только необходимое для текущего анализа количество буфера.

**Стабильность и хранение:**

Готовый буфер для разведения стабилен в течение 1 недели при хранении при 2-8°C. Открытый концентрат буфера для разведения (10x) стабилен 3 месяца при хранении при 2-8°C.

**Набор стандартов**

Разведите каждый концентрированный стандарт в 400 раз буфером для разведения непосредственно перед анализом, в два этапа следующим образом:

Разведение А (10x):

Внесите 10 мкл стандарта в 90 мкл готового буфера для разведения, тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

Разведение В (40x):

Внесите 10 мкл приготовленного разведения А в 390 мкл готового буфера для разведения, для приготовления финального разведения в 400 раз. Тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

**Стабильность и хранение:**

Открытые стандарты (в наборе) стабильны в течение 3 месяцев при хранении при 2-8°C. **Не храните разведенные**

стандарты.

**Контроли качества (высокий, низкий уровни)**

**Актуальные концентрации в контролях качества указаны в Сертификате анализа!**

Разведите каждый контроль качества в 400 раз буфером для разведения непосредственно перед анализом, в два этапа следующим образом:

**Разведение А (10х):**

Внесите 10 мкл контроля качества в 90 мкл готового буфера для разведения, тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

**Разведение В (40х):**

Внесите 10 мкл приготовленного разведения А в 390 мкл готового буфера для разведения, для приготовления финального разведения в 400 раз. Тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

Стабильность и хранение:

Открытые контроли качества стабильны в течение 3 месяцев при хранении при 2-8°C. **Не храните разведенные контроли качества.**

*Внимание: Концентрация аналита в контроле может быть не связана с нормальным и/или патологическими уровнями в сыворотке крови или других жидкостях организма. Контрольные материалы необходимы только для контроля правильности работы набора в соответствии с рекомендациями по контролю качества и того, что все этапы ИФА анализа выполнены должным образом.*

Рекомендовано использовать два или три образца отрицательных контроля пользователя (вместе с поставляемыми контролями). Они могут служить для дифференцировки положительных и отрицательных образцов (см. рисунок 5 и рисунок 6).

**Раствор конъюгата (концентрат 50х):**

Приготовьте рабочий раствор конъюгата. Для этого 1 часть концентрата конъюгата (50х) разведите в 49 частях растворителя для конъюгата.

Например: 0,25 мл концентрата раствора конъюгата (50х) + 12,25 мл растворителя для конъюгата (на весь 96 луночный микропланшет). Приготовьте только необходимое количество раствора. Тщательно перемешайте, избегая образования пены.

Стабильность и хранение:

Открытый концентрат конъюгата стабилен в течение 3 месяцев при хранении при 2-8°C. **Не храните разведенный раствор конъюгата.**

**Буфер для промывок (10х):**

Разведите концентрат буфера для промывок (10х) в десять раз дистиллированной водой для приготовления рабочего раствора буфера для промывок. Например: разведите 100 мл концентрата буфера для промывок (10х) в 900 мл дистиллированной воды (на весь 96 луночный микропланшет).

Стабильность и хранение:

Разведенный буфер для промывок (1х) стабилен в течение 1 месяца при хранении при 2-8°C. Открытый концентрат буфера для промывок стабилен в течение 3 месяцев при хранении при 2-8°C.

## 10. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Набор измеряет Цистатин С в сыворотке, плазме (ЕДТА, цитрат, гепарин), моче и спинномозговой жидкости.

Образцы должны исследоваться сразу же после забора или храниться при -20°C. Перед исследованием тщательно перемешайте размороженные образцы. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания, что может привести к

ложным результатам. Избегайте использования гемолизированных или липемических образцов.

Разведите образцы (сыворотка, плазма) в 400 раз буфером для разведения прямо перед исследованием в два шага, как описано ниже:

**Разведение А (10х):**

Внесите 10 мкл образца в 90 мкл готового буфера для разведения, тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

**Разведение В (40х):**

Внесите 10 мкл приготовленного разведения А в 390 мкл готового буфера для разведения, для приготовления финального разведения в 400 раз. Тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

Разведите образцы (спинномозговая жидкость) в 1600 раз буфером для разведения прямо перед исследованием в два шага, как описано ниже:

**Разведение А (40х):**

Внесите 10 мкл образца в 390 мкл готового буфера для разведения, тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

**Разведение В (40х):**

Внесите 10 мкл приготовленного разведения А в 390 мкл готового буфера для разведения, для приготовления финального разведения в 400 раз. Тщательно перемешайте, избегая образования пены. Рекомендовано использовать вортекс.

Стабильность и хранение:

Храните образцы при -20°C или для длительного хранения желательнее при -70°C. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания. **Не храните разведенные образцы!**

**Для разведения образцов мочи см. раздел 15.**

Для определения стабильности образцов сыворотки и плазмы при хранении при 2-8°C, влияния замораживания/оттаивания и матрицы образца (сыворотки/плазмы) на концентрацию цистатина С см. главу 13.

*Примечание. Для получения точных результатов рекомендовано использовать калиброванные дозаторы и точную технику разведения.*

## 11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Внесите в соответствующие лунки микропланшета по 100 мкл каждого приготовленного стандарта, контроля, буфера для разведения (=Бланк) и разведенного образца, предпочтительно в дублях. Пример схемы размещения в лунках приведен на рис. 1.
2. Инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (25°C) в течение 30 минут, на орбитальном шейкере при 300 об/мин.
3. Тщательно промойте лунки микропланшета 3 раза буфером для промывок (по 0.35 мл). После последней промывки переверните микропланшет и аккуратно постучите им по фильтровальной бумаге.
4. Внесите во все лунки микропланшета по 100 мкл раствора конъюгата.
5. Инкубируйте лунки при комнатной температуре (25°C) в течение 30 минут, на орбитальном шейкере, при 300 об/мин.
6. Тщательно промойте лунки микропланшета 3 раза буфером для промывок (по 0.35 мл). После последней промывки переверните микропланшет и аккуратно постучите им по фильтровальной бумаге.
7. Внесите во все лунки микропланшета по 100 мкл раствора субстрата. Избегайте попадания прямых солнечных лучей

на микропланшет. Рекомендуется накрыть микропланшет алюминиевой фольгой.

8. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре (время инкубации может быть увеличено до 20 минут, если температура ниже 20°C.). Не шейкировать микропланшет во время инкубации!

9. Остановите реакцию внесением во все лунки микропланшета по 100 мкл стоп-раствора.

10. Считайте ОП при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере, предпочтительно с волной сравнения 630 нм (приемлемый диапазон 550-650 нм). Вычитайте значения ОП, полученные при считывании при 630 нм (550-650 нм) из ОП, полученной при считывании при 450 нм. **ОП считайте в течение 5 минут после выполнения п. 9.**

*Замечание 1: Если микропланшетный ридер не может считать абсорбцию самого высокого стандарта, выполните повторное считывание при 405 нм. Калибровочная кривая, построенная по значениям, считанным при 405 нм, должна быть использована для расчета значений концентрации аналита в тех образцах, значения которых выходят за диапазон считывания ридера. Считывание при 405 нм не должно заменять считывания при 450 нм.*

*Замечание 2 (ручная промывка): аспирируйте жидкость из лунок и внесите по 0.35 мл буфера для промывок в каждую лунку. Затем аспирируйте жидкость из лунок и повторите процедуру еще два раза. После последней промывки переверните микропланшет и аккуратно постучите по фильтровальной бумаге. Убедитесь, что буфер для промывок полностью удален из всех лунок.*

	Стрип 1+2	Стрип 3+4	Стрип 5+6	Стрип 7+8	Стрип 9+10	Стрип 11+12
A	Стандарт 10000	Бланк	Образец 8	Образец 16	Образец 24	Образец 32
B	Стандарт 4000	Образец 1	Образец 9	Образец 17	Образец 25	Образец 33
C	Стандарт 2000	Образец 2	Образец 10	Образец 18	Образец 26	Образец 34
D	Стандарт 1000	Образец 3	Образец 11	Образец 19	Образец 27	Образец 35
E	Стандарт 400	Образец 4	Образец 12	Образец 20	Образец 28	Образец 36
F	Стандарт 200	Образец 5	Образец 13	Образец 21	Образец 29	Образец 37
G	Контроль, высокий	Образец 6	Образец 14	Образец 22	Образец 30	Образец 38
H	Контроль, низкий	Образец 7	Образец 15	Образец 23	Образец 31	Образец 39

Рис. 1. Возможное расположение лунок микропланшета.

## 12. РАССЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство микропланшетных ИФА анализаторов имеют программы автоматического расчета результатов. Калибровочную кривую строят, откладывая полученные значения абсорбции для стандартов по оси Y и соответствующие им значения log концентраций стандартов по оси X, используя четырехпараметрическую регрессию.

Результаты определения в тестируемых образцах представлены как концентрация Цистатина С в нг/л.

Также, для линеаризации стандартной кривой может быть использована logit log функция, то есть logit среднего значения ОП (ось Y) откладывается против log значений концентраций в стандартах (ось X).

Используйте значения неразведенных стандартов (диапазон): 10 000, 4 000, 2 000, 1 000, 400, 200 нг/мл.

Так как стандарты, контроли и образцы были разведены в одинаковой пропорции (400x), то не требуется учитывать коэффициент разведения.

Результаты выражают как концентрация общего цистатина С (нг/мл) в образцах сыворотки/плазмы. Для определения

концентрации в образцах, разведенных иначе, чем стандарты, умножьте/разделите результат, считанный по калибровочной кривой, на коэффициент разведения.

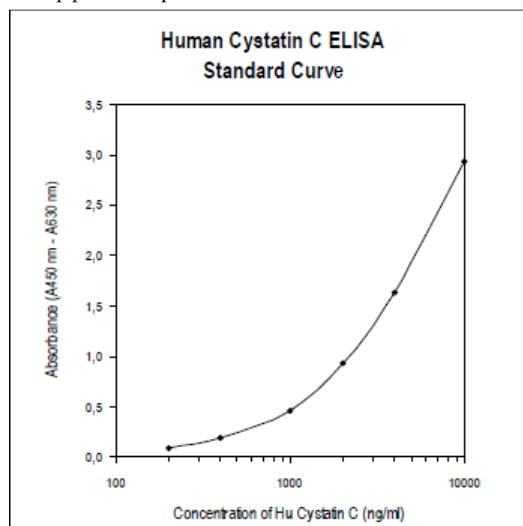


Рис.2: Типичная калибровочная кривая для цистатина С человека.

## 13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В этом разделе представлены типичные аналитические данные, полученные при использовании набора BioVendor Human Cystatin C ELISA.

### • Чувствительность

Минимально определяемая концентрация (определена как концентрация цистатина С, для которой абсорбция превышает абсорбцию бланка\* плюс 3 стандартных отклонения от среднего значения для абсорбции бланка:  $A_{\text{бланк}} + 3 \cdot SD_{\text{бланк}}$ ) составляет 0.25 нг/мл.

\* В лунки для бланка добавляли буфер для разведения.

### • Ограничения метода

Если результаты тестирования образца превышают 10000 нг/мл, то образец должен быть дополнительно разведен и протестирован еще раз. При расчете концентрации в образце необходимо учитывать коэффициент разведения.

**Например:** Разведите образцы в 800 раз, учитывая фактор разведения. Результат (полученный по калибровочной кривой) должен быть умножен на 2.

Наоборот: если образец культуральной жидкости разведен только в 50 раз, вместо 400, из-за низкой концентрации аналита, в данном случае результат (полученный по калибровочной кривой) должен быть разделен на коэффициент разведения 8.

Калибровочная кривая строится без каких-либо изменений, в обоих указанных случаях, т.е. в неразведенных концентрациях: 10000, 4000, 2000, 1000, 400 и 200 нг/мл.

*Замечание: Диапазон калибровочной кривой цистатина С 10000-200 нг/мл, после разведения в 400 раз, дает в результате актуальный диапазон концентраций стандартов 25-0.25 нг/мл, что составляет 2.5-0.025 нг/лунку. Таким образом, данный метод позволяет проводить измерение 25-0.25 нг/мл в образцах, разведенных в 400 раз, что может помочь в выборе разведения для образцов, отличных от сыворотки.*

### • Специфичность

Антитела, используемые в наборе, высоко специфичны для цистатина С человека. Не было обнаружено перекрестной реактивности с гемоглобином (1 мг/мл), билирубином (170 мкмоль/л) и триглицеридами (5,0 ммоль/л).

В данном анализе измеряли сыворотки нескольких видов млекопитающих. Результаты представлены ниже.

Образец сыворотки млекопитающего	Перекрестная реактивность
Бык	Нет

Кошка	Нет
Собака	Нет
Коза	Нет
Хомяк	Нет
Лошадь	Нет
Обезьяна	да
Мышь	Нет
Свинья	Нет
Кролик	Нет
Крыса	Нет
Овца	Нет

• **Воспроизводимость:**

**Внутри серии (n=8)**

Образец	Среднее значение нг/мл	S.D. (стандартное отклонение) нг/мл	CV (%)
1	1510	50	3.3
2	1787	63	3.5

**Между сериями (n=5)**

Образец	Среднее значение нг/мл	S.D. (стандартное отклонение) нг/мл	CV (%)
1	1440	49	3.4
2	1712	179	10.4

• **Извлечение при насыщении**

Образцы сывороток с различным содержанием цистатина С были разведены буфером для разведения 400x и проанализированы.

Образец	Наблюдаемое (мкг/мл)	Ожидаемое (мкг/мл)	Извлечения Н/О (%)
1	771	-	-
	1 146	1 171	98
	1 435	1 571	91
	2 702	2 771	98
2	978	-	-
	1 338	1 378	97
	1 566	1 778	88
	2 904	2 978	98

• **Линейность**

Образцы сыворотки пациентов (разведенные в 400 раз) были дополнительно серийно разведены буфером для разведения и проанализированы.

Образец	Разведение	Наблюдаемое (мкг/мл)	Ожидаемое (мкг/мл)	Извлечения Н/О (%)
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

• **Влияние матрикса образца**

Для 10 лиц были сравнены результаты, полученные при тестировании образцов цитратной, гепариновой и ЭДТА плазмы, а также образцов сыворотки.

Результаты представлены в таблице ниже.

Донор	Сыворотка, нг/мл	Плазма, нг/мл		
		ЭДТА	Цитрат	Гепарин
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
<b>Среднее, нг/мл</b>	<b>689</b>	<b>667</b>	<b>612</b>	<b>747</b>
<b>Среднее плазма/Сыворотка, %</b>		<b>97%</b>	<b>89%</b>	<b>108%</b>

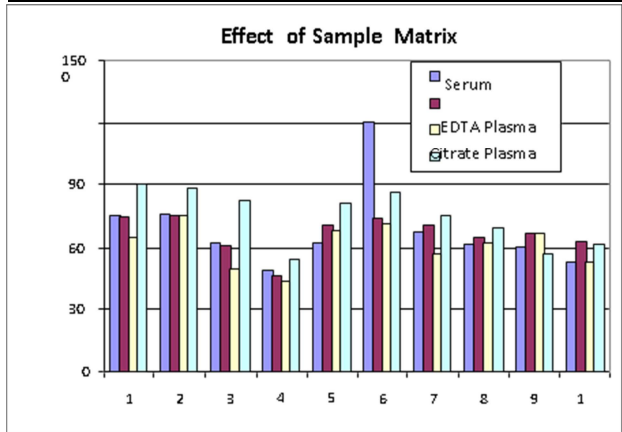


Рисунок 3: Уровни цистатина С, измеренные с использованием набора Human Cystatin C ELISA у 10 лиц, тестирование сыворотки, ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы, соответственно.

• **Стабильность образцов при 2-8°C**

Образцы должны храниться при -20°C. Однако не наблюдалось снижения концентрации адипонектина в образцах сыворотки и плазмы после хранения в течение 7 дней при 2-8°C. Для предотвращения микробной контаминации в образцы добавляли ε-аминокапроновую кислоту и азид натрия, до конечных концентраций 0.03% и 0.1%, соответственно.

Образец	Температура и время инкубации	Сыворотка, нг/мл	Плазма, нг/мл		
			ЭДТА	Цитрат	Гепарин
1	-80°C	1 023	700	620	639
	2-8°C, 1 день	921	773	592	648
	2-8°C, 7 дней	1 171	762	615	647
2	-80°C	707	719	571	621
	2-8°C, 1 день	725	737	568	606
	2-8°C, 7 дней	618	634	482	563

3	-80°C	625	660	483	603
	2-8°C, 1 день	639	637	499	620
	2-8°C, 7 дней	636	651	552	603
4	-80°C	530	549	466	579
	2-8°C, 1 день	561	568	518	529
	2-8°C, 7 дней	502	610	486	512

#### • Влияние замораживания/оттаивания

Не наблюдалось снижения концентрации человеческого цистатина С в образцах сыворотки и плазмы после повторных (до 5 раз) циклов замораживания/оттаивания. Однако рекомендуется избегать ненужных циклов замораживания/оттаивания образцов.

Образец	Кол-во циклов замораживания/оттаивания	Сыворотка, нг/мл	Плазма, мкг/мл		
			ЭДТА	Цитрат	Гепарин
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. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАНДАРТОВ

Для приготовления стандартов данного набора использован очищенный нативный белок. Стандарты, используемые в наборе, калиброваны по Европейскому референсному материалу ERM-DA471/IFCC.

#### 15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИСТАТИНА С В МОЧЕ

Для определения цистатина С в моче используют протокол, аналогичный для сыворотки/плазмы только со следующими изменениями:

##### • Сбор и хранение образцов

Рекомендуется замораживать необработанную мочу, значительного снижения концентрации цистатина С в образцах при хранении при 4°C в течение 14 дней не наблюдалось.

##### • Подготовка образцов

Разведите образцы очи в 20 раз буфером для разведения непосредственно перед тестированием (например, 20 мкл образца + 380 мкл буфера для разведения).

##### Хранение и стабильность:

Необработанные образцы стабильны в течение 3 месяцев при -20°C или -70°C. **Не храните разведенные образцы.**

##### • Расчет результатов

Постройте калибровочную кривую с использованием неразведенных стандартов: 10000, 4000, 2000, 1000, 400, 200 нг/мл.

Так как образцы мочи были разведены 20х, а стандарты в 400х, для получения реальной концентрации в неразведенном образце, результаты, считанные по калибровочной кривой, необходимо разделить в 20 раз (фактор разведения 20).

##### • Влияние замораживания / оттаивания на концентрацию цистатина С в моче

Уровни цистатина С определяли в утренней моче пятнадцати лиц, которые были обследованы при подозрении на

нарушение функции почек. У всех белок в моче <0,3 г/день и нормальное количество лейкоцитов в моче.

Результаты анализа представлены ниже:

Образец №	Цистатин С (нг/мл)	
	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

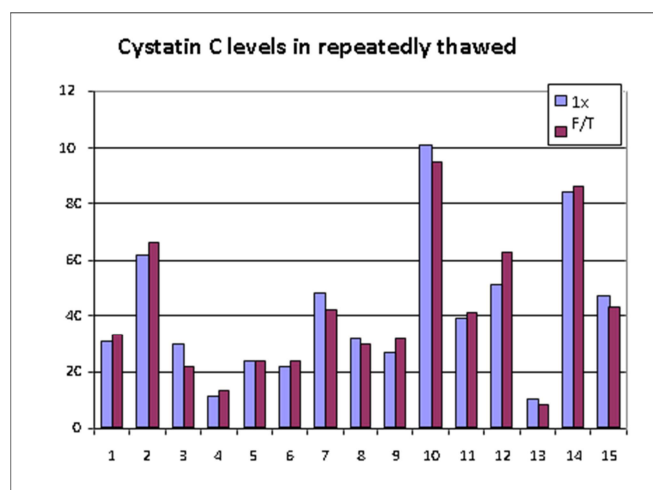


Рисунок 4: Концентрация цистатина С определялась в моче после повторных циклов замораживания-оттаивания. Образцы были взяты у пятнадцати лиц с подозрением на нарушение функции почек.

#### 16. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ПОПУЛЯЦИОННЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Следующие результаты были получены при тестировании методом ELISA Cistatin C 155 нерандомизированных доноров (89 мужчин + 66 женщин) в возрасте от 21 до 65 лет Biovendor в лаборатории производителя.

Пол	Возраст (лет)	n	Цистатин С (нг/мл)				
			Среднее	Медиана	SD	Min	Max
Муж	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
Жен	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

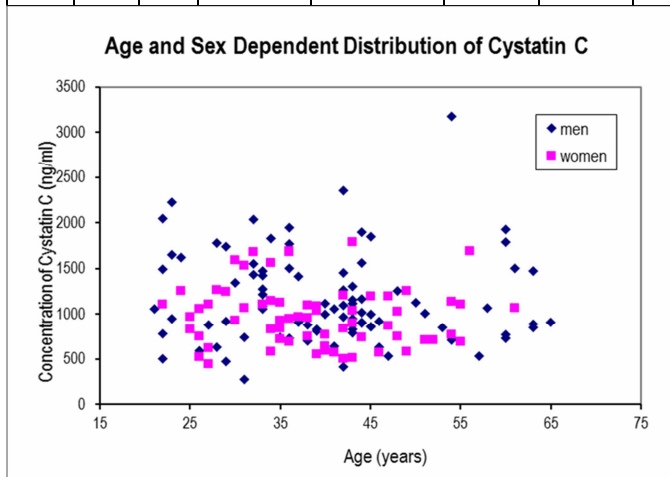


Рисунок 5: Концентрация человеческого цистатина С в зависимости от возраста и пола донора.

Были измерены сыворотки восьми пациентов, находящихся на длительном гемодиализе, уровни цистатина С в этой группе сравнили с уровнями в контрольной сыворотке десяти практически здоровых лиц:

Образец №	Цистатин С (нг/мл)	CV (%)
1	8 335	6
2	8 014	8
3	6 822	1
4	9 464	8
5	7 844	8
6	3 366	4
7	5 955	1
8	3 583	14

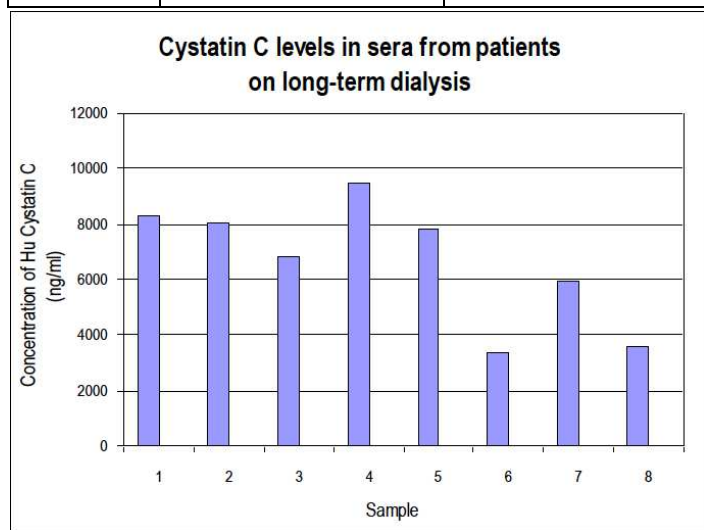


Рисунок 6: Концентрация цистатина С определялась в образцах сыворотки восьми пациентов, находящихся на длительном гемодиализе.

Образец №	Цистатин С (нг/мл)	CV (%)
Пулированная сыворотка	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

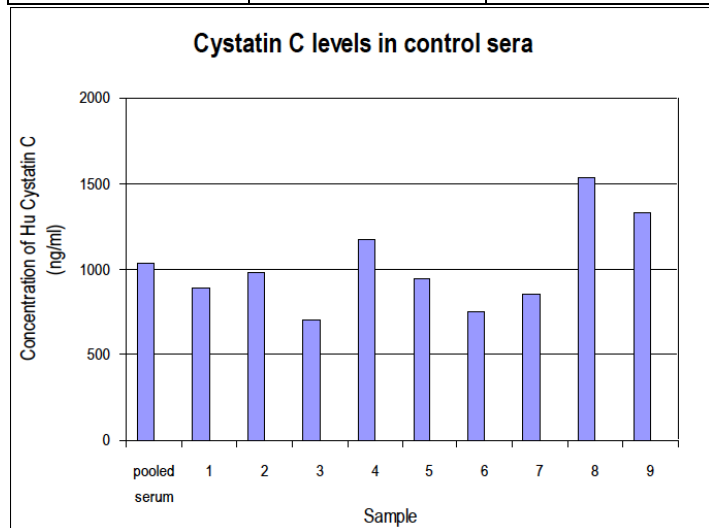


Рисунок 7: Образцы девяти волонтеров и пулированная сыворотка, используемая в качестве контрольной сыворотки.

#### • Диапазон референсных значений

Данные, приведенные в настоящей инструкции должны использоваться только в качестве ориентировочных. Рекомендовано, чтобы в каждой лаборатории при проведении серии исследований включали собственную панель контрольных образцов. Каждая лаборатория должна устанавливать собственные нормальные и патологические значения уровней Цистатина С.

#### 17. МЕТОД СРАВНЕНИЯ

Проведено сравнение тест-набора BioVendor Human Cystatin C ELISA с другим иммунотурбидиметрическим тест-набором, проанализировано 38 образцов сыворотки. Корреляционная зависимость представлена на рисунке ниже.

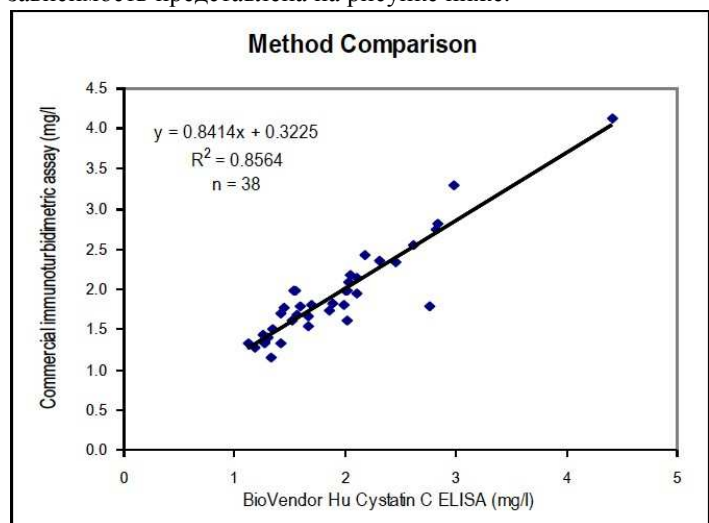


Рисунок 8: Сравнение методов.

## **18. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ**

### **A. Слабый сигнал во всех лунках**

Возможное объяснение:

- Пропуск реагента или шага
- Неправильное приготовление или хранение реагента
- Реагенты не достигли комнатной температуры к началу работы
- Неправильная длина волны при считывании оптической плотности

### **B. Высокий сигнал и фоновое окрашивание во всех лунках**

Возможное объяснение:

- Неправильные или несоответствующие промывки
- Передержка. Необходимо уменьшить время инкубации перед добавлением стоп-раствора
- Инкубация при температуре выше 30°C

### **C. Высокий коэффициент вариации (CV)**

Возможное объяснение:

- Неправильные или несоответствующие промывки
- Неправильное смешивание стандартов, контролей или образцов.