

EDI™ Human Fetuin-A ELISA Kit

ELISA zur Messung der Human-Fetuin-A-Konzentration in Serum oder Gewebeextrakt



KT 800



12x8



2-8°C

EU:



US: For In-Vitro Diagnostic Use

VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent Assay) ermöglicht die quantitative Bestimmung des humanen Fetuin-A, auch bekannt als alpha-2-HS-Glykoprotein (AHSG), im Serum, Plasma, Zellkultur, Gewebeextrakt und Urin. Die Messung des Fetuin-A unterstützt die Diagnose von einigen Krebserkrankungen und des genetisch bedingten Mangels an diesem Serumprotein. Dieser Fetuin-A ELISA Kit ist für den professionellen Laboreinsatz bestimmt.

Klinische Bedeutung

Fetuin-A, auch bekannt als alpha-2-HS-Glykoprotein, ist ein 59 kDa schweres Glykoprotein, das aus zwei aminoterminalen Cystatin-Domänen und einer kleineren C-terminalen Domäne besteht. Fetuin-A wird in der Leber synthetisiert und in den Blutstrom abgesondert. Die Konzentration liegt bei erwachsenen Säugetieren im Bereich von 0,5 – 1,0 g/l. Fetuin-A kommt während der Fetalperiode in hohen Konzentrationen im Serum vor und wirkt bei der Proteasehemmung und der entwicklungsbedingten Regulation des Kalziummetabolismus und der Osteogenese mit. Es wird in Knochen und Zähnen als eine wichtige Fraktion der nicht-kollagenen Knochenproteine akkumuliert. Biologisch gesehen wurde durch Studien belegt, dass Fetuin-A der wichtigste Verkalkungsinhibitor im Serum ist und dort die Präzipitation von Kalziumsalzen hemmt. Neuere Forschungen weisen darauf hin, dass die Fetuin-A-Konzentration bei urämischen Hämodialyse-Patienten im Vergleich zu normalen gesunden Kontrollen absinkt. Die niedrige Fetuin-A-Konzentration wird mit einer höheren kardiovaskulären Mortalität bei Dialyse-Patienten assoziiert.

TESTPRINZIP

Dieser ELISA wurde für die quantitative Messung des humanen Fetuin-A in Serumproben entwickelt und hergestellt. Der Assay verwendet die „Sandwich“-Technik mit zwei spezifischen polyklonalen Ziegenantikörpern gegen humanes Fetuin-A, die sich an verschiedene Epitope des humanen Fetuin-A binden.

Assay-Standards, Kontrollen und vorverdünnte humanes Fetuin-A-enthaltende Patientenserumproben werden in die Kavitäten einer Mikroplatte gegeben, die mit einem hochaffinen polyklonalen Ziegenantikörper gegen humanes Fetuin-A beschichtet sind. Während der ersten Inkubationszeit fängt dieser Antikörper humanes Fetuin-A in der Probe. Anschließend werden ungebundene Proteine aus jeder Kavität ausgewaschen. Danach wird ein Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugierter polyklonaler Antikörper gegen humanes Fetuin-A in jede Kavität hinzugegeben, und es bildet sich ein „Sandwich“ aus Capture-Antikörper – humanem Fetuin A – HRP-konjugiertem Tracer-Antikörper. Der ungebundene Tracer-Antikörper wird in einem anschließenden Waschvorgang ausgewaschen. Der in den Kavitäten gebundene HRP-konjugierte Tracer-Antikörper wird dann in einer zeitlich genau festgelegten Reaktion mit einer Substratlösung inkubiert und in einem spektrophotometrischen Mikroplattenlesegerät gemessen. Die enzymatische Aktivität des in den Kavitäten gebundenen Tracer-

Antikörpers ist direkt proportional zu der Menge an Fetuin-A in der Probe. Zur Erstellung einer Standardkurve wird die Absorption gegen die entsprechende Human-Fetuin-A-Konzentration jedes Standards in einer Punkt-zu-Punkt- oder kubischen Skalierung aufgetragen. Die Konzentration des humanen Fetuin-A in den Testproben wird direkt aus dieser Standardkurve ermittelt.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Dieser Test-Kit muss nach Erhalt bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Test-Kits vermerkt. Alle Komponenten sind bis zu dem aufgeführten Verfallsdatum bei einer Lagerung von 2-8°C stabil.

Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht kombiniert oder ausgetauscht werden.

- 1. Mikrotiterplatte, mit Fetuin-A-Antikörper beschichtet (Artikelnr. 30010)**
12 x 8 Streifen (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit Antikörper gegen humanes Fetuin-A. Platte mit Rahmen, zusammen mit Trockenmittel in Folienbeutel eingeschweißt.
Die Platte sollte bei 2-8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
- 2. Fetuin-A-Tracer-Antikörper (Artikelnr. 30009)**
Ein Fläschchen mit 0,6 ml konzentriertem HRP-konjugiertem Tracer-Antikörper gegen humanes Fetuin-A in einer stabilisierten Proteinmatrix.
Dieses Reagenz muss vor Gebrauch mit Tracer-Antikörper-Puffer verdünnt werden. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
- 3. Tracer-Antikörper-Puffer (Artikelnr. 30017)**
Ein Fläschchen mit 12 ml gebrauchsfertigem Puffer auf Trizma Hydrochlorid-Basis.
Er darf nur für die Verdünnung des Tracer-Antikörpers verwendet werden. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
- 4. Fetuin-A-Assay-Pufferkonzentrat (Artikelnr. 10011)**
Ein Fläschchen mit 11 ml konzentrierter phosphatgepufferter Salzlösung, angereichert mit bovinem Serum-Albumin.
Dieser konzentrierte Assay-Puffer muss vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser (11 ml Konzentrat plus 99 ml Aqua dest.) verdünnt werden. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.

5. **ELISA-Waschkonzentrat (Artikelnr. 10010)**
Eine Flasche enthält 20 ml eines 30fachen Konzentrats.
Vor Gebrauch muss der Inhalt mit 580 ml Aqua dest. verdünnt und sorgfältig gemischt werden. Dies ergibt eine gebrauchsfertige Waschlösung, die ein Detergens in phosphatgepufferter Salzlösung mit einem nicht-aziden Konservierungsmittel enthält. Die Lösung sollte bei Raumtemperatur gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
6. **ELISA-HRP-Substrat (Artikelnr. 10020)**
Eine Flasche enthält 12 ml Tetramethylbenzidin (TMB) mit Wasserstoffperoxid.
Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
7. **ELISA-Stopplösung (Artikelnr. 10030)**
Eine Flasche enthält 12 ml 0,5 M Schwefelsäure.
Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C oder Raumtemperatur gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Kit vermerkten Verfallsdatum stabil.
8. **Fetuin-A-Standards (Artikelnr. 30001 – 30005)**
5 Fläschchen. Jedes enthält humanes Fetuin-A in einer auf bovinem Serum basierenden Matrix mit einem nicht-aziden Konservierungsmittel. **Die genaue Konzentration jedes Standards ist auf dem Fläschchen aufgeführt.** Alle Standards sollten nach dem ersten Gebrauch bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 3 Gefrierzyklen sind möglich.
9. **Fetuin-A-Kontrollen (Artikelnr. 30007 – 30008)**
2 Fläschchen. Jedes enthält humanes Fetuin-A in einer auf bovinem Serum basierenden Matrix mit einem nicht-aziden Konservierungsmittel. **Der genaue Referenzbereich jeder Kontrolle ist auf den Fläschchen aufgeführt.** Beide Kontrollen sollten nach dem ersten Gebrauch bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 3 Gefrierzyklen sind möglich.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Diese Reagenzien sind für die in-vitro-Diagnostik in klinischen Referenzlaboratorien geeignet und sollten nur von Fachpersonal verwendet werden. Das Ausgangsmaterial für die Reagenzien, die auf bovinem Serum basieren, stammt aus 48 US-Bundesstaaten. Es wurde von gesunden Spendertieren, die unter veterinärer Aufsicht standen, gewonnen und war frei von übertragbaren Krankheiten. Während der Durchführung des Assays Handschuhe tragen und die Reagenzien als potenziell gefährliches Material behandeln. Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. TMB kann zu Reizungen der Haut und Schleimhäute führen und allergische Hautreaktionen verursachen. TMB steht unter Verdacht, karzinogen zu wirken. Schwefelsäure kann bei Kontakt schwere Reizungen der Haut auslösen. Berührung mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Dämpfe nicht einatmen. Bei Kontakt mit diesen Stoffen mindestens 15 Minuten mit viel Wasser abspülen. Grundsätze der Guten Laborpraxis befolgen.

NICHT MITGELIEFERTE, BENÖTIGTE MATERIALIEN

1. Präzisionspipetten für 10 µl, 25 µl, 100 µl und 1000 µl
2. Mehrfachpipetten für 100 µl
3. Einweg-Pipettenspitzen zum Dispensieren von obengenannten Volumina
4. Einweg-Glas- oder Plastikröhrchen, 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm

5. Einweg-Plastikflaschen mit Verschlussdeckel, 100 ml und 1000 ml
6. Aluminiumfolie
7. Entionisiertes oder destilliertes Wasser
8. Plastikabdeckung für Mikrotiterplatte oder Polyäthylen-Folie
9. Absaugvorrichtung mit Multikanalpipette oder automatische (halbautomatische) Waschvorrichtung
10. Spektrophotometrisches Mikroplattenlesegerät, geeignet für die Messung bei 450 nm

ENTNAHME UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Es werden nur 10 µl Humanserum oder Plasma für die Messung des Fetuin-A benötigt. Eine spezielle Vorbereitung des Patienten ist vor der Probenentnahme nicht erforderlich. Das entnommene Vollblut sollte mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur koagulieren, bevor das Serum durch Zentrifugieren (850 – 1500xg für 10 Minuten) getrennt wird. Das Serum ist innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme vom Gerinnsel abzusondern und in ein sauberes Teströhrchen zu transferieren. Serumproben können bis zur Messung bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Die Probe sollte nicht mehr als drei Tau-/Gefrierzyklen durchlaufen.

Für die Fetuin-A Bestimmung im Urin wird 24 Stunden Urin empfohlen. Spontan Urin der 2. Morgenurinierung darf auch verwendet werden, falls physikalische Aktivität vor der Entnahme ausgeschlossen werden kann und keine polyuri-renale-Dysfunktion nachgewiesen ist. Die Intra-individuelle tägliche Fluktuation in der Urine Protein Konzentration (bei Diurese) kann reduziert werden durch die Beziehung zu der Kreatinin-Konzentration im Urin. **Für genaueren Fetuin-A Resultate sollten Zellkultur Ueberstand, Gewebe Extrakte, reihenmässig verdünnt und vielfach verdünnte Proben gemessen werden.**

TESTVERFAHREN

1. Vorbereitung der Patientenprobe

- Die Patientenprobe muss vor der Messung im Verhältnis 1:10.000 mit Assay-Puffer verdünnt werden.
- 1) 2 Teströhrchen (12x75 mm) mit 1A und 1B etikettieren
 - 2) 1 ml des Assay-Puffers in jedes Röhrchen geben (sowohl in 1A als auch 1B)
 - 3) 10 µl der Patientenprobe in das Röhrchen 1A pipettieren und sorgfältig mischen (Verdünnung 1:100)
 - 4) 10 µl der verdünnten Patientenprobe von Röhrchen 1A in Röhrchen 1B pipettieren und sorgfältig mischen (Verdünnung 1:10.000)

Bitte beachten: Es wird empfohlen, eine kalibrierte bzw. Präzisionspipette und eine sorgfältige Technik für den Verdünnungsvorgang zu verwenden, um präzise Ergebnisse zu erhalten. Wir empfehlen die Verwendung der Eppendorf Mehrfachpipette mit 12,5 ml Combitip für die Zugabe von 1 ml Assay-Puffer. Keine 50 ml Combitip verwenden. Eine Urinprobe muss vor der Messung 1:100 mit Assay Puffer verdünnt werden

- (1) 1 Teströhrchen (12x75 mm) mit 1 etikettieren
- (2) 1 ml Assay Puffer zugeben
- (3) 10 µl Urin ins Röhrchen 1 geben und gut mischen (1:100 Verdünnung)

Bitte beachten: Falls ein Fetuin-A Resultat höher ist als die Standard 5, bitte die Probe weiterverdünnen (z.B. 1:500), damit ein genaueres Resultat erzielt wird.

2. Vorbereitung der Reagenzien

- 1) Vor Gebrauch die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Reagenzien von unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht kombiniert oder untereinander ausgetauscht werden.
- 2) Fetuin-A-Assay-Pufferkonzentrat und ELISA-Waschkonzentrat müssen vor dem Einsatz zu einer Gebrauchslösung verdünnt werden. Details dazu sind unter dem Kapitel „VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN“ aufgeführt.

3. Testverfahren

- 1) Eine ausreichende Anzahl an Antikörper-beschichteten Teststreifen in den Teststreifenhalter legen, um Fetuin-A-Standards, Kontrollen und Patientenproben als Doppelbestimmung zu testen.
- 2) Testkonfiguration

REIHE	STREIFEN 1	STREIFEN 2	STREIFEN 3
A	STD 1	STD 5	PROBE 2
B	STD 1	STD 5	PROBE 2
C	STD 2	C 1	PROBE 3
D	STD 2	C 1	PROBE 3
E	STD 3	C 2	
F	STD 3	C 2	
G	STD 4	PROBE 1	
H	STD 4	PROBE 1	

- 3) 25 µl Standards, Kontrollen und 1:10.000 verdünnte Patientenproben, oder 1:100 verdünnte Urinproben in die vorgesehenen Kavitäten geben.
- 4) 100 µl Assay-Puffer in jede Kavität geben.
- 5) Sorgsam mischen und die Platte versiegeln. Zusätzlich die Platte mit Aluminiumfolie abdecken, um eine Lichtexposition zu vermeiden.
- 6) Die Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- 7) Die Tracer-Antikörper-Gebrauchslösung zubereiten, indem Fetuin-A-Tracer-Antikörper im Verhältnis 1:21 mit Tracer-Antikörper-Puffer verdünnt wird. Für jeden Streifen muss 1 ml des Tracer-Antikörper-Puffer mit 50 µl Fetuin-A-Tracer-Antikörper in einem sauberen Teströhrchen gemischt werden.
- 8) Die Aluminiumfolie und die Plattenversiegelung entfernen. Den Inhalt jeder Kavität absaugen. Jede Kavität fünfmal waschen, indem 350 µl der Waschlösung in jede Kavität dispensiert und der Inhalt anschließend vollständig abgesaugt wird. Alternativ kann eine automatische Waschvorrichtung verwendet werden.
- 9) 100 µl der verdünnten Tracer-Antikörper-Gebrauchslösung in jede Kavität geben.
- 10) Die Platte versiegeln und zusätzlich mit Aluminiumfolie abdecken, um eine Lichtexposition zu vermeiden.
- 11) Die Platte bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
- 12) Die Aluminiumfolie und die Plattenversiegelung entfernen. Den Inhalt jeder Kavität absaugen.

Jede Kavität fünfmal waschen, indem 350 µl der Waschlösung in jede Kavität dispensiert und der Inhalt anschließend vollständig abgesaugt wird. Alternativ kann eine automatische Waschvorrichtung verwendet werden.

- 13) 100 µl des HRP-Substrats in jede Kavität geben.
- 14) Die Platte mit Aluminiumfolie abdecken, um eine Lichtexposition zu vermeiden.
- 15) Die Platte bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubieren.
- 16) Die Aluminiumfolie entfernen. 100 µl der Stopp-Lösung in jede Kavität geben. Vorsichtig mischen.
- 17) Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 Minuten mit Hilfe eines Mikroplattenlesegeräts messen

BITTE BEACHTEN: Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, kann das Gerät auf eine Messung mit dualer Wellenlänge bei 450 nm und einer Hintergrundwellenlängenkorrektur von 595 nm, 620 nm oder 630 nm eingestellt werden.

ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

- 1) Es wird empfohlen, alle Standards, Kontrollen und Proben als Doppelbestimmung zu messen. Der mittlere Absorptionswert jeder Doppelmessung sollte zur Datenreduktion und zur Berechnung der Ergebnisse verwendet werden.
- 2) Lichtempfindliche Reagenzien in den bernsteinfarbenen Originalflaschen aufbewahren.
- 3) Die unbenutzten beschichteten Streifen zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel lagern, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.
- 4) Eine sorgfältige Technik und der Einsatz von ordnungsgemäß kalibrierten Pipettiergeräten sind notwendig, um eine Reproduzierbarkeit der Testergebnisse sicherzustellen.
- 5) Inkubationszeiten oder Temperaturen, die von jenen abweichen, die in der Kit-Beilage aufgeführt sind, können die Ergebnisse beeinträchtigen.
- 6) Luftblasen in den Kavitäten vermeiden, da dies zu einer geringeren Bindungsfähigkeit und einem höheren Variationskoeffizienten bei der Doppelmessung führen kann.
- 7) Alle Reagenzien sollten sorgfältig und gründlich vor Gebrauch gemischt werden. Schaumbildung vermeiden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Die mittlere Absorption für jede Doppelbestimmung berechnen.
2. Die mittlere Absorption des Standard 1 (0 ng/ml) von der mittleren Absorption aller anderen Messungen subtrahieren, um einen korrigierten Absorptionswert zu erhalten.
3. Die Erstellung der Standardkurve erfolgt, indem die korrigierten Absorptionswerte aller Standardkonzentrationen auf die Ordinate gegen die Standardkonzentrationen auf der Abszisse von Punkt zu Punkt oder doppellogarithmischem Papier eingetragen werden. Auch geeignete computergestützte Datenreduktionsprogramme können für die Berechnung der Ergebnisse eingesetzt werden.

Die Konzentrationen des humanen Fetuin-A in den Kontrollen und den 1:10.000 verdünnten Proben werden direkt aus der Standardkurve anhand ihrer jeweiligen korrigierten Absorption abgelesen. Wenn doppeltlogarithmisches Papier oder computergestützte Datenreduktionsprogramme mit logarithmischer Transformation verwendet werden, sollten Proben mit einer korrigierten Absorption, die zwischen dem 1 ng/ml Standard und dem nächsthöheren Standard liegt, mit folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Unbekannter Wert} = \frac{\text{Korrigierte Absorption (Probe)}}{\text{Korrigierte Absorption (2. Standard)}} \times \text{Wert des 2. Standards}$$

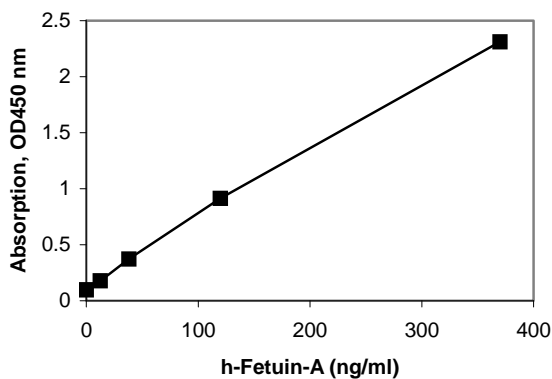
BEISPIELDATEN UND STANDARDKURVE

Typische Absorptionsdaten und die daraus resultierende Standardkurve des Human Fetuin-A ELISA werden dargestellt.

Diese Kurve sollte nicht anstelle einer mit jedem Assay erstellten Standardkurve verwendet werden.

Kavität I.D.	OD 450 nm Absorption			Ergebnisse ng/ml
	Messungen	Mittel	Korrigiert	
0	0,097	0,098	0,000	
ng/ml	0,099			
12,5	0,173	0,179	0,081	
ng/ml	0,185			
38	0,364	0,371	0,273	
ng/ml	0,379			
120	0,876	0,913	0,815	
ng/ml	0,949			
370	2,298	2,312	2,214	
ng/ml	2,325			
Kontrolle 1	0,471	0,484	0,386	55,1 ng/ml
	0,498			
Kontrolle 2	1,697	1,690	1,592	258,9 ng/ml
	1,700			

Human Fetuin-A ELISA



ERWARTETE WERTE

70 Seren von gesunden Erwachsenen wurden mit dem Human Fetuin-A ELISA gemessen. Der Normalbereich (95. Perzentil) lag zwischen 0,35 bis 0,95 g/l mit einem Mittelwert von 0,57 g/l und einer Standardabweichung von 0,13 g/l.

Der 10.000fache Verdünnungsfaktor muss zu jeder Probe hinzugerechnet werden, um die ursprüngliche Fetuin-A-Konzentration in der Probe zu erhalten. Beispiel: Der 1/10.000fache Wert in der verdünnten Probe beträgt, wenn er direkt aus der Standardkurve abgelesen wird, 24,3 ng/ml. Die ursprüngliche Fetuin-A-Konzentration in der Probe ist dann wie folgt zu berechnen:

$$24,3 \text{ ng/ml} \times 10.000 = 243000 \text{ ng/ml} = 0,243 \text{ g/l}$$

GRENZEN DER METHODE

1. Die niedrigste Konzentration des humanen Fetuin-A, die direkt messbar ist, beträgt 5,0 ng/ml (analytische Sensitivität des Assays). Rechnet man die 1/10.000fache Verdünnung der Patientenserumprobe zurück, liegt die niedrigste messbare Fetuin-A-Konzentration bei 50 µg/ml in der unverdünnten Serumprobe.
2. Da kein Goldstandard für die Messung des humanen Fetuin-A zur Verfügung steht, wurden die Werte der Assay-Standards durch die Verdünnung von hochgereinigtem rekombinantem Fetuin-A in einer Proteinmatrix erstellt.
3. Liegt ein erzielter Wert über 350 ng/ml, wird empfohlen, eine höher verdünnte Probe zu messen, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten.
4. Wenn kein Mikroplattenlesegerät zur Verfügung steht, das über 2,0 bei einer OD von 450 nm messen kann, dann ist es möglich, einen Assaylauf ohne die Standardkonzentration 6 aus dem Standard-Set durchzuführen.
5. Eine bakterielle oder fungöse Kontamination der Serumproben oder Reagenzien oder eine Kreuzkontamination der Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
6. Wasser, das mit Polyesterharzen entionisiert wurde, kann das Merrettichperoxidaseenzym inaktivieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Richtigkeit der Ergebnisse sicherzustellen, sollten bei jedem Testdurchlauf entsprechende Kontrollen mit bekannten Fetuin-A-Konzentrationen mitgeführt werden. Es wird empfohlen, zusätzlich zu den Kontrollen, die mit dem Assay-Kit mitgeliefert werden, laboreigene Fetuin-A-Kontrollen zu bestimmen.

LEISTUNGSMERKMALE

Sensitivität

Die Nachweisgrenze des ELISA zur Bestimmung des humanen Fetuin-A beträgt 5,0 ng/ml und wurde anhand der 95%-Vertrauensgrenze im Rahmen einer Nullstandard-Studie mit 20 Doppelmessungen festgelegt.

Linearität

Zwei Humanserumproben wurden mit Assay-Puffer verdünnt und getestet. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

#	Verdünnung	Gefunden ng/ml	Erwartet ng/ml	Wiederfindung %
1	1:10,000	21.9		
	1:20,000	11.9	11.0	108
	1:40,000	5.3	5.5	96
	1:80,000	2.9	2.7	107
	1:160,000	1.6	1.4	114
2	1:10,000	192		
	1:20,000	99.9	96	104
	1:40,000	45.2	48	94
	1:80,000	22.2	24	93
	1:160,000	13.4	12	112

Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde durch die Messung zweier Proben in einem einzigen Assay mit 20 Replikaten bestätigt.

Mittlerer Fetuin-A-Wert (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
33.6	5.5
121.1	4.8

Die Inter-Assay-Präzision wurde durch die Doppelbestimmung von zwei Proben in 12 Assay-Läufen bestätigt.

Mittlerer Fetuin-A-Wert (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
32.4	6.8
123.7	5.7

Wiederfindung

Zwei Patientenproben wurden unterschiedliche Mengen an humanem Fetuin-A zugegeben und anschließend getestet. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

#	Ursprünglicher Wert in ng/ml	Zugegebene Menge in ng/ml	Gefunden ng/ml	Erwartet ng/ml	Wiederfindung %
1	33.6	21	25.1	27.3	92
		63	44.4	48.3	92
		200	120.1	116.8	103
2	121.1	21	68.9	71.1	97
		63	88.6	92.1	96
		200	157.1	160.6	98

GEWÄHRLEISTUNG

Es wird gewährleistet, dass dieses Produkt die Leistungen, die auf der Etikettierung und in der Kit-Beilage beschrieben sind, erfüllt, wenn es vorschriftsmäßig gehandhabt wird. Epitope Diagnostics, Inc. LEHNT JEDE HAFTUNG FÜR EINE IMPLIZIERTE ZUSICHERUNG ALLGEMEINER GEBRAUCHSTAUGLICHKEIT ODER GEWÄHRLEISTUNG DER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK AB. Epitope Diagnostics ist in keinem Fall schadensersatzpflichtig. Es wird ausschließlich ein Ersatz für das Produkt oder eine Rückerstattung des Kaufpreises gewährt. Diese Gewährleistung gibt Ihnen spezielle juristische Rechte, die von Staat zu Staat unterschiedlich sein können.

LITERATURHINWEISE

- Schinke T, Amendt C, Trindl A, Poschke O, Muller-Esterl W, Jahnen-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/Fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271:20789-96.
- Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Muller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M. Cloning and targeted deletion of the mouse Fetuin gene. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272:31496-503.
- Mizuno M, Farach-Carson MC, Pinero GJ, Fujisawa R, Brunn JC, Seyer JM, Bousfield GR, Mark MP, Butler WT. Identification of the rat bone 60K acidic glycoprotein as alpha 2HS-glycoprotein. *Bone Miner.* 1991 Apr;13:1-21.
- Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, Fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem.* 2002 Feb 8;277:3926-34.
- Ketteler M, Vermeer C, Wanner C, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Floege J. Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix Gla protein and alpha-2-Heremans Schmid glycoprotein/Fetuin. *Blood Purif.* 2002;20:473-476.

- Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnen AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J. Association of low Fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 2003 Mar 8;361:827-833.
- Ketteler M, Wanner C, Metzger T, Bongartz P, Westenfeld R, Gladziwa U, Schurgers LJ, Vermeer C, Jahnen-Dechent W, Floege J. Deficiencies of calcium-regulatory proteins in dialysis patients: a novel concept of cardiovascular calcification in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2003 May;S84-87.
- Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Ralf Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Müller-Esterl W, Schinke T, Jahnen-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):357-66.

REFERENZEN

- Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2383-92.
- Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005 Aug;20(8):1676-85.
- Sato H, Kazama JJ, Wada Y, Kuroda T, Narita I, Gejyo F, Gao P, Yamashita H. Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A (AHSG) in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med.* 2007;46(20):1685-91. Epub 2007 Oct 15.
- Lehtinen AB, Burdon KP, Lewis JP, Langefeld CD, Ziegler JT, Rich SS, Register TC, Carr JJ, Freedman BI, Bowden DW. Association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):345-52. Epub 2006 Oct 24
- Lim P, Collet JP, Moutereau S, Guigui N, Mitchell-Heggs L, Loric S, Bernard M, Benhamed S, Montalescot G, Randé JL, Guéret P. Fetuin-A is an independent predictor of death after ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chem.* 2007 Oct;53(10):1835-40. Epub 2007 Aug 16
- Ix JH, Wassel CL, Kanaya AM, Vittinghoff E, Johnson KC, Koster A, Cauley JA, Harris TB, Cummings SR, Shlipak MG; Health ABC Study. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA.* 2008 Jul 9;300(2):182-8.
- Ix JH, Wassel CL, Bauer DC, Torioan D, Tylavsky FA, Cauley JA, Harris TB, Price PA, Cummings SR, Shlipak MG; for the Health ABC Study. Fetuin-A and Bone Mineral Density in Older Persons: The Health Aging and Body Composition (Health ABC) Study. *J Bone Miner Res.* 2008 Nov 18.
- Giulia Bivona, Chiara Bellia, Antonietta Caruso, Daniela Butera, Bruna Lo Sasso, Patrizia Altavilla, Rosa C. Carollo, Gaia Chiarello and Marcello Ciaccio. Low Serum Fetuin A Levels and Cardiovascular Events in End-Stage Renal Disease (ESRD) Patients. *Research Journal of Medical Sciences* 2 (4): 200-202, 2008
- Mario Cozzolino^a, Andrea Galassi^a, Maria Luisa Biondi^b, Olivia Turri^b, Sergio Papagni^c, Nicola Mongelli^c, Luigi Civita^c, Maurizio Gallieni^a, Diego Brancaccio^a Serum Fetuin-A Levels Link Inflammation and Cardiovascular Calcification in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* 2006;26:423-429
- G. Metry, P. Stenvinkel, A. R. Qureshi, J. J. Carrero, M. I. Yilmaz, P. Bárány, S. Snaedal, O. Heimbürger, B. Lindholm and M. E. Sulim^{an} Low serum fetuin-A concentration predicts poor outcome only in the presence of inflammation in prevalent haemodialysis patients. *European Journal of Clinical Investigation* 2008;38(11):804 - 811
- Doris Hendig, Veronika Schulz, Marius Arndt, Christiane Szliska, Knut Kleesiek, and Christian Go^o tting1. Role of Serum

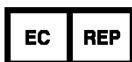
- Fetuin-A, a Major Inhibitor of Systemic Calcification, in Pseudoxanthoma Elasticum. Clin Chem 2006;52:227-234
12. G. Marhaug, V. Shah, R. Shroff, H. Varsani, L. R. Wedderburn, C. A. Pilkington and P. A. Brogan. Age-dependent inhibition of ectopic calcification: a possible role for fetuin-A and osteopontin in patients with juvenile dermatomyositis with calcinosis. Rheumatology 2008 47(7):1031-1037
13. Marcello Ciaccio, et al. Changes in serum fetuin-A and inflammatory markers levels in end-stage renal disease (ESRD): effect of a single session haemodialysis. Clin Chem Lab Med 2008;46:212-214
14. J. J. Carrero, P. Stenvinkel, B. Fellström, A. R. Qureshi, K. Lamb, O. Heimbürger, P. Bárány, K. Radhakrishnan, B. Lindholm, I. Soveri, L. Nordfors & P. G. Shiels. Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. Journal of Internal Medicine 2007; 263(3):302 – 312
15. C. Fiore, G. Celotta, G. Politi, L. Di Pino, Z. Castelli, R. Mangiafico, S. Signorelli, P. Pennisi. Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. Atherosclerosis 2007;195:110-115
16. Sandro Mazzaferro, Marzia Pasquali, Francesco Pugliese, Giusi Barresi, Iacopo Carbone, Marco Francone, Daniela Sardella, Franco Taggi. Serum Levels of Calcification Inhibition Proteins and Coronary Artery Calcium Score: Comparison between Transplantation and Dialysis. Am J Nephrol 2007;27:75-83.

TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

For technical assistance or place an order, please contact Epitope Diagnostics, Inc. at (858) 693-7877 or fax to (858) 693-7678. www.epitopediagnostics.com



This product is developed and manufactured by
Epitope Diagnostics, Inc.
 San Diego, CA 92126, USA



MDSS
 Burckhardtstrasse 1
 30163 Hannover, Germany

Manufacturer	No. of tests
Catalog Number	Keep away from heat and direct sun light
Concentrate	Store at
In Vitro Diagnostic Device	Use by
Read instructions before use	Lot No.
Authorized Representative In Europe	