

S100A8/S100A9 ELISA

**Zur Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin,
MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin,
Gewebeextrakt, Zellkulturüberstand**

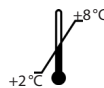
**Für tierexperimentelle Studien (Maus, Ratte;
nicht für humanes Probenmaterial geeignet)**

**For the determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin,
MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine,
tissue extract, cell culture supernatant**

**For animal experimental studies (mouse, rat;
not suitable for human samples)**

Gültig ab / Valid from 2022-01-04

REF KR6936



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin, Gewebeextrakt und Zellkulturüberstand geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen:

- Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10
- Calgranulin B: MRP14, S100A9
- Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist ein calciumbindendes Protein, das von Neutrophilen und Monozyten gebildet wird. Fäkales S100A8/S100A9 ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher und neoplastischer Genese.

Die Unterscheidung zwischen Patienten mit Reizdarm und solchen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) fällt häufig schwer. Dies führt zu vielen nicht notwendigen Koloskopien. Mittels des S100A8/S100A9-Tests können diese beiden Patientengruppen jetzt deutlich voneinander unterschieden werden. Der Nachweis aus dem Stuhl korreliert sehr gut mit den histologischen und endoskopischen Befunden der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sowie mit dem bisherigen Gold-Standard für die Aktivitätsbeurteilung bei CED, der Messung der fäkalen Exkretion 111-Indium-markierter neutrophiler Granulozyten. Der Indium-111-Granulozytentest ist jedoch kostenintensiv (Krankenhausaufenthalt, Isotopenbestimmung und Entsorgung) und durch die Radioaktivität belastend für die Patienten. Eine wiederholte Anwendung bei Kindern und Schwangeren ist daher nicht empfehlenswert.

Im Gegensatz zu den bisherigen Standardmarkern für entzündliche Vorgänge (CRP, ESR, HB) zeigen erhöhte S100A8/S100A9-Werte mit größerer Sicherheit ein Rezidiv an. S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist damit ein idealer Verlaufsmarker, z. B. bei Morbus Crohn oder nach Polypenabtragung. Vergleichende Messungen von S100A8/S100A9 und okkultem Blut zum Nachweis des Kolonkarzinoms ergaben einen eindeutigen diagnostischen Vorteil für S100A8/S100A9. Der Parameter hat eine hohe negative prädiktive Aussagekraft: Ist der S100A8/S100A9-Spiegel im Stuhl niedrig, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung des Intestinaltrakts vor.

Indikationen

- Entzündungsmarker für akute entzündliche Erkrankungen
- Bewertung des Schweregrads einer Entzündung

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR6936	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
KR6936	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat, 2,5x	90 ml
KR6936	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (monoklonaler anti-S100A8/ S100A9), lyophilisiert	250 µl
KR6936	STD	S100A8/S100A9-Standards, lyophilisiert (0; 0,25; 0,98; 3,9; 15,6 ng/ml)	2 x 5 vials
KR6936	CTRL	Kontrollen, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 2 vials
KR6936	CONJ	Konjugatkonzentrat (anti-Maus, peroxidase markiert)	200 µl
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es han-

delt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2 \text{M}\Omega \text{cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner $100 \mu\text{l}$** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das bei **2–8°C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat EXBUF** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (90 ml EXBUF + 135 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das bei **2–8°C** gelagerte **EXBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes EXBUF) ist **3 Monate bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **$500 \mu\text{l}$ Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8°C gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **lyophilisierte Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** ist, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Das AB wird mit **$250 \mu\text{l}$ Waschpuffer** rekon-

stituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Es wird zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Das **Detektionsantikörperkonzentrat** (rekonstituiertes AB) ist bei **-20°C 4 Wochen** lang stabil. Das Detektionsantikörperkonzentrat wird **1:101 in Waschpuffer** weiter verdünnt (100 µl Detektionsantikörperkonzentrat + 10 ml Waschpuffer). **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes Detektionsantikörperkonzentrat) **kann nicht aufbewahrt werden**.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **CONJ** ist, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Kotproben

Jede Probe wird 1:50 in Extraktionspuffer extrahiert (z. B. 100 mg Kot + 5 ml Extraktionspuffer) und anschließend bei 3000 g für 10 min zentrifugiert.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

EDTA-Plasma/Serumproben

Die Proben werden vor dem Einsatz im Test **1:100 mit Waschpuffer** verdünnt.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urinproben

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:3 mit Waschpuffer** verdünnt werden.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Zellkulturüberstand

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:2 mit Waschpuffer** verdünnt werden. Das Medium wird als Leerwert mitbestimmt.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die S100A8/S100A9 erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf S100A8/S100A9 zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit hochaffinen anti-S100A8/S100A9 Antikörpern beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das S100A8/S100A9 aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Im nächsten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper, ein monoklonaler anti-S100A8/S100A9 Antikörper, an das S100A8/S100A9 gebunden. Dann wird das Konjugat (Anti-Maus, Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

Fängerantikörper – S100A8/S100A9 – Detektions-Antikörper – Peroxidase Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem S100A8/S100A9-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
----	--

2.	100 µl Standards/Kontrollen/vorbereitete Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Detektionsantikörper (verdünnten AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm und 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Kotproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

EDTA-Plasma- und Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 3** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Zellkulturüberstände

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 2** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die Testergebnisse stellen nur Relativwerte dar, da keine Daten über die Kreuzreaktivität vorliegen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 3 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,076 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur wissenschaftlichen Forschung verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.
Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.













14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Hildebrand, F. et al., 2013. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology*, **14**(1), p.R4.
2. Nelson, D. a et al., 2012. An expanded myeloid derived suppressor cell population does not play a role in gammaherpesvirus-exacerbated breast cancer metastases. *Infectious agents and cancer*, **7**(1), p.22.
3. Prinzen, C. et al., 2009. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC genomics*, **10**, p.66.
4. Soro-Paavonen, A. et al., 2008. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*, **57**(9), pp.2461–2469.
5. Volz, H.C. et al., 2012. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. *Basic research in cardiology*, **107**(2), p.250.
6. Wiechert, L. et al., 2012. Hepatocyte-specific S100a8 and S100a9 transgene expression in mice causes Cxcl1 induction and systemic neutrophil enrichment. *Cell communication and signaling : CCS*, **10**(1), p.40.
7. Yamamoto, Y. et al., 2011. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), **186**(5), pp.3248–57.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

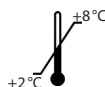
S100A8/S100A9 ELISA

*For the determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin,
MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine,
tissue extract, cell culture supernatant*

*For animal experimental studies (mouse, rat;
not suitable for human samples)*

Valid from 2022-01-04

REF KR6936



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. PREPARATION OF SAMPLES	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Analytical sensitivity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP (8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract and cell culture supernatant. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Alternative names:

- Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10
- Calgranulin B: MRP14, S100A9,
- Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP (8/14) is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. Fecal S100A8/S100A9 is a marker for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases.

It is often difficult to distinguish between irritable bowel syndrome and chronic inflammatory bowel disease. This leads in many cases to extensive and unnecessary colonoscopic examinations. The S100A8/S100A9 test allows clear differentiation between the two patient groups. Fecal S100A8/S100A9 levels correlate significantly with histological and endoscopic assessment of disease activity in Morbus Crohn's disease and ulcerative colitis as well as with the fecal excretion of indium-111-labelled neutrophilic granulocytes that has been suggested as the "gold standard" of disease activity in inflammatory bowel disease. However, measuring 111-indium-labelled granulocytes is very costly (patient's hospitalisation, analysis and disposal of isotopic material) and is connected with radioactive exposition of the patients. For this reason, a repeated application to children and pregnant women is not recommended.

Elevated levels of S100A8/S100A9 are a much better predictor of relapse than standard inflammatory markers (CRP, ESR HB). Comparing this marker with standard fecal occult blood screening in colorectal cancer demonstrates clearly the diagnostic advantages of the fecal S100A8/S100A9 test. The parameter is of a high diagnostic value: If the S100A8/S100A9 level in stool is low, there is a high probability that an organic disease does not exist.

Indications

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR6936	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
KR6936	EXBUF	Extraction buffer concentrate, 2.5x	90 ml
KR6936	AB	Detection antibody concentrate, (monoclonal anti-S100A8/S100A9 antibody), lyophilised	250 µl
KR6936	STD	S100A8/S100A9 standards, lyophilised (0; 0.25; 0.98; 3.9; 15.6 ng/ml)	2 x 5 vials
KR6936	CTRL	Controls, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
KR6936	CONJ	Conjugate concentrate (anti-mouse, peroxidase labelled),	200 µl
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37°C incubator
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate (EXBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (90 ml EXBUF + 135 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37°C in a water bath. The **EXBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. **Extraction buffer** (1:2.5 diluted EXBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 3 months**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 4 weeks**.
- **Preparation of the detection antibody:** The **lyophilised detection antibody concentrate (AB)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. Before use, the AB has to be reconstituted with **250 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. The **detection antibody concentrate** (reconstituted AB) can be stored at **-20°C for 4 weeks**. The detection antibody concentrate is further diluted **1:101** in wash buffer (100 µl detection antibody concentrate + 10 ml wash buffer). **The detection antibody** (1:101 diluted detection antibody concentrate) **is not stable and cannot be stored**.

- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The **CONJ** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. PREPARATION OF SAMPLES

Feaces

Each sample must be extracted **1:50** in extraction buffer (e.g. 100 mg feaces + 5 ml extraction buffer), and then centrifuged for 10 minutes at 3000 *g*.

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant per well.

EDTA-Plasma/Serum

Samples should be diluted **1:100** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Urine

Samples should be diluted at least **1:3** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Cell culture supernatants

Samples should be diluted at least **1:2** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilises the two-site sandwich technique with two selected antibodies that bind to S100A8/S100A9.

Standards, controls and diluted samples which are assayed for S100A8/S100A9 are added to the microtiter wells coated with high affinity anti-S100A8/S100A9 antibodies. During the first incubation step, S100A8/S100A9 in the samples is bound by the immobilised antibodies. In a next incubation step, a monoclonal anti-S100A8/

S100A9 antibody is added to each microtiter well. Then a peroxidase labelled anti-mouse conjugate is pipetted into each well and the following complex is formed: capture antibodies – S100A8/S100A9 – detection antibody – peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the S100A8/S100A9 concentration of the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. S100A8/S100A9 present in the samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/prepared samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker.*
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker.*
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

8.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker.*
10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The incubation steps mentioned above at 550 rpm with an orbit of 2 mm and 37 °C are recommended by the manufacturer. If there is no possibility to shake at 37 °C, we recommend incubation at 37 °C without shaking.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Feeces

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 50** to get the actual concentrations.

EDTA-Plasma/Serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 100** to get the actual concentrations.

Urine

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 3** to get the actual concentrations.

Cell culture supernatants

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 2** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

The test results represent only relative values, as there are no data on the cross reactivity.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × *sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × *sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 3 SD$ and estimated to be 0.076 ng/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE













- The guidelines for laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Hildebrand, F. et al., 2013. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology*, **14**(1), p.R4.
2. Nelson, D. a et al., 2012. An expanded myeloid derived suppressor cell population does not play a role in gammaherpesvirus-exacerbated breast cancer metastases. *Infectious agents and cancer*, **7**(1), p.22.

3. Prinzen, C. et al., 2009. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC genomics*, **10**, p.66.
4. Soro-Paavonen, A. et al., 2008. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*, **57**(9), pp.2461–2469.
5. Volz, H.C. et al., 2012. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. *Basic research in cardiology*, **107**(2), p.250.
6. Wiechert, L. et al., 2012. Hepatocyte-specific S100a8 and S100a9 transgene expression in mice causes Cxcl1 induction and systemic neutrophil enrichment. *Cell communication and signaling : CCS*, **10**(1), p.40.
7. Yamamoto, Y. et al., 2011. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), **186**(5), pp.3248–57.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant