

IDK[®] S100A12 ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von S100A12 in Stuhl

For the in vitro determination of S100A12 in stool

Gültig ab / Valid from 2022-01-04

REF K 6938

Σ
96

+8°C
+2°C

IVD **CE**



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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Stuhlprobenlagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Verdünnung des Stuhlextrakts</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene *IDK*®-Assay ist für die Bestimmung von S100A12 in Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen: Calgranulin C, EN-RAGE

Die Mitglieder der S100-Proteinfamilie sind niedermolekulare saure Proteine, die durch zelltypspezifische Expression sowie zwei Kalziumbindungs-motive (EF-Hände) charakterisiert sind. S100-Proteine bzw. Calgranuline werden von aktivierten Granulozyten im entzündeten Gewebe freigesetzt. Ferner wird eine erhöhte Expression auf infiltrierenden Monozyten und Granulozyten bei chronischen Entzündungen beobachtet. Hofmann et al. (1999) identifizierten RAGE (RAGE = *Receptor for Advanced Glycation End products*) als Hauptrezeptor für S100A12 und die Mitglieder der S100/Calgranulin-Superfamilie und gaben S100A12 den Namen EN-RAGE (*Extracellular Newly identified RAGE-binding protein*). Interaktion von S100A12 mit zellulärem RAGE auf Endothelzellen, mononuklearen Phagozyten und Lymphozyten führt zu Zellaktivierung und Freisetzung von proinflammatorischen Schlüsselmediatoren. Die Inhibition von S100A12 in Mausmodellen führt zur Minderung der verzögerten Hypersensitivität und der entzündlichen Colitis durch Blockade der Signaltransduktionsaktivierung bzw. der Expression von entzündlichen Mediatoren.

Kaiser et al. (2007) ermittelten die S100A12-Konzentration im Stuhl von 171 Patienten mit verschiedenen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Reizdarmsyndrom und Magen-Darm-Infekten, sowie von 24 gesunden Teilnehmern. Patienten, die an einer chronischen Entzündung des Darms erkrankt waren, wiesen deutlich mehr S100A12 auf als diejenigen, die unter einem Reizdarmsyndrom litten oder gesund waren. Der S100A12-Gehalt im Stuhl korrelierte mit dem Ausmaß der intestinalen Entzündung.

Fäkales S100A12 ist ein neuer, nicht invasiver Marker, der die Darmentzündung vom Reizdarmsyndrom und gesundem Darm mit hoher Sensitivität und Spezifität unterscheiden kann. Die S100A12-Konzentration im Stuhl kann als Indikator für Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dienen. Da S100A12 von aktivierten Neutrophilen sezerniert wird und als proinflammatorischer Mediator wirkt, bietet es sich als Marker für Diagnose und Therapiekontrolle bei entzündlichen Darmerkrankungen an.

Indikationen

- Entzündungsmarker für akute entzündliche Erkrankungen
- Bewertung des Schweregrads einer Entzündung
- Verlaufparameter bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6938	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6938	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat, 2,5x	1 x 100 ml
K 6938	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6938	STD	S100A12-Standards, lyophilisiert (0; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml)	4 x 6 vials
K 6938	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6938	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6938	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, Konzentrat, 100x	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- 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 (100ml 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 **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt 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 (100ml EXBUF + 150 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 **EXBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt 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** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert 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** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **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 Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Stuhlprobenlagerung

Der Rohstuhl kann bis zu 7 Tage bei 4 °C gelagert werden^[6]. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes EXBUF) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes EXBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.

- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls im Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I 1:50

Verdünnung des Stuhlextrakts

Der Überstand (Verdünnung I) wird **1:20** mit **Probenverdünnungspuffer** (SAMPLE-BUF) verdünnt. Zum Beispiel:

50 µl Verdünnung I + **950 µl** SAMPLEBUF = **1:20 (Verdünnung II)**

Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:1000**

100 µl der Verdünnung II werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Wir empfehlen die extrahierten Proben (Verdünnung I) nicht länger als 24 Stunden bei 2–8 °C zu lagern. Die **extrahierten Proben können nicht eingefroren** gelagert werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von S100A12. Die Mikrotiterplatte ist mit einem hochspezifischen monoklonalen anti-humanen-S100A12-Antikörper beschichtet. Teststandards, Kontrollen und Proben, die auf S100A12 zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert, wobei das S100A12 von dem immobilisierten Antikörper gebunden wird. Nach Auswaschen aller nicht gebundenen Substanzen wird peroxidasemarkiertes Konjugat, (polyklonale anti-S100A12-Antikörper) in die Vertiefungen pipettiert. Nach dem zweiten Waschschrift zur Entfernung des ungebundenen Konjugats wird das Peroxidasesub-

strat Tetramethylbenzidin pipettiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Die entstandene gelbe Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem S100A12-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.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

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.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
2.	Je 100 µl Standards/Kontrollen/Proben in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

8.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
11.	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.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu 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.

Stuhlproben

Der ermittelte S100A12-Spiegel der Stuhlproben wird mit dem Verdünnungsfaktor **1000** multipliziert.

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

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 können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{analytische Sensitivität} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 16)

Probe	S100A12 [ng/ml]	VK [%]
1	3718,4	7,1
2	918,3	3,5

Inter-Assay (n = 22)

Probe	S100A12 [ng/ml]	VK [%]
1	3003,64	15,4
2	1363,49	20,2

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen S100A12-Standardmengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Spike [ng/ml]	S100A12 erwartet [ng/ml]	S100A12 gemessen [ng/ml]
A	0,56	0,892	0,803
	0,28	0,602	0,56
B	1,125	1,642	1,701
	0,56	1,077	0,98

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im IDK® S100A12-ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	S100A12 erwartet [ng/ml]	S100A12 gemessen [ng/ml]
A	1:2500	8797,3	8797,3
	1:5000	4399	4239,8
	1:10 000	2199,5	1986
B	1:2500	2016,1	2016,1
	1:5000	1008	932,2
	1:10 000	504	362

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 10-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,016 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik 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













- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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. Hofmann MA, Drury S; Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach, D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**: 889-901, 1999
2. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, Zolg W. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;**6**(10):1122-8.
3. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008 Oct;**216**(2):183-92.

4. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;**14**(3):359-66.
5. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J, Foell D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;**56**:1706-1713
6. de Jong Naomi SH, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: A Novel Noninvasive Marker in Children with Crohn`s Disease. *Inflamm Bowel Dis*. July 2006;**12**(7):566–572

Verwendete Symbole:

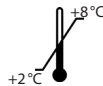
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDK[®] S100A12 ELISA

For the in vitro determination of S100A12 in stool

Valid from 2022-01-04

REF K 6938



IVD **CE**



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	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
<i>Storage of stool samples</i>	20
<i>Extraction of the stool samples</i>	20
<i>Dilution of stool extract</i>	21
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking Recovery</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

This IDK® assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of S100A12 in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Alternative names: Calgranulin C, EN-RAGE

Members of the S100 protein family are low molecular mass acidic proteins characterised by cell-type-specific expression and the presence of 2 EF-hand calcium-binding domains. The S100 proteins or calgranulins are expressed in activated granulocytes under conditions of chronic inflammation. Hofmann et al. (1999) reported that RAGE is a central cell surface receptor for S100A12, which they referred to as EN-RAGE (Extracellular Newly identified RAGE-binding protein), and related members of the S100/calgranulin super family. Interaction of S100A12 with cellular RAGE on endothelium, mononuclear phagocytes, and lymphocytes triggered cellular activation, with generation of key pro-inflammatory mediators. In murine models, blockade of S100A12 quenched delayed-type hypersensitivity and inflammatory colitis by arresting activation of central signaling pathways and expression of inflammatory mediators.

Kaiser et al. (2007) determined the S100A12 concentration in stool samples of 171 patients suffering from infectious gastroenteritis, Crohn's disease, ulcerative colitis or irritable bowel syndrome and 24 healthy controls. Faecal S100A12 correlated with the degree of intestinal inflammation. Patients with inflammatory bowel disease had significantly higher S100A12 levels compared to these with irritable bowel syndrome or healthy controls. The S100A12 content in stool correlated with the degree of intestinal inflammation.

Faecal S100A12 is a novel non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS) or healthy individuals with a high sensitivity and specificity. S100A12 stool concentrations can be used as an indicator of inflammation activity in Morbus Crohn's disease and Colitis ulcerosa. Since S100A12 is secreted by activated neutrophils and acts as a pro-inflammatory mediator, it can be used as marker for diagnosis and therapeutic control of inflammatory bowel diseases.

Indications

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree
- Parameter for monitoring Morbus Crohn's disease and Colitis ulcerosa

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6938	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6938	EXBUF	Extraction buffer concentrate, 2.5x	1 x 100 ml
K 6938	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6938	STD	S100A12 standards, lyophilised (0; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml)	4 x 6 vials
K 6938	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6938	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6938	CONJ	Conjugate, peroxidase-labelled, concentrate, 100x	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	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*
- Stool sample application system such as cat. no.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- 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** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **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 (100 ml EXBUF + 150 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37°C in a water bath. The **EXBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted EXBUF) can be stored in a closed flask **for 3 months at 2–8°C**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are 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** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Storage of stool samples

Raw stool can be stored up to 7 days at 4 °C^[6] or for longer storage at -20 °C.

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted *EXBUF*) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml sample extraction buffer:

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 0.75 ml

Dilution Factor: 1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with 0.75 ml **sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *EXBUF*) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.

- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:50

Dilution of stool extract

The supernatant of the extraction (dilution I) is diluted **1:20** with **sample dilution buffer** (SAMPLEBUF). For example:

50 µl dilution I + **950 µl** SAMPLEBUF = 1:50 (dilution II)

This results in a final dilution of **1:1000**.

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

We recommend to store the extracted samples (dilution I) for no longer than **24 h at 2–8 °C**. The **extracted samples are not stable and cannot be frozen** and stored for later use.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of S100A12. A monoclonal antibody specific for S100A12 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and the immobilised antibody binds any S100A12 present. After washing away any unbound substances, an HRP-conjugated polyclonal antibody specific for S100A12 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody HRP-conjugate, the remaining conjugate is allowed to react with the HRP substrate tetramethylbenzidine. The reaction is stopped by addition of acidic solution and absorbance of the resulting yellow product is measured at 450 nm. The absorbance is proportional to the concentration of S100A12. 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. S100A12, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

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 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 each well 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal mixer* .
4.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (CONJ) in each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal mixer* .
7.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl TMB substrate (SUB) in each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl ELISA stop solution (STOP) and mix well.
11.	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.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** 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.

Stool samples

The obtained S100A12 levels of stool samples have to be multiplied by the dilution factor of **1000**.

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

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 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

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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 patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 16)

Sample	S100A12 [ng/ml]	CV [%]
1	3718.4	7.1
2	918.3	3.5

Inter-Assay (n = 22)

Sample	S100A12 [ng/ml]	CV [%]
1	3003.64	15.4
2	1363.49	20.2

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different S100A12 concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Spike [ng/ml]	S100A12 expected [ng/ml]	S100A12 measured [ng/ml]
A	0.56	0.892	0.803
	0.28	0.602	0.56
B	1.125	1.642	1.701
	0.56	1.077	0.98

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	S100A12 expected [ng/ml]	S100A12 measured [ng/ml]
A	1:2500	8797.3	8797.3
	1:5000	4399	4239.8
	1:10 000	2199.5	1986
B	1:2500	2016.1	2016.1
	1:5000	1008	932.2
	1:10 000	504	362

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 10 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 SD$ and estimated to be 0.016 ng/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic 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

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach, D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**: 889-901, 1999
2. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, Zolg W. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;**6**(10):1122-8.
3. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008 Oct;**216**(2):183-92.
4. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;**14**(3):359-66.
5. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J, Foell D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;**56**:1706-1713
6. de Jong Naomi SH, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: A Novel Noninvasive Marker in Children with Crohn`s Disease. *Inflamm Bowel Dis*. July 2006;**12**(7):566-572.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant