

# IDK<sup>®</sup> S100A12 ELISA


*Zur in vitro Bestimmung von S100A12 in Serum*

*For the in vitro determination of S100A12 in serum*

Gültig ab / Valid from 2022-01-04

**REF** K 6939

$\Sigma$   
96

+2°C  +8°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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene IDK®-Assay ist für die Bestimmung von S100A12 in Serum 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.

Da S100A12 von aktivierten neutrophilen Granulozyten sezerniert wird und als proinflammatorischer Mediator wirkt, bietet es sich als Marker für Diagnose und Therapiekontrolle bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen an (siehe Review von Meijer et al., 2012).

### Indikationen

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

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6939	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6939	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6939	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml)	4 x 6 vials
K 6939	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6939	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6939	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, Konzentrat, 100 x	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\*
- 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 handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ 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 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert 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 **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.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für STD und CTRL 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 unmittelbar 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

### *Probenlagerung*

S100A12 ist in unverdünntem Serum für 9 Monate bei -20 °C sowie für 7 Tage bei 2–8 °C und Raumtemperatur stabil.

### *Probenverdünnung*

Die Probe wird **1:40** mit **Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt. Zum Beispiel:

**20 µl Serum + 780 µl SAMPLEBUF = 1:40**

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

## 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 Peroxidasesubstrat 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 <b>5x</b> mit je <b>250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
2.	Je <b>100 µl Standards/Kontrollen/Proben</b> in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln*</b> inkubieren.

4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15–30°C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	<b>10–20 min** bei Raumtemperatur</b> (15–30°C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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.

## Serumproben

Der ermittelte S100A12-Spiegel der Proben wird mit dem Verdünnungsfaktor **40** multipliziert.

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

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, können stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

## 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.

### Referenzwerte

Serum (n = 63): 203 ng/ml (95 %-Quantile)

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 63) wurde ein Mittelwert von 101 ng/ml (Standardabweichung: 52 ng/ml) und ein Median von 89 ng/ml ermittelt. Als vorläufiger oberer Referenzwert wird die 95 %-Quantile (203 ng/ml) angegeben.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.



## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 80

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	215,46	5,8
2	421,53	5,0

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 21

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	261,38	11,4
2	1012,62	8,0

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serumproben wurden mit bekannten S100A12-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1,25	26,21	29,10	27,46	106,0
	13,10	14,68	14,35	102,3
	6,55	7,73	7,80	99,0
	3,28	5,01	4,53	110,7
	1,64	3,00	2,89	103,8

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Wiederfindung [%]
2,51	26,21	25,56	28,72	89,0
	13,10	13,74	15,61	88,0
	6,55	8,91	9,06	98,3
	3,28	5,79	5,79	100,1
	1,64	4,92	4,15	118,7

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung zweier Serumproben nachgewiesen.

Für S100A12 in Serum wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 24,88–3,22 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag für Konzentrationen oberhalb des LoQ bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:40	24,88	24,88	100,0
	1:50	19,90	19,00	95,5
	1:60	16,58	16,26	98,0
	1:70	14,21	13,78	97,0
	1:80	12,44	12,70	102,1
	1:160	6,22	5,82	93,7
B	1:40	13,89	13,89	100,0
	1:60	9,26	8,48	91,6
	1:80	6,94	6,31	90,8
	1:100	5,56	4,86	87,5
	1:120	4,63	3,78	81,6
	1:140	3,97	3,64	91,6
	1:160	3,47	3,22	92,8

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve/Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert ( <i>limit of blank</i> , LoB)	0,157 ng/ml
Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> , LoD)	0,400 ng/ml
Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,605 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

## 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. Meijer, B., Gearry, R.B. & Day, A.S., 2012. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *International journal of inflammation*, **2012**, p.907078.

### Verwendete Symbole:

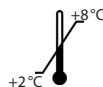
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

# **IDK<sup>®</sup> S100A12 ELISA**

***For the in vitro determination of S100A12 in serum***

Valid from 2022-01-04

**REF** **K 6939**



**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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>17</b>
<i>Sample storage</i>	17
<i>Sample dilution</i>	17
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
<b>8. RESULTS</b>	<b>19</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
<i>Reference range</i>	20
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>20</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	20
<i>Accuracy – Trueness</i>	21
<i>Linearity</i>	21
<i>Analytical sensitivity</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>23</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>24</b>

## 1. INTENDED USE

This IDK® assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of S100A12 in serum. 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.

Since S100A12 is secreted by activated neutrophilic granulocytes and acts as a pro-inflammatory mediator, it can be used as marker for diagnosis and therapeutic control of various inflammatory diseases (see review by Meijer et al., 2012).

### Indications

- Marker for acute inflammation
- Estimation of inflammation degree

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6939	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6939	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6939	STD	S100A12 standards, lyophilised (0; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml)	4 x 6 vials
K 6939	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial



Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6939	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6939	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

- Ultra pure water\*
- 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. The crystals must be redissolved at room tem-

perature or in a water bath at 37°C before dilution of the concentrate. 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 **for 1 month 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 + 10ml 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

### *Sample storage*

S100A12 is stable in undiluted serum for 9 months at -20°C as well as for 7 days at 2–8°C and room temperature.

### *Sample dilution*

The sample is diluted **1:40** with **sample dilution buffer** (SAMPLEBUF). For example:

**20 µl** sample + **780 µl** SAMPLEBUF = 1:40

For analysis, pipet **100 µl** diluted sample per well.

## 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 ad-

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

10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) and mix well.
11.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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.

### Serum samples

The obtained S100A12 levels of samples have to be multiplied by the dilution factor of **40**.

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

## 9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard can be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

## 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.

### *Reference range*

Serum (n = 63): 203 ng/ml (95th percentile)

Based on an Immundiagnostik AG study of evidently healthy persons (n = 63), a mean value of 101 ng/ml (standard deviation: 52 ng/ml) and a median value of 89 ng/ml were estimated. The 95th percentile (203 ng/ml) should be considered as the preliminary upper reference value of the test.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 80**

The repeatability was assessed with 2 serum samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	215.46	5.8
2	421.53	5.0

### Reproducibility (Inter-Assay); n = 21

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	261.38	11.4
2	1012.62	8.0

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, S100A12-spikes with known concentrations were added to 2 different serum samples.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Recovery [%]
1.25	26.21	29.10	27.46	106.0
	13.10	14.68	14.35	102.3
	6.55	7.73	7.80	99.0
	3.28	5.01	4.53	110.7
	1.64	3.00	2.89	103.8
2.51	26.21	25.56	28.72	89.0
	13.10	13.74	15.61	88.0
	6.55	8.91	9.06	98.3
	3.28	5.79	5.79	100.1
	1.64	4.92	4.15	118.7

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 2 different serum samples.

For S100A12 in serum, the method has been demonstrated to be linear from 24.88–3.22 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Obtained [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:40	24.88	24.88	100.0
	1:50	19.00	19.90	95.5
	1:60	16.26	16.58	98.0
	1:70	13.78	14.21	97.0
	1:80	12.70	12.44	102.1
	1:160	5.82	6.22	93.7
B	1:40	13.89	13.89	100.0
	1:60	8.48	9.26	91.6
	1:80	6.31	6.94	90.8
	1:100	4.86	5.56	87.5
	1:120	3.78	4.63	81.6
	1:140	3.64	3.97	91.6
	1:160	3.22	3.47	92.8

### Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard/calibration curve without considering possibly used sample dilution factors

Limit of blank, LoB 0.157 ng/ml

Limit of detection, LoD 0.400 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 0.605 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

## 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 sent 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. Meijer, B., Geary, R.B. & Day, A.S., 2012. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *International journal of inflammation*, **2012**, p.907078.

### 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