



Gebrauchsanweisung

Calretinin ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Calretinin in Plasma und Serum




Art. Nr. EA611/96



12 x 8



2 – 8 °C











 **REF** CR00 Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany
Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany

Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • contact@dld-diagnostika.de • www.dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1	Klinische Bedeutung und Testprinzip.....	5
2	Vorsichtsmaßnahmen	6
3	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	6
4	Inhalt des Kits.....	7
5	Probengewinnung.....	8
6	Vorbereitung der Reagenzien.....	9
7	Testdurchführung.....	10
8	Auswertung und Beurteilung.....	12
9	Testcharakteristika	13
10	Änderungen	14
11	Literatur	15
	Pipettierschema - Probenverdünnung.....	16
	Pipettierschema - ELISA.....	16

Verwendete Symbole

	In-Vitro Diagnostikum		CE markiert
	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

1 Klinische Bedeutung und Testprinzip

Seit längerer Zeit ist in mehr als 55 Ländern der Welt die Produktion und Verwendung von Asbest verboten. Trotzdem ist die Zahl der asbestbedingten Krebserkrankungen – in erster Linie bösartige Lungentumoren und Mesotheliome – weiterhin sehr hoch.

Aufgrund der langen Latenzzeit sowie der fortlaufenden Produktion und Verwendung von Asbest in mehreren Ländern wird hier in den nächsten Jahren keine wesentliche Verbesserung erwartet. Durch eine Früherkennung der Tumoren – möglichst in klinisch symptomfreien Entwicklungsstadien – könnten die Chancen einer kurativen Therapie wesentlich gesteigert werden.

In Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr Universität Bochum (IPA) hat die DLD Diagnostika GmbH jetzt eine vielversprechende Methode für den Einsatz des Biomarkers Calretinin zur Früherkennung – speziell von Mesotheliomen – in Plasma- und Serumproben entwickelt. Calretinin ist einer der zurzeit besten verfügbaren Marker für den Nachweis von Mesotheliomen.

Der Calretinin ELISA ist ein Sandwich Enzymimmunoassay, bei dem gereinigte polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum zur Anwendung kommen. Während der Probeninkubation bindet Calretinin aus verdünnten Patientenproben an Calretinin-Antikörper (Fangantikörper), die auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten-Vertiefungen immobilisiert sind. Nach einem Waschschrift werden dem Test biotinylierte Calretinin-Antikörper (Detektionsantikörper) zugegeben. Diese binden an das zuvor gebundene Calretinin aus der Patientenprobe. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat zugegeben, das an den biotinylierten Detektionsantikörper spezifisch bindet. Nach einem letzten Waschschrift wird die gebundene Enzymmenge – und somit das Calretinin – über den Umsatz des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt.

Durch die Enzymreaktion entsteht zunächst ein blauer Farbstoff. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach gelb.

Die Extinktionen der Proben werden dann mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gemessen und mit Hilfe der im Test eingesetzten Standards und Kontrollen ausgewertet.

2 Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für in-vitro diagnostische Zwecke geeignet. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6. geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4 Inhalt des Kits

Mikrotiterstreifen **STRIPS** 12 Stück
Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Calretinin Antiserum

Standards (1 - 6) **CAL 1 - 6** 6 Flaschen
Lyophilisiert,
Inhalt einer Flasche mit 200 µl dest. Wasser lösen

Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	0,25	0,5	1	2	4

Kontrolle 1 & 2 **CON 1 & 2** 2 Flaschen
Lyoph., Inhalt einer Flasche mit 200 µl dest. Wasser lösen
Konzentrationen und Bereich: siehe QC-Zertifikat

Diluent **DILUENT** 1 Flasche
7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt

Antiserum **AS** 1 Flasche
6 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt, Kaninchen-anti-Calretinin

Enzymkonjugat **CONJ** 1 Flasche
0,15 ml; Konzentrat (200x), Streptavidin-Peroxidase

Enzymkonjugatpuffer **CONJ-BUFF** 1 Flasche
18 ml, gebrauchsfertig

Waschpuffer **WASH** 1 Flasche
20 ml, Konzentrat (50x), Inhalt mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen,
kurz mischen

Substrat **SUB** 1 Flasche
13 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig

Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Flasche
Vorbereitungsplatte Für die Verdünnung der Proben	PLATE	1 Stück
Folie gebrauchsfertig	FOIL	6 Stück
Verdünnungsfläschchen Zur Verdünnung des Enzymkonjugats (max 14 ml)	DILUTION-VIAL	3 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 15, 50, 60 und 100 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipipette
- Destilliertes Wasser
- Zentrifuge (2.500 g)
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler

5 Probengewinnung

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden. Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 24 Monate gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6 Vorbereitung der Reagenzien

6.1 Standards und Kontrollen

Inhalt jedes Fläschchens der Standards **CAL 1 – 6** und Kontrollen **CON 1 & 2** mit 200 µl dest. Wasser lösen, mindestens 30 Minuten auf dem Schüttler mischen anschließend vortexen, bis alles vollständig gelöst ist (Sichtkontrolle), übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Die aufgelösten Standards und Kontrollen müssen für den späteren Gebrauch bei –20 °C eingefroren werden und bleiben so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

6.2 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in 2 oder 3 Ansätze geteilt, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

6.3 Enzymkonjugat

Nicht vortexen!

Komplettes Fläschchen **CONJ** 5 Minuten bei 2.000 x g zentrifugieren. Benötigtes Volumen aus dem Überstand 200fach mit Enzymkonjugatpuffer **CONJ-BUFF** in einem Verdünnungsfläschchen **DILUTION-VIAL** verdünnen (max. 14 ml).

Z. B. für 6 Streifen 30 µl Enzymkonjugat **CONJ** mit 6 ml Enzymkonjugatpuffer **CONJ-BUFF** verdünnen.

Mindestens 30 Minuten auf einem Rollmischer oder Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Nicht vortexen.

Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

7 Testdurchführung

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die für die Verdünnung verwendeten Vertiefungen der Vorbereitungsplatte **PLATE** markieren (mit Edding) und nicht noch einmal verwenden!

7.1 Probenverdünnung

1. **15 µl Standard 1 – 6** **CAL 1 – 6**, **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2**, **Plasma und/oder Serum** in die entsprechenden Vertiefungen der Vorbereitungsplatte **PLATE** pipettieren.
2. **60 µl Diluent** **DILUENT** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
50 µl werden im ELISA eingesetzt.

7.2 Durchführung ELISA

1. **50 µl verdünnte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
4. **50 µl Antiserum** **AS** in jede Vertiefung pipettieren.
5. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl verdünntes Enzymkonjugat** (s. 6.3) in jede Vertiefung pipettieren.
8. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
10. **100 µl Substrat** **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
11. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
12. **100 µl Stopplösung** **STOP** in jede Vertiefung pipettieren, kurz mischen. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

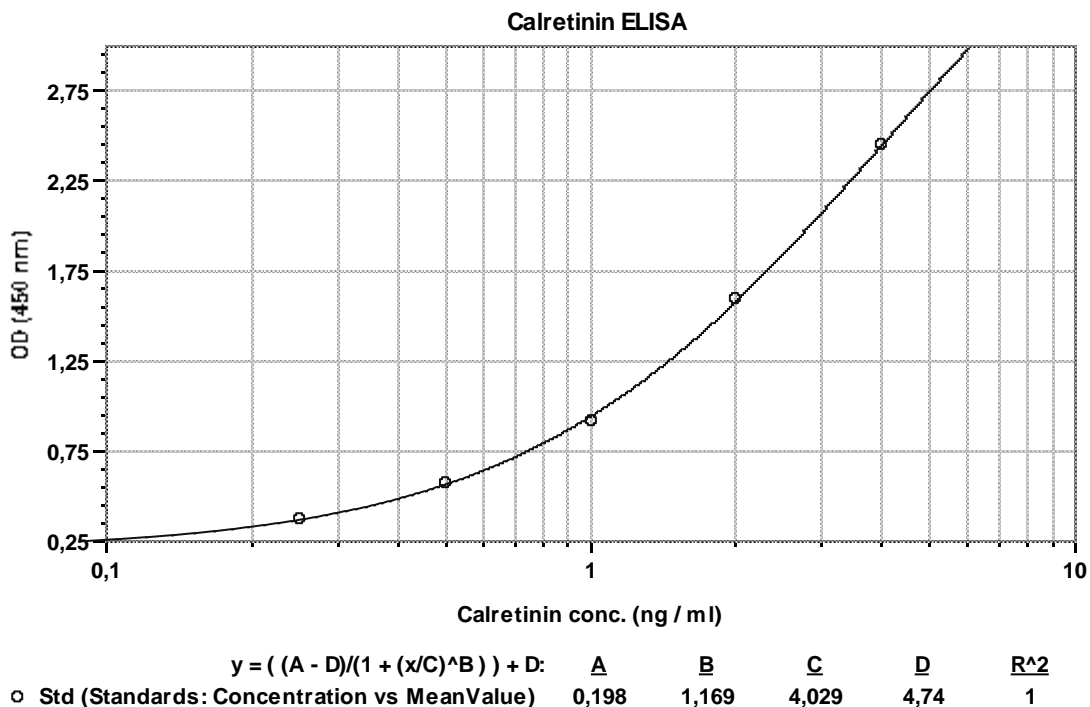
8 Auswertung und Beurteilung

Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können anhand ihrer ODs direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

9 Testcharakteristika

9.1 Referenzbereich

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt.

Matrix	Referenzbereich Männer	Referenzbereich Frauen
EDTA-Plasma, Serum	< 0,6 ng / ml	< 0,8 ng/ml

9.2 Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
0,05 ng / ml	$OD_{Cal1} + 2 \times SD$

9.3 Wiederfindung nach Spiken

Bereich (ng / ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
0,37 – 2,96	93	90 - 98

9.4 Linearität

Bereich (ng / ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
0,47 – 3,03	1 : 7 mit Wasser	102	108 - 95

9.5 Reproduzierbarkeit

Intra-Varianz	Bereich (ng / ml)	Intra-Assay-Vk
	0,64 – 2,00	8,1 – 6,6 %

Inter-Varianz	Bereich (ng / ml)	Inter-Assay-Vk
	0,57 – 1,54	10,4 – 10,0 %

9.6 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

9.7 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des Calretinin ELISAs ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dest. Wasser (s. 9.4 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.8 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10 Änderungen

Cal-d_16: Änderung grau hinterlegt.

Cal-d_15: Abschnitt 5: Die Lagerdauer und –temperatur der Proben wurde geändert (grau hinterlegt)

Cal-d_14: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert. Abschnitte 6 und 7 und Pipettierschemata wurden um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

Cal-d_13: Beim Enzymkonjugat und Enzymkonjugatpuffer wurden die Gefahrstoffzeichen entfernt, es hat sich jedoch nichts an der Zusammensetzung geändert. Abschnitt 6 Waschpuffer: Die Herstellung wird detaillierter beschrieben und die Lagerung des angesetzten Waschpuffers bei -20 °C wurde entfernt. Abschnitt 6. Enzymkonjugat: die Angabe der Zentrifugalkraft wurde von 4000 x g auf 2000 x g reduziert. Abschnitt 7.2 Punkt 10 und das Pipettierschema wurden um das 10-sekündige Schütteln ergänzt.

11 Literatur

- Johnen G, Burek K, Raiko I, Wichert K, Pesch B, Weber DG, Lehnert M, Casjens S, Hagemeyer O, Taeger D, Brüning T, MoMar Study Group.
Prediagnostic detection of mesothelioma by circulating calretinin and mesothelin – a case-control comparison nested into a prospective cohort of asbestos-exposed workers.
Scientific Reports 2018; 8: 14321
- Johnen G., Gawrych K., Raiko I., Casjens S., Pesch B., Weber D. G., Taeger D., Lehnert M., Kollmeier J., Bauer T., Musk A. W., Robinson B. W. S., Brüning T., Creaney J.
Calretinin as a blood-based biomarker for mesothelioma.
BMC Cancer 2017; 17: 386
- Casjens S, Weber DG, Johnen G, et al.
Assessment of potential predictors of calretinin and mesothelin to improve the diagnostic performance to detect malignant mesothelioma: results from a population based cohort study.
BMJ Open 2017;7:e017104.doi:10.1136/bmjopen-2017-017104
- Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Gillissen A, Kollmeier J, Scherpereel A, Brüning T, Johnen G.
Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients.
BMC Cancer 2010; 10: 242
- Johnen G, Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Kollmeier J, Gillissen A, Scherpereel A, Müller KM, Brüning T.
Calretinin – ein vielversprechender Biomarker für die Bestimmung von Mesotheliomen in Blutproben von Asbest-Exponierten.
IPA-Journal 2011; 02: 22-25
- Marschall V.
Asbest wird uns noch lange begleiten – Projekt MoMar untersucht über 2.000 Versicherte mit anerkannter BK 4103.
IPA-Journal 2013; 03: 24-26
- Pesch B, Brüning T, Johnen G, Casjens S, Bonberg N, Taeger D, Müller A, Weber DG, Behrens T.
Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer.
Biochim Biophys Acta 2014; 1844: 874-883

Pipettierschema - Probenverdünnung

		Standards	Kontrollen	Proben
PLATE:				
CAL 1 - 6	µl	15		
CON 1 & 2	µl		15	
Probe	µl			15
DILUENT	µl	60	60	60

Platte mit FOIL abkleben und 60 Minuten schütteln
50 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema - ELISA

		Verdünnte Standards	Verdünnte Kontrollen	Verdünnte Proben
STRIPS:				
Übertragung von PLATE in STRIPS:	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben und 2 Stunden bei RT schütteln
 4 x Waschen (300 µl WASH pro Vertiefung)

AS	µl	50	50	50
----	----	----	----	----

Platte mit Folie abkleben und 60 Minuten bei RT schütteln
 4 x Waschen (300 µl WASH pro Vertiefung)

Verd. CONJ	µl	100	100	100
------------	----	-----	-----	-----

Platte mit FOIL abkleben und 60 Minuten bei RT schütteln
 4 x Waschen (300 µl WASH pro Vertiefung)

SUB	µl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei RT schütteln

STOP	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln
 Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref. 570 – 650 nm)