



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	Einführung und Testprinzip	4
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
3	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	6
4	Inhalt des Testkits	7
5	Probengewinnung und -lagerung	8
6	Vorbereitung der Reagenzien.....	9
7	Testdurchführung.....	10
8	Auswertung und Beurteilung.....	12
9	Testcharakteristika	13
10	Literatur	14
11	Änderungen	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

Die Symbole der Komponenten des Kits sind im Kapitel 4 *Inhalt des Testkits* beschrieben

1 Einführung 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 (Calbindin 2, CALB2) 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 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, 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 Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen 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.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in 4. Inhalt des Testkits und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- 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 wird bei Umgebungstemperatur geliefert und 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 Testkits

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
 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  **Achtung**

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

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 **STOP** 1 Flasche
 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure

Vorbereitungsplatte Für die Verdünnung	PLATE	1 Stück
Folie gebrauchsfertig	FOIL	6 Stück
Verdünnungsfläschchen Zur Verdünnung des Enzymkonjugats (max 14 ml)	DILUTION-VIAL	3 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 15, 50, 60 und 100 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Zentrifuge (2.000 g)
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler, ggf. Thermoschüttler
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

5 Probengewinnung und -lagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden. Proben vor der Verwendung nochmals kurz zentrifugieren.

Die Proben können bis zu 12 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 24 Monate gelagert 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, mind. 30 Minuten auf dem Schüttler **(600 rpm)** 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 jeweils dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

6.3 Enzymkonjugat

Nicht vortexen!

Komplettes Fläschchen **CONJ** 5 Minuten bei 2.000 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 (21 – 23 °C) bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

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

Kann die Raumtemperatur von 21 – 23 °C während der Testdurchführung nicht sicher eingehalten werden, sollte ein Thermoschüttler verwendet werden.

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 Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) 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 **Haftklebefolie FOIL** abkleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** (s. 6.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (**Papiertuch**) 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 **Haftklebefolie FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl verdünntes Enzymkonjugat** (s. 6.3) in jede Vertiefung pipettieren.
8. Platte mit **Haftklebefolie FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
10. **100 µl Substrat SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
11. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen. **Es empfiehlt sich, vor dem Stoppen der Reaktion die Platte bei 650 nm zu messen. Dabei sollte Standard 6 eine OD zwischen 0.9 und 1.0 erreichen.**
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.

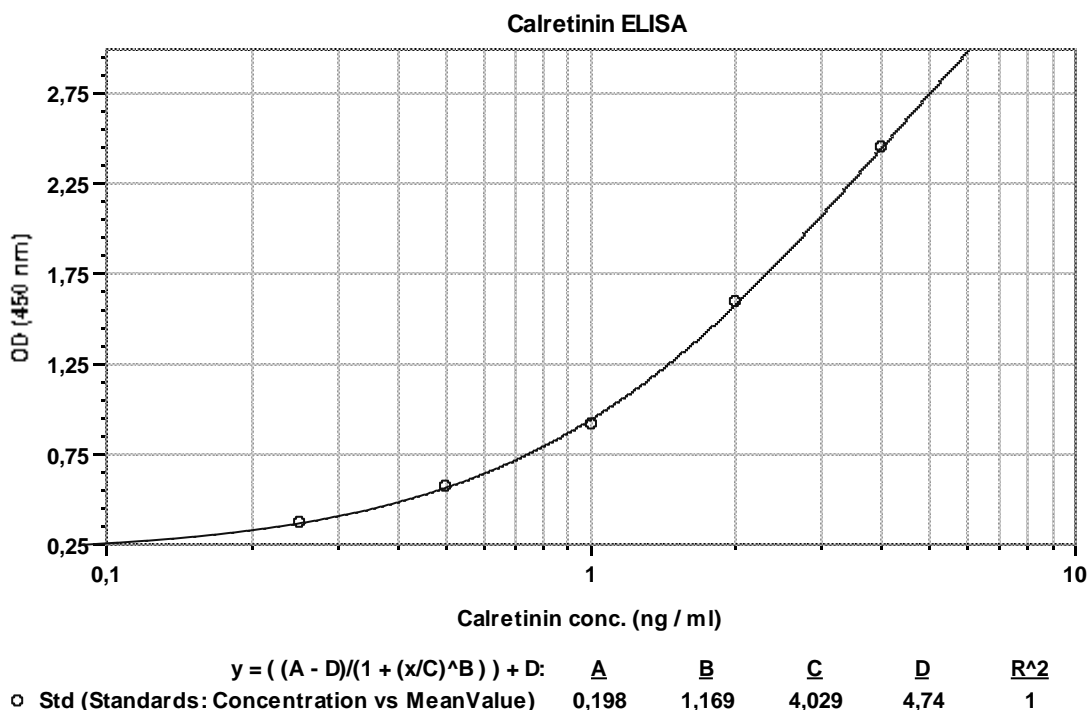
8 Auswertung und Beurteilung

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
EDTA-Plasma, Serum	Männer < 0,65 ng / ml
EDTA-Plasma, Serum	Frauen < 1,10 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 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
- 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
- Weber DG, Casjens S, Wichert K, Lehnert M, Taeger D, Rihs HP, Brüning T, Johnen G.
MoMar Study Group, Tasks and experiences of the prospective, longitudinal, multicenter MoMar (molecular markers) study for the early detection of mesothelioma in individuals formerly exposed to asbestos using liquid biopsies
Cancers 2023; 15:5896
- Casjens S, Johnen G, Raiko I, Pesch B, Taeger D, Töpfer C, Schonefeld S, Moebus S, Jöckel KH, Brüning T, Weber DG
Re-evaluation of potential predictors of calretinin and mesothelin in a population-based cohort study using assays for the routine application in clinical medicine
BMJ Open 2021; 11:e039079
- Hosbach I, Johnen G, Taeger D, Weber D, Brüning T, Wiethage T
EVA-Mesothel: Früherkennung von Mesotheliomen
DGUV Forum 2024; 12:24

- Johnen G, Taeger D, Brüning T
Molekulare Marker zur Krebsfrüherkennung – Follow-up (MoMarFollow)
IPA-Journal 2022; 3:17
- Johnen G, Burek K, Raiko I, Wichert K, Pesch B, Weber DG, Lehnert M, Casjens S, Hagemeyer O, Taeger D, Brüning T
MoMar Studiengruppe, Früherkennung von Mesotheliomen mit Biomarkern erstmals möglich – Ergebnisse der MoMar-Studie
IPA-Journal 2018; 3:16

11 Änderungen

Cal-d_17: Ergänzungen/Änderungen sind grau hinterlegt und ab Charge CR128 gültig.

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.

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
 60 Minuten bei 21 – 23 °C 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 21 – 23 °C schütteln
 4 x Waschen (300 µl verd. WASH pro Vertiefung)

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

Platte mit FOIL abkleben und 60 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln
 4 x Waschen (300 µl verd. WASH pro Vertiefung)

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

Platte mit FOIL abkleben und 60 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln
 4 x Waschen (300 µl verd. WASH pro Vertiefung)

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

25 ± 5 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln
 Messung der Extinktion bei 650m

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

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