



Arbeitsanleitung

Calretinin ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Calretinin
in Plasma und Serum

Nur für Forschungszwecke

REF	EA611/96
-----	----------

	96
---	----

	2 – 8 °C
---	----------

 DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 040-555 87 10 • Fax 040-555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Klinische Bedeutung und Testprinzip	Seite 3
2.	Vorsichtsmaßnahmen	Seite 4
3.	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite 4
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite 5
5.	Probengewinnung	Seite 6
6.	Vorbereitung der Reagenzien	Seite 6
7.	Testdurchführung	Seite 7
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite 9
9.	Testcharakteristika	Seite 10
10.	Literatur	Seite 11
	Pipettierschema	Seite 12

Verwendete Symbole

	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

	Gefahr
	Achtung

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 immobilisierte 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 Forschungszwecke 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.
- 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 Testbestecks

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

- 4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1 - 6** 6 Fläschchen
lyophilisiert,
Inhalt eines Fläschchens mit 200 µl dest. Wasser lösen

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

- 4.3 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen
lyophilisiert,
Inhalt eines Fläschchens mit 200 µl dest. Wasser lösen
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat

- 4.4 **Diluent** **Diluent** 1 Fläschchen
7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt

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

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



Achtung

- 4.7 **Enzymkonjugatpuffer** **CONJ-BUFF** 1 Fläschchen
18 ml, gebrauchsfertig



Achtung

- 4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
20 ml, Konzentrat (50x); Inhalt des Fläschchens mit
destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen

- 4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig



Gefahr

- 4.10 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure

4.11	Vorbereitungsplatte für die Verdünnung	PLATE	1 Stück
4.12	Folie Gebrauchsfertig	FOIL	6 Stück
4.13	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
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Zentrifuge (2.500 g)
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler

5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma und Serum

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden.

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

Standards und Kontrollen

CAL 1 – 6

CON 1 & 2

Inhalt jedes Fläschchens 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.

Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

Enzymkonjugat **CONJ**

Nicht vortexen!

Komplettes Fläschchen 5 Minuten bei 4.000 g zentrifugieren. Benötigtes Volumen aus dem Überstand 200fach mit Enzymkonjugatpuffer in einem Verdünnungsfläschchen (s. 4.13) verdünnen (max. 14 ml).

Z.B. für 6 Streifen 30 µl Enzymkonjugat mit 6 ml Enzymkonjugatpuffer 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 markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

7.1 Probenverdünnung

1. **15 µl Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2, Plasma und/ oder Serum** in die entsprechenden Vertiefungen der Vorbereitungsplatte pipettieren.
2. **60 µl Diluent** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie 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 pipettieren.
2. Platte mit Folie 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** 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** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Folie 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** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. Platte mit Folie abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

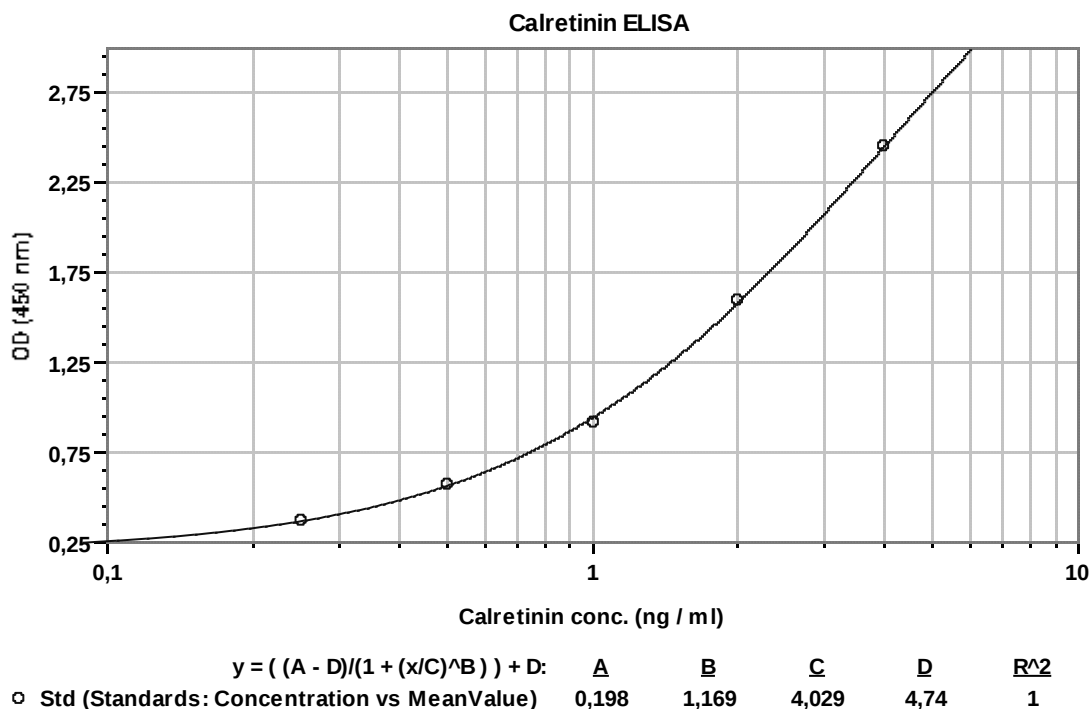
8. Auswertung und Beurteilung

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 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	< 0,8 ng / ml

9.2 Sensitivität

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

9.3 Wiederfindung nach Spiken

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

9.4 Linearität

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., 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

Johnen G, Weber D, MoMar-Studiengruppe.

Molekulare Marker für die Krebsfrüherkennung – Zwischenstand der MoMar-Studie.

IPA-Journal 2016; 02: 20-23

Pipettierschema Probenverdünnung

		Standard	Kontrolle	Probe
Standard	µl	15		
Kontrolle	µl		15	
Probe	µl			15
Diluent	µl	60	60	60

Platte mit Folie abkleben
Platte 60 Minuten schütteln

50 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Verd. Standard	µl	50		
Verd. Kontrolle	µl		50	
Verd. Probe	µl			50

Platte mit Folie abkleben
2 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Antiserum	µl	50	50	50
------------------	----	----	----	----

Platte mit Folie abkleben
60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

Platte mit Folie abkleben
60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm