



MRP8/14

Calprotectin

S100A8/A9

ELISA

EK-MRP8/14 96 tests

Revision date: 2010-03-09

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN MRP8/14 ELISA kit is designed for the quantitative determination of the heteropolymer of myeloid-related protein MRP8/14 (Calprotectin, S100A8/S100A9) (1) in human EDTA plasma and serum (2-5).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test allows the selective measurement of MRP 8/14-antigen by sandwich ELISA. A monoclonal capture antibody (mAb) highly specific to the MRP8/14 heterodimeric and polymeric complexes (6-8), respectively, is coated onto the microtiter plate. A second monoclonal detection antibody (Ab) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) detects the MRP8/14 molecules bound to the monoclonal antibody coated onto the plate after a washing step. After incubation and a further washing step, tetramethylbenzidine (TMB) will be added (blue color formation) followed by a stopping reaction (change to yellow color). The absorption is measured at 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate precoated with anti-MRP8/14 mAb	12 x 8-wells	B-MRP8/14-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-MRP8/14-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 ml	B-MRP8/14-IB	Ready to use
Calibrators A to E* MRP8/14 in a buffer matrix with preservatives	5 vials 1 ml	B-MRP8/14-CASET	Ready to use
Control Low / High Human serum matrix with preservatives	2 vials 1 ml	B-MRP8/14-CONSET	Ready to use.
Enzyme Label Anti-MRP8/14 Ab conjugated to HRP	1 vial 11 ml	B-MRP8/14-EL	Ready to use
TMB-Substrate TMB in citrate buffer with H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-STTS	Ready to use Corrosive agent

Table 1

*) The actual concentration of the standards A to E are 4, 12, 40, 120 and 240 ng/ml MRP8/14, respectively. Serum samples will be diluted 1:100, therefore the calibrators A-E are labeled as follows: 0.4, 1.2, 4.0, 12.0 and 24.0 µg/ml.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store until expiration date at 2-8°C.
Diluted Wash Buffer	Store for up to 6 months at 2-8°C.
Incubation Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Controls	
Calibrators	
Enzyme Label	
TMB-Substrate	
Stop Solution	

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Microtiter Strips, Calibrators and Controls of this kit contain components of human origin. Each serum donor unit used in the preparation of the kit components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV surface antigen, so as for HCV and HIV1/2 antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practice using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 10 µl, 100 µl and 1000 µl precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer Concentrate.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator.
- Blotting paper.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Less than 10 µl of plasma or serum are needed for the quantification of samples in duplicates.

EDTA Plasma: Collect blood into EDTA tubes. Centrifuge at 3000 x g for 5 minutes at room temperature within 4 hours after drawing and collect the plasma. Do not heat-inactivate samples. Samples may be stored at 2-8°C for up to 30 days. If samples have to be stored for a longer period, they are stable at ≤-20°C for at least 6 months.

Serum: Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, mix by gentle inverting sample tubes several times and leave to clot for 45 minutes at room temperature (18-28°C) protected from light. Centrifuge at 1800 x g for 15 minutes at room temperature (18-28°C) and collect the serum immediately. Do not heat-inactivate samples. Samples may be stored at 2-8°C for up to 30 days. If samples have to be stored for a longer period, they are stable at ≤-20°C for at least 6 months.

Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to drawing the sample.

Note: MRP8/14 measurement in plasma from heparinized or citrated blood samples is possible. Be aware that normal values are slightly effected by the sample type used.

PROCEDURAL NOTES

- In the ELISA procedure the **washing steps** are essential to guarantee reproducible results. A **minimal incubation time of at least 20 seconds** of the Wash Buffer in the wells must be ensured each time.
- By using an **automated washer**, Bühlmann strongly recommends to use "plate mode" in which. each process step (dispense) is performed on all strips, before proceeding to the next step (aspiration). Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The indicated **washing cycles are mandatory** to ensure reproducible results.

- To ensure a complete antigen/antibody interaction, the **incubation time in step 5** should not be less than 30 minutes. Moderately longer incubation time has no influence to the final outcome.
- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- It is recommended to assay each control and specimen in **duplicate** each time a test is performed. Since conditions vary from assay to assay, a new standard curve must be generated each time a new assay is performed. Vertical alignment is recommended.
- If the initial concentration of an unknown sample reads greater than the highest Calibrator (Calibrator E), the sample must be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting dilution factor must be accounted for the final calculations.

ASSAY PROCEDURE

Allow the reagents to equilibrate to 18-28°C prior to use

1. Dilute all patient serum/plasma samples 1:100 with Incubation Buffer (e.g. 10 µl serum and 990 µl incubation buffer) and mix well. Allow diluted samples to stand for 15 minutes at 18-28°C prior to pipetting in step 4c.
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.
3. Wash the coated wells twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer in duplicate into wells A1+A2 (Blank).
Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells B1+B2.
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2 etc.
- 4b. Pipet 100 µl of the Low and High Serum Control in duplicate into wells G1+G2 and H1 and H2, respectively.
- 4c. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
5. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400–600 rpm and incubate for 30 minutes at 18-28°C (see Procedural Notes).
6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well (see Procedural Notes). Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
7. Pipet 100 µl of Enzyme Label to all wells.
8. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm and incubate for 30 ± 5 minutes at 18-28°C.
9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and **wash five times** using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the TMB substrate solution to reach 18-28°C.

10. Pipet 100 µl of the TMB Substrate Solution to all wells.
11. Cover the plate with a plate sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 15 ± 2 minutes at 18-28°C.
12. Pipet 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13. within 30 minutes.
13. Read the absorbance at 450 nm by using a microtiter plate reader.

RESULTS

Standard Curve: Record the absorbance at 450 nm for each calibrator and blank well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record averages (=corrected average absorbance). Plot the absorbance (vertical axis) versus the MRP8/14 concentration of the calibrators (horizontal axis) using a semi logarithmic lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter logistic.

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (=corrected average absorbance). Locate the corrected absorbance value of the sample on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the MRP8/14 concentration from the horizontal axis. **The results already include the dilutions done during the procedure.**

See Table 11 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

Since there is no control serum for MRP8/14 commercially available, we recommend using a positive pool for internal quality control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional QC data sheet.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision: 4.3 %. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from 7 different serum samples each obtained in a single run. Each serum sample was assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision: 5.8 %. The inter-assay precision was calculated from two EDTA plasma and serum samples, each in 20 different runs. Each plasma and serum sample was assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 13.

Analytical Sensitivity: $<0.4 \mu\text{g/ml}$. Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimal detectable dose of MRP8/14 was calculated to be far below $0.4 \mu\text{g/ml}$ (Calibrator A) by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the standard curve obtained in a new run.

Functional Sensitivity: $< 0.4 \mu\text{g/ml}$. Eight different serum samples with values between 0.21 and $39.8 \mu\text{g/ml}$ MRP8/14 were assayed 20 times in duplicates as an intra-assay. The %CV and the mean values were calculated for each sample. The functional sensitivity was observed at 10% CV. The resulting precision profile (Figure 2) allows the precise measurement within the entire Standard range from 0.4 to $24 \mu\text{g/ml}$.

Dilution Linearity: **97.8%**. Two human EDTA plasma and serum samples each, with elevated MRP8/14 values were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the protocol. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The values are presented in Table 14.

Spiking Recovery: **100.8%**. Two EDTA plasma and serum samples each, were assayed before and after spiking with different amounts of human MRP8/14. The values are presented in Table 15.

Crossreactivity: **$<0.1\%$** . Incubation Buffer spiked with different amounts of recombinant monomer MRP8 and MRP14 were measured according to the assay procedure, respectively. The values are presented in Table 16.

NORMAL VALUES

MRP8/14 normal values were determined using EDTA plasma and serum samples from apparently healthy and asymptomatic blood donors (adult men and women at the age 18-70 years). 56 EDTA plasma and 93 serum samples were analysed according to the assay procedure and the results are presented in Table 17.

For **EDTA plasma** the Median is at **$0.79 \mu\text{g/ml}$** and the 95th percentile at a concentration of **$2.7 \mu\text{g/ml}$** .

For **serum** the median is at **$1.14 \mu\text{g/ml}$** and the 95th percentile at a concentration of **$2.9 \mu\text{g/ml}$** .

A correlation analysis of 49 EDTA plasma and serum samples drawn from the same blood donors at the same time shows that EDTA plasma values are **slightly lower** than the serum concentrations (see Figure 3).

For differentiation of possible pathological values which are only slightly increased BÜHLMANN recommends using EDTA plasma with which less pre-analytical variations have been observed.

Note: These values have been estimated with EDTA plasma and serum samples from apparently healthy blood donors. A clinical relevant cut-off has to be established for each single indication by each laboratory and further studies, respectively.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN MRP8/14 ELISA Kit wird eingesetzt zur quantitativen Bestimmung des „Myeloid-related“ Heteropolymer Proteins MRP8/14 (Calprotectin, S100A8/S100A9) (1) aus humanem Serum und EDTA-Plasma (2-5).

PRINZIP DER METHODE

Der Test erlaubt die selektive Messung von MRP8/14-Antigen mittels eines Sandwich ELISA. Die Küvetten der Mikrotiterplatte wurden mit einem monoklonalen Fängerkörper (mAk) beschichtet, welcher gegenüber heterodimeren und -polymeren MRP8/14 Komplexen hoch spezifisch ist (6-8). Nach einem Waschschrift bindet ein zweiter monoklonaler Antikörper, der mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert wurde, an die am mAk gebundenen MRP8/14 Moleküle. Nach einer Inkubation und einem weiteren Waschschrift, wird Tetramethylbenzidine (TMB) zugegeben. Durch die Enzymreaktion entsteht eine Blaufärbung. Durch Zugabe der sauren Stopp-Lösung (H_2SO_4) wird die Reaktion beendet und ein Farbumschlag (gelb) erzeugt. Die optische Dichte der Lösung wird bei 450 nm gemessen und ist direkt proportional zur MRP8/14 Konzentration.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte beschichtet mit anti-MRP8/14 mAk	8 x 12 Küvetten	B-MRP8/14-MP	gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat 10x Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-MRP8/14-WB	mit 900 ml deionisiertem H_2O verdünnen
Inkubationspuffer Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-MRP8/14-IB	gebrauchsfertig
Kalibratoren A-E¹⁾ MRP8/14 in Puffer; Konservierungsstoffe	5 Flaschen 1 ml	B-MRP8/14- CASET	gebrauchsfertig
Kontrollen tief/hoch Humanserum mit Konservierungsstoffen	2 Flaschen 1 ml	B-MRP8/14- CONSET	gebrauchsfertig
Enzymmarker anti-MRP8/14 Ak konjugiert mit HRP	1 Flasche 11 ml	B-MRP8/14-EL	gebrauchsfertig
TMB-Substrat Zitrat-gepufferte TMB Lösung mit H_2O_2	1 Flasche 11 ml	B-TMB	gebrauchsfertig
Stopp-Lösung $0.25 \text{ M H}_2\text{SO}_4$	1 Flasche 11 ml	B-STs	gebrauchsfertig korrosiv

Table 3

¹⁾ Die tatsächliche Konzentration der Kalibratoren A-E betragen $4, 12, 40, 120$ und 240 ng/ml MRP8/14. Die Serumproben werden für den ELISA $1:100$ verdünnt, dadurch sind Kalibratoren folgendermassen angeschrieben: $0.4, 1.2, 4.0, 12.0$ und $24.0 \mu\text{g/ml}$.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei $2-8^\circ\text{C}$ lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum angegeben auf der Verpackungsetikette.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung gut verschliessen. Bei $2-8^\circ\text{C}$ bis zum Verfallsdatum haltbar.
Waschpuffer	Bei $2-8^\circ\text{C}$ bis 6 Monate nach der Verdünnung lagern.
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei $2-8^\circ\text{C}$ lagern.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Enzym-Marker	
TMB-Substrat	
Stopp-Lösung	

Table 4

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Mikrotiterplatte, Kalibratoren und Kontrollen dieses Tests enthalten Komponenten humanes Material. Jedes einzelne Spenderserum wurde durch eine FDA genehmigte Methode auf HBV Oberflächen Antigen, sowie auf HCV und HIV1/2 Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann keine Garantie gegeben werden, dass die Materialien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Deshalb müssen die Kit Komponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Komponenten, die humanes Material enthalten müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 10 µl, 100 µl und 1000 µl.
- Polystyrol oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungen.
- 1000 ml Messkolben zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Für eine Probendoppelbestimmung werden weniger als 10 µl Serum oder Plasma benötigt.

EDTA-Plasma: Die Blutproben in EDTA Röhrchen abnehmen. Die Proben innerhalb von 4 Stunden nach Blutabnahme 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugieren. Die Proben nicht Hitze-inaktivieren. Sie können bei 2-8°C bis zu 30 Tage aufbewahrt werden. Bei einer Lagerung bei ≤ -20°C sind die Proben mindestens 6 Monate stabil.

Serum:

Die Blutproben in entsprechenden Röhrchen sammeln, durch wiederholtes Schwenken mischen und danach 45 Minuten lang bei Raumtemperatur (18-28°C) und lichtgeschützt gerinnen lassen. 15 Minuten bei 18-28°C und 1800 x g zentrifugieren, danach das Serum (Überstand) sofort in ein Röhrchen dekantieren. Die Proben nicht Hitze-inaktivieren. Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Um lipämische Proben zu vermeiden, sollte der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nehmen.

Serumproben können bei 2-8°C bis zu 30 Tage aufbewahrt werden. Bei einer Lagerung bei ≤ -20°C sind die Proben mindestens 6 Monate stabil.

Anmerkung: Die Messung von MRP8/14 kann auch aus Heparin- oder Zitratplasma erfolgen. Die Werte sind vom Probenmaterial abhängig und deshalb leicht unterschiedlich.

TECHNISCHE HINWEISE

- Die sorgfältige Ausführung der **Waschschritte** sind essentiell um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers** in der Küvette **von mindestens 20 Sekunden** muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.
- Wird ein **Waschautomat** eingesetzt, muss der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor der nächste Schritt (Absaugen)

gestartet wird. Somit wird die minimale Inkubationszeit gewährleistet.

- Die angegebenen **Waschzyklen müssen zwingend eingehalten** werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Um eine vollständige Antigen/Antikörper Reaktion zu gewährleisten, darf die Inkubationszeit in Schritt 5 nicht kürzer als 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkubationszeiten zeigen dagegen keinen Einfluss auf das Resultat.
- Die als Marker verwendete Peroxidase (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische chlorierte Kohlenwasserstoffe, die oft im Wasser vorkommen. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser von hoher Qualität gebraucht werden.
- Es wird empfohlen, im Doppelansatz zu testen. Da sich Bedingungen von Ansatz zu Ansatz unterscheiden, muss die Standardkurve bei jeden Testansatz bestimmt werden.
- Falls die Anfangskonzentration einer unbekannten Probe grösser als diejenige des höchsten Kalibrators (E) ist, muss diese Probe mit Inkubationspuffer verdünnt und der Arbeitsanleitung entsprechend getestet werden. Der zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Endberechnung dieser Probe berücksichtigt werden

ARBEITSANLEITUNG

Reagenzien vor der Verwendung auf 18-28°C äquilibrieren.

1. Proben (Serum/ Plasma) mit Inkubationspuffer 1:100 verdünnen (z.B. 10 µl Serum + 990 µl Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für 15 Minuten bei 18-28°C stehen lassen.
2. Eine Mikrotiter-Platte mit den für Kalibratoren, Kontrollen und Proben erforderlichen Streifen vorbereiten. Ungenutzte Streifen vom Halter entfernen und mit dem Dessikator einpacken; gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten zweimal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Je 100 µl Inkubationspuffer in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren (als Blank).
Je 100 µl Kalibrator A in B1 und B2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator B in C1 und C2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator C in D1 und D2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator D in E1 und E2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator E in F1 und F2 pipettieren.
- 4b. Je 100 µl Kontrolle Tief in G1 und G2 pipettieren.
Je 100 µl Kontrolle Hoch in H1 und H2 pipettieren.
- 4c. Je 100 µl von den verdünnten Serumproben in die nächsten Mikroküvetten pipettieren.
5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und auf einem Platten-Schüttler bei 400-600 rpm 30 Minuten bei 18-28°C inkubieren (siehe technische Hinweise).
6. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen (siehe technische Hinweise). Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzym-Marker zu allen Mikroküvetten zugeben.

8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und auf einem Platten-Schüttler bei 400-600 rpm 30 ± 5 Min. bei 18-28°C inkubieren.
 9. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und **fünf mal** mit jeweils $\geq 300 \mu\text{l}$ Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- Wichtig:** TMB-Substratlösung vor dem Gebrauch im Schritt 10 auf 18-28°C erwärmen.
10. 100 μl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
 11. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 15 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
 12. 100 μl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen. innerhalb der nächsten 30 Minuten zu Schritt 13 übergehen.
 13. Optische Dichte in einem Platten-Photometer bei 450 nm messen

RESULTATE

Eichkurve: Optische Dichte der Kalibrator- oder Blank-Mikroküvetten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der netto Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert. Korrigierte Absorptionsmittelwert (Vertikalachse) gegen die MRP8/14 Konzentration der Kalibratoren (Horizontalachse) auf einem semi-logarithmischen (lin/log) Papier auftragen. Optimale Eichkurve (best fitting curve) zeichnen oder mit einem vier Parameter Algorithmus (4-Parameter Logistics) berechnen.

Proben und Kontrollen: Optische Dichte der Proben- und Kontrollen-enthaltenden Mikroküvetten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der netto Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahiert. MRP8/14 Konzentration der Proben und Kontrollen aus der Eichkurve lesen, indem der netto Absorptionsmittelwert auf der Eichkurve aufgetragen wird und den entsprechenden MRP8/14 Konzentration aus der Horizontalachse bestimmt wird. **Die Resultate beinhalten bereits den Verdünnungsfaktor der Proben (1:100).**

Ein typisches Beispiel von Ergebnissen und Eichkurve sind in Table 11 und Figure 1 dargestellt. *Diese Daten dienen nur der Illustration. Eine Eichkurve muss für jeden Probenansatz jeweils neu ermittelt werden.*

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Arbeitsanleitung ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Da es kein kommerziell erhältliches Kontrollserum für MRP8/14 gibt, wird empfohlen, positive Serumproben (Pool) als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC Datenblatt angegeben.

Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte

Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision: 4.3%. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von sieben Serumproben im gleichen Ansatz. Die Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 12 angegeben.

Inter-Assay Präzision: 5.8%. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von je zwei EDTA-Plasma- und Serumproben in 20 verschiedenen Ansätzen. Die Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 13 angegeben.

Analytische Sensitivität: $< 0.4 \mu\text{g/ml}$. Zwanzig Doppelmessungen mit Inkubations-Puffer wurden in einem Testansatz durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte ermittelt. Die kleinste nachweisbare Menge MRP8/14 wurde durch Interpolation vom Mittelwert plus zwei Standardabweichungen auf der erhaltenen Eichkurve berechnet und liegt weit unter $0.4 \mu\text{g/ml}$ (Kalibrator A).

Funktionelle Sensitivität: $< 0.4 \mu\text{g/ml}$. Acht verschiedene Serumproben mit Werten zwischen 0.21 und 39.8 $\mu\text{g/ml}$ MRP8/14 wurden in der Intra-Assay Präzision in Doppelansätzen zwanzigfach gemessen. Die funktionelle Sensitivität wurde bei einem Variationskoeffizient (VK) von 10% abgelesen. Das daraus resultierende Präzisionsprofil (Figure 2) erlaubt eine präzise Messung innerhalb des gesamten Standardbereichs von 0.4 – 24 $\mu\text{g/ml}$.

Verdünnungslinearität: 97.8%. Je zwei EDTA-Plasma- und Serumproben- mit erhöhter MRP8/14 Konzentration wurde mit Inkubations-Puffer verdünnt, und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Werte sind in Table 14 angegeben.

Wiederfindung: 100.8%. Je zwei EDTA-Plasma- und Serumproben wurden bevor und nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen von humanem MRP8/14 getestet. Die erhaltenen Werte sind in Table 15 angegeben.

Kreuzreaktivität: $< 0.1\%$. Inkubationspuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen von einem der beiden Monomere (MRP8 resp. MRP14) wurde entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Table 16 angegeben.

NORMALWERTE

Die MRP8/14 Normalwerte in humanem EDTA-Plasma /Serum wurden ermittelt an Hand eines Kollektivs von gesunden, asymptomatischen Blutspendern (Erwachsene, Männer und Frauen zwischen 18-70 Jahren). 56 EDTA-Plasma- und 93 Serumproben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Resultate sind in Table 17 aufgelistet.

Der Median der **Serumproben** liegt bei **1.14 $\mu\text{g/ml}$** und die 95. Perzentile bei einer Konzentration von **2.9 $\mu\text{g/ml}$** .

Der Median von **EDTA-Plasmaproben** liegt bei **0.79 $\mu\text{g/ml}$** und die 95. Perzentile bei einer Konzentration von **2.7 $\mu\text{g/ml}$** .

Eine Korrelationsberechnung zwischen Ergebnissen von EDTA-Plasma und Serumproben (n=49), die gleichzeitig bei

den Spendern abgenommen wurden zeigt, dass die Werte in EDTA-Plasma leicht niedriger liegen. (siehe Figure 3).

Um ein leicht erhöhtes Ergebnis sicherer beurteilen zu können, empfiehlt BÜHLMANN die Verwendung von EDTA-Plasma, da weniger Störfaktoren in der Präanalytik auftreten.

Hinweis: Diese Werte wurden mit Hilfe von EDTA-Plasma und Serumproben gesunder Blutspender ermittelt. Ein klinisch relevanter Cut-off muss von jedem Labor für jede Indikation sowie durch weitere klinische Studien definiert werden.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN MRP8/14 ELISA a été conçue pour la détermination quantitative de la myeloid-related protéine MRP8/14 (Calprotectin, S100A8/S100A9) (1) dans le plasma EDTA et le sérum (2-5).

PRINCIPE DU DOSAGE

Ce dosage permet la mesure sélective de l'antigène MRP8/14 au moyen d'un ELISA de type „sandwich“. Les puits de la microplaque sont recouverts d'un anticorps monoclonal de capture (Acm), anticorps hautement spécifique aux complexes hétérodimériques et polymériques de MRP8/14 (6-8). Après une étape de lavage, le second anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) se fixe à la molécule de MRP8/14 liée à l'Acm. Après une incubation et un lavage, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. La réaction enzymatique permet d'obtenir une coloration bleue. Elle est stoppée par l'ajout d'une solution acide (H₂SO₄). La couleur bleue vire au jaune. La mesure de l'absorbance à 450 nm est directement proportionnelle à la concentration de MRP8/14.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque coatée avec un Acm anti-MRP8/14	8 x 12 puits	B-MRP8/14-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de lavage concentré 10x Avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-MRP8/14-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation Avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-MRP8/14-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A à E¹⁾ MRP8/14 dans un tampon ; conservateurs	5 flacons 1 ml	B-MRP8/14-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé Sérum humain avec conservateurs	2 flacons 1 ml	B-MRP8/14-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique Acm anti-MRP8/14 conjugué à la HRP	1 flacon 11 ml	B-MRP8/14-EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB dans un tampon citrate + H ₂ O ₂	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution stop 0.25 M H ₂ SO ₄	1 flacon 11 ml	B-STTS	Prêt à l'emploi corrosif

Table 5

¹⁾ Les concentrations effectives des calibrateurs de A à E sont de 4, 12, 40, 120, et 240 ng/ml de MRP8/14. Afin de tenir compte de la dilution 1 :100 dans les calculs de concentration finale, les calibrateurs A à E sont étiquetés respectivement de la manière suivante: 0.4, 1.2, 4.0, 12.0 et 24.0 ng/ml de MRP8/14.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts/ non entamés	
Stables à 2-8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts/ reconstitués	
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Tampon de lavage	Stable à 2-8°C durant 6 mois après dilution
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption
Calibrateurs	
Contrôles	
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	
Solution stop	

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Les barrettes de la microplaque, calibrateurs et contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VHC anti-VIH1/2. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA. *En conséquence, tous les échantillons ainsi que les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux.* Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (GLP) en respectant les précautions d'usage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 10 µl, 100 et 1000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Eprouvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Moins de 10 µl de plasma ou de sérum sont nécessaires pour la quantification des échantillons en double.

Plasma EDTA : recueillir le sang dans des tubes EDTA. Centrifuger à 3000 x g pendant 5 minutes à température ambiante dans les 4 heures suivant le prélèvement et le recueil du plasma. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur. Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C pendant une durée allant jusqu'à 30 jours. Les échantillons restent stables à ≤-20°C pendant au moins 6 mois s'ils doivent être conservés pendant une période plus longue.

Sérum : recueillir le sang dans des tubes secs, éviter l'hémolyse, mélanger en retournant doucement le tube d'échantillon à plusieurs reprises et laisser coaguler pendant 45 minutes à température ambiante (18-28°C) en protégeant de la lumière. Centrifuger à 1800 x g et recueillir immédiatement le sérum. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur. Les échantillons peuvent être conservés à 2-

8°C pendant une durée allant jusqu'à 30 jours. Les échantillons restent stables à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 6 mois s'ils doivent être conservés plus longtemps.

Les échantillons lipémiques, hémolytiques et ictériques ne devraient pas être utilisés pour ce dosage. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner durant au moins 12 heures avant le recueil de l'échantillon.

Remarque : le dosage de la MRP8/14 plasmatique dans des échantillons de sang hépariné ou citraté est possible. Noter que les valeurs normales sont légèrement modifiées selon le type d'échantillon utilisé.

REMARQUES TECHNIQUES

- **Le lavage** est un point important de l'ELISA. Pour garantir la reproductibilité des résultats il est nécessaire que le tampon de lavage **incube à chaque fois un minimum de 20 secondes** dans les puits de la plaque.
- Bühlmann recommande, lors de l'utilisation d'un **laveur de plaque automatique**, le choix du mode "Plaque" avec lequel chaque étape (remplissage) est effectuée sur toute la plaque avant de passer à l'étape suivante (aspiration). De cette façon le temps d'incubation minimum est garanti.
- **Il est obligatoire de respecter le nombre de cycle de lavage** pour l'obtention de résultats fiables.
- Le temps d'incubation de l'étape 5 ne doit pas être inférieur à 30 minutes pour assurer l'interaction complète entre l'antigène et l'anticorps. Des temps d'incubation un peu plus longs n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- L'enzyme (HRP) utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoture de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de bonne qualité.
- Il est recommandé de mesurer chaque contrôle et chaque échantillon **en double** à chaque fois qu'un dosage est effectué. Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que celui du calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte pour le calcul de la concentration effective. Les cycles de congélation/décongélation répétés des échantillons et des réactifs doivent être évités.

PROCEDURE

Porter les réactifs à une température ambiante (18-28°C) avant utilisation.

1. Diluer au 1:100 tous les échantillons (serum/ plasma) avec le tampon d'incubation (par ex., 10 µl de sérum + 990 µl de tampon d'incubation). Bien mélanger et incuber à 18-28°C durant 15 minutes avant l'étape 4c.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons. Retirer les barrettes en surplus du support et les placer **immédiatement** au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.
3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et taper énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

- 4a. Distribuer 100 µl de tampon d'incubation en double dans les puits A1 et A2 (blanc).

Distribuer 100 µl de calibrateur A dans B1 et B2.
Distribuer 100 µl de calibrateur B dans C1 et C2.
Distribuer 100 µl de calibrateur C dans D1 et D2.
Distribuer 100 µl de calibrateur D dans E1 et E2.
Distribuer 100 µl de calibrateur E dans F1 et F2.

- 4b. Distribuer 100 µl de contrôle bas dans G1 et G2.
Distribuer 100 µl de contrôle élevé dans H1 et H2.

- 4c. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.

5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incuber à 18-28°C pendant 30 minutes sur un agitateur de microplaque réglé à 400-600 rpm (voir remarques techniques).

6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chaque puits trois fois, avec au moins 300 µl de tampon de lavage (voir remarques techniques). Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

7. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique dans tous les puits.

8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber à 18-28°C durant 30 (± 5) minutes sur un agitateur de microplaques.

9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver les puits **cinq fois** avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important : laisser le substrat TMB atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.

11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber sur l'agitateur à 400-600 rpm pendant 15 (± 5) minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.

12. Ajouter 100 µl de solution stop acide dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 au cours des 30 minutes suivantes.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage: mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque puits contenant calibrateurs et blanc. Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs et noter les valeurs calculées d'absorption moyenne corrigée. Reporter l'absorbance (axe vertical) contre la concentration de MRP8/14 des calibrateurs (axe horizontal) sur du papier millimétré semi-logarithmique (lin/log). Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à quatre paramètres (4-parameter logistics).

Echantillons et contrôles: mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon et de chaque contrôle. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Reporter la valeur d'absorbance nette de l'échantillon sur l'axe vertical de la courbe d'étalonnage. Reporter l'absorbance nette de l'échantillon sur la courbe

d'étalonnage et lire la concentration de MRP8/14 sur l'axe horizontal. **Les résultats obtenus tiennent compte des dilutions effectuées au cours de la procédure.**

Voir Table 11 et Figure 1 pour des exemples de résultats et de courbes d'étalonnage typiques. *Ces résultats et ces courbes d'étalonnage sont donnés à titre d'exemple uniquement. Une courbe d'étalonnage doit être produite pour chaque dosage.*

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de sérum MRP8/14 de référence commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs et négatifs comme référence interne et contrôle qualité.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai : 4.3%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 doubles de sept échantillons de sérum lors d'un seul et même essai. Les échantillons sériques ont été dilués avec le tampon d'incubation à 1:100 puis analysés d'après la procédure standard. Les résultats obtenus sont exprimés en Table 12.

Précision inter-essai : 5.8%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 20 doubles de quatre échantillons (plasma EDTA et sérum) lors de 20 essais différents. Les échantillons ont été dilués avec le tampon d'incubation à 1:100 puis analysés d'après la procédure standard. Les résultats obtenus sont exprimés en Table 13.

Sensibilité analytique : <0.4 µg/ml. Vingt doubles du tampon d'incubation (Blanc) ont été mesurés lors d'un seul et même essai. La moyenne ainsi que la déviation standard de l'absorbance ont été calculées. La quantité détectable minimale obtenue est largement inférieure à 0.4 µg/ml de MRP8/14 en ajoutant deux déviations standard à l'absorbance moyenne puis en lisant le titre à l'aide de la courbe d'étalonnage établie lors du même essai.

Sensibilité fonctionnelle : <0.4 µg/ml. 8 échantillons sériques humains aux concentrations comprises entre 0.21 et 39.8 µg/ml de MRP8/14 ont été analysés en double 20 fois au cours d'un intra-essai. Le coefficient de variation et les valeurs moyennes furent calculées pour chaque échantillon. La sensibilité fonctionnelle est observée à 10 % de CV. Le profil de précision résultant (Figure 2) permet une mesure précise dans la gamme standard entière de 0.4 à 24 µg/ml de MRP8/14.

Parallélisme/linéarité de dilution : 97.8 %. 4 échantillons de plasma EDTA et sérum présentant des taux de MRP8/14 élevés ont été dilués avec le tampon d'incubation puis dosés selon le protocole standard. Les résultats obtenus sont exprimés en Table 14.

Test de récupération : 100.8 %. Deux échantillons de plasma EDTA et deux échantillons de sérum ont été dosés avant le test de récupération. Des quantités croissantes de MRP8/14 ont été ajoutées à ces échantillons avant de procéder au dosage standard. Les résultats obtenus sont exprimés en Table 15.

Réactions croisées : le tampon d'incubation additionné de différentes concentrations des monomères MRP8 et MRP14 ont été analysés. Les résultats obtenus sont exprimés en Table 16.

VALEURS NORMALES

La MRP8/14 a été déterminée dans du plasma EDTA et du sérum normal humain en utilisant des échantillons de donneurs de sang apparemment en bonne santé et asymptomatiques (sujets adultes hommes et femmes âgés de 18-70 ans). 56 échantillons de plasma EDTA et 93 échantillons de sérum ont été analysés selon la procédure de dosage et les résultats sont présentés en Table 17.

Pour le **plasma EDTA**, la médiane est à **0,79 µg/ml** et le 95ème percentile à une concentration de **2,7 µg/ml**.

Pour le **sérum**, la médiane est à **1,14 µg/ml** et le 95ème percentile à une concentration de **2,9 µg/ml**.

Une analyse de corrélation portant sur 49 échantillons de sérum et de plasma EDTA provenant des mêmes donneurs de sang au même moment montre que les valeurs de plasma EDTA sont **légèrement plus faibles** que les concentrations sériques (voir Figure 3).

Pour différencier d'éventuelles valeurs pathologiques qui ne seraient que légèrement augmentées, BÜHLMANN recommande d'utiliser du plasma EDTA avec lequel des variations pré-analytiques moins importantes ont été observées.

Remarque : ces valeurs ont été estimées avec des échantillons de plasma EDTA et de sérum de donneurs sanguins apparemment sains. Une valeur seuil cliniquement significative doit être établie respectivement pour chaque indication par chaque laboratoire ainsi que pour des études supplémentaires.

USO

Il kit BÜHLMANN MRP8/14 ELISA è inteso per la determinazione quantitativa della proteina MRP8/14 (Myelin-related Protein, Calprotectina, S100A8/S100A9) (1) nel plasma EDTA e siero umana (2-5).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test consente la misurazione selettiva dell'antigene MRP 8/14 attraverso un dosaggio sandwich ELISA. Un anticorpo monoclonale a cattura (mAb) altamente specifico rispettivamente per i complessi eterodimerici e polidimerici MRP8/14. (6-8), è coattato alla micropiastra. Un secondo anticorpo monoclonale (Ab) coniugato con ossidasi di rafano (HRP) rileva le molecole MRP8/14 legate all'anticorpo monoclonale coattato alla piastra dopo lavaggio. Dopo incubazione ed ulteriore lavaggio, viene aggiunta tetrametilbenzidina (TMB) (formazione di colore blu) seguito da una reazione Stoppante (cambio della colorazione in giallo). L'assorbimento viene misurato a 450 nm.

REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con anti-MRP8/14 mAb	Pozzetti 12 x 8	B-MRP8/14-MP	Pronto all'uso
Foglio Sigillante per la piastra	3 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 fialone 100 ml	B-MRP8/14-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di Incubazione Con conservanti	1 fialone 100 ml	B-MRP8/14-IB	Pronto all'uso
Calibratori A-E* MRP 8/14 in tampone con conservanti	5 fialoni 1 ml	B-MRP8/14-CASET	Pronto all'uso
Controllo basso/alto Matrice di siero umano con conservanti	2 fialoni 1 ml	B-MRP8/14-CONSET	Pronto all'uso
Marcato Enzimatico Anti-MRP8/14 Ab coniugato con HRP	1 fialone 11 ml	B-MRP8/14-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB- TMB in un tampone citrato con H ₂ O ₂	1 fialone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione Stoppante Acido Solforico 0.25 M	1 fialone 11 ml	B-STTS	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 7

*) La concentrazione effettiva degli standard A - E è rispettivamente 4, 12, 40, 120 e 240 ng/ml MRP8/14. Per includere il fattore della diluizione (1:100) nel calcolo finale, i calibratori da A - E sono indicati come segue: 0.4, 1.2, 4.0, 12.0 e 24.0 µg/ml MRP8/14 rispettivamente.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non utilizzati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Micropiastra	Riporre immediatamente le strip non utilizzate nella busta di alluminio che contiene l'essiccante e risigillarle. Conservarle fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di Lavaggio	Conservare fino a 6 mesi a 2-8°C.
Tampone di Incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Controlli	
Calibratori	
Marcato Enzimatico	
Substrato-TMB	
Soluzione Stoppante	

Table 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Le strip, i Calibratori, i Controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascuna unità di siero utilizzata nella preparazione dei componenti del kit è stata testata da un metodo approvato dall'FDA e trovata negativa per l'Antigene di Superficie dell'HBV, per gli Anticorpi Anti-HCV ed Anti-HIV 1 e 2. Benché questi metodi siano altamente accurati, non esistono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'Epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere infezioni.* Tutti i prodotti contenenti materiali di origine umana, devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle buone pratiche di laboratorio utilizzando idonee precauzioni.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- 10 µl, 100 µl e 1000 µl pipette di precisione con puntali monouso.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene, per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro 1000 ml per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.
- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il Tampone di Lavaggio.
- Rotatore per Micropiastra
- Carta blottante
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per la quantificazione dei campioni in duplicato sono necessari meno di 10 µl di plasma o siero.

Plasma EDTA: prelevare il sangue in provette EDTA. Centrifugare a 3000 x g per 5 minuti a temperatura ambiente entro 4 ore dopo il prelievo e raccogliere il plasma. Non inattivare a caldo i campioni. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di 30 giorni. Qualora si rendesse necessario conservarli per periodi più lunghi, i campioni sono stabili a ≤-20°C per almeno 6 mesi.

Siero: prelevare il sangue in provette non trattate, evitare l'emolisi, miscelare con delicatezza capovolgendo ripetutamente la provetta e lasciar riposare per 45 minuti a temperatura ambiente (18-28°C), al riparo dalla luce, per consentire la formazione del coagulo. Centrifugare a 1800 x g per 15 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) e raccogliere immediatamente il siero. Non inattivare a caldo i campioni. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di 30 giorni. Qualora si rendesse necessario conservarli per periodi più lunghi, i campioni sono stabili a ≤-20°C per almeno 6 mesi.

I campioni lipemici, emolitici e itterici non devono essere utilizzati per questo dosaggio. Per evitare che i campioni risultino lipemici, chiedere al paziente di restare a digiuno almeno 12 ore prima del prelievo.

Nota: è possibile determinare la proteina MRP8/14 nel plasma anche utilizzando campioni di sangue eparinato o citrato. Si ricordi che i valori normali sono leggermente dipendenti dal tipo di campione utilizzato.

AVVERTENZE PROCEDURALI

- Nella procedura del dosaggio ELISA, i **passaggi del lavaggio** sono essenziali per garantire la riproducibilità dei risultati. **Una minima incubazione di almeno 20 secondi** del tampone di lavaggio nei pozzetti, deve essere eseguita in ogni passaggio.
- Usando rondella automatizzata, Bühlmann suggerisce vivamente usare un cosiddetto "modo della piastra", cioè che ogni operazione trattata (erogare) è effettuata in sequenza su tutte le strisce, prima dell'elaborazione al punto trattato seguente (aspirazione). Quindi, il tempo minimo di incubazione è garantito.
- **Il numero di passaggi di lavaggio consigliato sono importanti** da eseguire per assicurare la riproducibilità dei risultati
- Per assicurare un'interazione completa tra antigene/-anticorpo, il periodo d'incubazione nel passo nr. 5 non deve essere meno di 30 minuti. Incubazioni prolungate minimamente non hanno influenza sui risultati.
- L'enzima usato come marcato è inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarburi aromatici che spesso si trovano nei rifornimenti d'acqua di laboratorio. Di conseguenza usare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- Si consiglia di dosare ogni controllo e campione **in duplicato** ogni volta che viene eseguito un test. Dal momento che le condizioni variano da dosaggio a dosaggio, si deve creare una nuova gamma standard ogni volta che viene eseguito un nuovo dosaggio. Si consiglia un allineamento verticale.
- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del Calibratore (Calibratore E) più alto, il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone d'Incubazione e dosato ancora secondo procedura. Il fattore di diluizione risultante deve essere preso in considerazione per i calcoli finali.

PROCEDURA DI DOSAGGIO

Lasciare che i reagenti raggiungano 18-28°C prima dell'uso

1. Diluire tutti i campioni di siero/ plasma 1:100 con il Tampone d'Incubazione (ad es. 10 µl di siero e 990 µl di tampone d'incubazione) e mescolare bene. Lasciar riposare i campioni diluiti per 15 minuti a 18-28°C prima della dispensazione al punto 4c.
2. Preparare una piastra con le strip sufficienti per verificare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni. Rimuovere le strip in eccesso dal contenitore, eliminare le strip in eccesso e risigillarle immediatamente nella busta di alluminio con l'essiccante. Conservarle refrigerate.
3. Sciacquare i pozzetti coattati due volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta blottante.
- 4a. Dispensare 100 µl di Tampone d'Incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2.
Dispensare 100 µl del Calibratore A nei B1+B2.
Dispensare 100 µl del Calibratore B nei C1+C2.
Dispensare 100 µl del Calibratore C nei D1+D2.
Dispensare 100 µl del Calibratore D nei E1+E2.
Dispensare 100 µl del Calibratore E nei F1+F2.
- 4b. Dispensare 100 µl di Controllo Basso nei G1+G2.
Dispensare 100 µl di Controllo Alto nei H1+H2.

- 4c. Dispensare 100 µl di ogni campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.
 5. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm e incubare per 30 minuti a 18-28°C (cf. Avvertenze procedurali).
 6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto (cf. Avvertenze procedurali). Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta blottante.
 7. Dispensare 100 µl di Marcatore enzimatico in ogni pozzetto.
 8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e posizionarla su un mixer settato a 400-600 rpm ed incubare per 30 ± 5 minuti a 18-28°C.
 9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e **lavare 5 volte** usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta blottante.
- Importante:** lasciare che la soluzione di substrato TMB raggiunga 18-28°C.
10. Dispensare 100 µl di Soluzione di Substrato TMB in tutti i pozzetti.
 11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm, proteggendola dalla luce diretta ed incubarla per 15 ± 2 minuti a 18-28°C.
 12. Dispensare 100 µl di Soluzione di Bloccaggio in tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con un puntale. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.
 13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

RISULTATI

Curva Standard: registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni calibratore e pozzetto bianco. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Tracciare l'assorbanza (asse verticale) vs. la concentrazione MRP8/14 dei calibratori (asse orizzontale) usando carta per grafici log/log. Disegnare la curva migliore o calcolare la curva standard usando un algoritmo a quattro parametri (4-parameter logistics).

Campioni e Controlli: registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni campione e pozzetto di controllo. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Collocare il valore d'assorbanza corretta del campione sull'asse verticale, disegnare una linea orizzontale che intersechi la curva standard e leggere la concentrazione MRP8/14 sull'asse orizzontale. **I risultati comprendono già le diluizioni eseguite durante la procedura.**

Vedi Table 11 e Figure 1 per dati tipici (risultati e curva standard). *Questi risultati e la gamma standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Deve essere generata una gamma standard per ogni set di campioni da controllarsi.*

CONTROLLO DI QUALITÀ

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'utilizzo di precise tecniche di laboratorio (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Dal momento che non esiste un siero di controllo per MRP8/14 in commercio, si consiglia l'uso di un pool di siero positivo per il controllo di qualità interno.

La riproducibilità dei parametri della gamma standard e dei valori di controllo deve rientrare entro determinati limiti di accettabilità del laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e stampati sul Foglio Dati di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e dispositivi di rilevazione del tempo ii) settaggio del lettore ELISA, iii) date di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione e di incubazione v) la Soluzione di Substrato TMB deve essere incolore, vi) purezza dell'acqua.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Precisione Intra-Dosaggio: 4.3%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori (siero) da 7 campioni diversi ciascuno ottenuto in un'unica seduta. Ciascun campione di siero è dosato secondo procedura. I valori sono presentati in Table 12.

Precisione Inter-Dosaggio: 5.8%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata da 4 campioni di plasma EDTA e siero, ciascuno dosato in 20 sedute diverse. Ogni campione di siero e plasma è dosato secondo procedura. I valori sono presentati in Table 13.

Sensibilità Analitica: $<0.4 \mu\text{g/ml}$. Venti duplicati di Tampone d'Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La media e lo scarto quadratico medio sono state calcolate per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile di MRP8/14 è stata calcolata più bassa che $0.4 \mu\text{g/ml}$ (Calibratore A) aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media e intersecando questo valore con la gamma standard ottenuta in una nuova seduta.

Sensibilità Funzionale: $<0.4 \mu\text{g/ml}$. 8 diversi campioni di siero con valori tra 0.21 e $39.8 \mu\text{g/ml}$ MRP8/14 sono stati dosati 20 volte in duplicati come intra-dosaggio. La % del CV ed i valori medi sono stati calcolati per ciascun campione. In un grafico la sensibilità funzionale è stata osservata al 10% del CV. Il profilo di precisione osservato (Figure 2) permette dosaggi accurati entro la gamma standard da 0.4 a $24 \mu\text{g/ml}$.

Linearità di Diluizione: 97.8%. Due campioni di plasma EDTA e siero umani, ciascuno con elevati valori MRP8/14, sono stati diluiti con il Tampone d'Incubazione e successivamente dosati secondo il protocollo. I valori attesi sono stati calcolati dai valori osservati con la prima diluizione. I valori sono presentati in Table 14.

Recupero di Diluizione: 100.8%. Due campioni diluiti di siero e di plasma EDTA sono stati dosati prima e dopo diluizione con diverse quantità di MRP8/14 umano. I valori sono presentati in Table 15.

Crossreattività: I Tamponi d'Incubazione diluiti con diverse quantità di uno dei due monomeri ricombinanti MRP8 e MRP14 sono stati dosati secondo procedura. I valori sono riportati in Table 16.

VALORI NORMALI

La proteina MRP8/14 è stata determinata nel plasma EDTA e nel siero umano normale utilizzando campioni di donatori di sangue apparentemente sani e asintomatici (uomini e donne adulti di età compresa tra 18 e 70 anni). 56 campioni di plasma EDTA e 93 campioni di siero sono stati analizzati secondo la procedura di dosaggio e i risultati sono riportati nella Table 17.

Per il **plasma EDTA**, la mediana è di **$0.79 \mu\text{g/ml}$** e il 95° percentile è alla concentrazione di **$2.7 \mu\text{g/ml}$** .

Per il **siero**, la mediana è di **$1.14 \mu\text{g/ml}$** e il 95° percentile è alla concentrazione di **$2.9 \mu\text{g/ml}$** .

Un'analisi di correlazione effettuata su 49 campioni di plasma EDTA e siero prelevati allo stesso donatore nello stesso momento mostra che i valori ottenuti con plasma EDTA sono **leggermente inferiori** alle concentrazioni riscontrate nel siero (vedere Figure 3).

Per la differenziazione di eventuali valori patologici solo leggermente aumentati, BÜHLMANN consiglia di utilizzare plasma EDTA, con il quale sono state osservate meno variazioni pre-analitiche.

Nota: questi valori sono stati determinati con campioni di plasma EDTA e siero di donatori di sangue apparentemente sani. Una soglia clinicamente rilevante deve essere stabilita per ogni indicazione da parte di ciascun laboratorio e, rispettivamente, in ulteriori studi.

USO PREVISTO

El kit ELISA MRP8/14 de BÜHLMANN ha sido diseñado para la determinación cuantitativa de la proteína MRP8/14 (calprotectina; S100A8/S100A9) (1) en plasma EDTA y suero y humano (2-5).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La prueba permite la medición selectiva del antígeno MRP 8/14 mediante ELISA intercalado. Un anticuerpo de captura monoclonal (AcMo) altamente específico a los complejos heterodiméricos y poliméricos MRP8/14 (6-8) recubre la Microplaca. Un segundo anticuerpo monoclonal de detección conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) detecta las moléculas MRP8/14 unidas al anticuerpo monoclonal que recubre la placa después de un paso de lavado. Tras la incubación y un nuevo paso de lavado se añade tetrametilbenzidina (TMB) (formación de color azul) seguido de una reacción de parada (cambio a color amarillo). La absorción se mide a 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Microplaca recubierta con AcMo anti-MRP8/14	12 x 8 pocillos	B-MRP8/14-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes.	1 botella 100 ml	B-MRP8/14-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-MRP8/14-IB	Listo para usar
Calibradores A a E* MRP 8/14 en una matriz de tampón con conserv.	5 viales 1 ml	B-MRP8/14-CASET	Listo para usar
Control bajo/alto Matriz de suero humano con conservantes	2 viales 1 ml	B-MRP8/14-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático AcMo anti-MRP8/14 conjugado con HRP	1 vial 11 ml	B-MRP8/14-EL	Listo para usar
Substrato de TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de parada Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B- STS	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 9

*) Las concentraciones efectivas de los calibradores A a E son 4, 12, 40, 120 y 240 ng/ml de MRP8/14, respectivamente. Para tener en cuenta la dilución (1:100) para los cálculos finales, los calibradores A a E están etiquetados como sigue: 0.4, 1.2, 4.0, 12.0 y 24.0 µg/ml de MRP8/14, respectivamente.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacenar a 2-8°C. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 6 meses a 2-8°C.
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Controles	
Calibradores	
Marcador enzimático	
Substrato de TMB	
Solución de parada	

Tabla 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las tiras de microtitulación, calibradores y controles de este kit contienen componentes de origen humano. Todas las unidades donadas de suero usadas en la preparación de los componentes del kit han sido analizadas por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 10 µl, 100 µl y 1000 µl.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Papel secante.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 10 µl de plasma o suero para la determinación por duplicado.

Plasma EDTA: Recoja la sangre en tubos con EDTA. Centrifugue a 3000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, en un plazo de cuatro horas después de la recoja del plasma. No inactive las muestras con calor. Las muestras pueden conservarse a 2 - 8 °C hasta 30 días. Si las muestras se conservan durante un período más prolongado, se mantienen estables a ≤ -20 °C durante un período mínimo de seis meses.

Suero: Recoja la sangre en tubos simples, evite la hemólisis, mezcle la inversión suave del tubo de ensayo varias veces, y deje que coagule 45 minutos a temperatura ambiente (18 a 28 °C), protegido de la luz. Centrifugue a 1800 x g durante 15 minutos, a temperatura ambiente (18 a 28° C), y recoja inmediatamente el suero. No inactive las muestras con calor. Las muestras pueden conservarse a 2 - 8 °C hasta 30 días. Si las muestras se conservan durante un período más prolongado, se mantienen estables a ≤ -20 °C durante un período mínimo de seis meses.

Las muestras lipémicas, hemolíticas e ictericas no deberán utilizarse en este ensayo. Las muestras lipémicas pueden evitarse si se pide a los pacientes que ayunen por lo menos 12 horas antes de extraer la muestra.

Nota: Es posible la determinación de MRP8/14 en el plasma de muestras de sangre heparinizada o citratada. Tenga en cuenta que los valores normales se afectan ligeramente por el tipo de muestra usado (ver Table 17).

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

- En el procedimiento de ELISA **los pasos de lavado** son esenciales para la garantía de resultados reproductivos. Un **rato mínimo de la incubación por lo menos de 20 segundos** del almacenador intermediario de la colada en los pozos se debe asegurar cada vez.
- Usando una **arandela automatizada**, Bühlmann recomienda fuertemente utilizar un "modo supuesto de la placa" ("plate mode") es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso de proceso siguiente (aspiration). Así, el tiempo mínimo de la incubación está garantizado.
- **Las repeticiones indicadas del lavado son obligatorias** para asegurar resultados reproductivos.
- Asegurar una interacción completa de antígeno/ anticuerpo, **el tiempo de la incubación en el paso 5** no debe ser menos de 30 minutos. Un tiempo moderado más largo de la incubación no tiene ninguna influencia al resultado final.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso y clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Se recomienda ensayar cada control y cada muestra **por duplicado** cada vez que se realice una prueba. Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador E), la muestra debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Deje que los reactivos alcancen 18-28°C antes de utilizarlos.

1. Diluya todas las muestras de suero/plasma del paciente a 1:100 con tampón de incubación (por ejemplo, 10 µl de suero y 990 µl de tampón de incubación) y mézclelo bien. Deje las muestras diluidas durante 15 minutos a 18-28°C antes de pipetear en el paso 4c.
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4a. Pipetee 100 µl de tampón de incubación por duplicado en los pocillos A1+A2.
Pipetee 100 µl de calibrador A en B1+B2.
Pipetee 100 µl de calibrador B en C1+C2.
Pipetee 100 µl de calibrador C en D1+D2.
Pipetee 100 µl de calibrador D en E1+E2.
Pipetee 100 µl de calibrador E en F1+F2.
- 4b. Pipetee 100 µl del Control bajo en G1+G2.
Pipetee 100 µl del Control alto en H1+H2.

- 4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.
 5. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 minutos a 18-28°C (ver Notas del procedimiento).
 6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo (ver Notas del procedimiento). Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
 7. Pipetee 100 µl de marcador enzimático en todos los pocillos.
 8. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28°C.
 9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y **lávelos cinco veces** utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- Importante:** Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.
10. Pipetee 100 µl de solución sustrato de TMB en todos los pocillos.
 11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ± 2 minutos a 18-28°C.
 12. Pipetee 100 µl de solución de parada en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
 13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y del blanco. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Represente la absorbancia (eje vertical) frente a la concentración de MRP8/14 de los calibradores (eje horizontal) utilizando un papel gráfico logarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de las muestras y de los controles. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Localice el valor de la absorbancia corregida de la muestra en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de MRP8/14 en el eje horizontal. **Los resultados incluían ya las diluciones efectuadas durante el procedimiento.**

Véanse Table 11 y Figure 1 para datos típicos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

Dado que no hay Control sérico para MRP8/14 disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo para el control de calidad interno.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo: 4.3 %. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores (suero) de 7 muestras distintas obtenidos cada uno en una única prueba. Se ensayó siguiendo el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 12.

Precisión inter-ensayo: 5.8 %. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de 4 muestras de suero y plasma EDTA, cada una sometida a 20 pruebas diferentes. Se ensayó siguiendo el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 13.

Sensibilidad analítica: <<0.4 µg/ml. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de MRP8/14 se calculó en <<0.4 µg/ml añadiendo dos desviaciones estándar a la absorbancia media y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en una prueba nueva.

Sensibilidad funcional: <0.4 µg/ml. Se ensayaron 8 muestras distintas de suero con valores entre 0,21 y 39.8 µg/ml de MPR8/14 veinte veces cada una por duplicado como en un intra-ensayo. Se calcularon el CV en % y los valores medios de cada muestra. En el gráfico se observó la sensibilidad funcional a un CV del 10%. El perfil de precisión (Figure 2) que resulta permite la medida exacta dentro la gama estándar a partir de 0.4 a 24.0 µg/g.

Linealidad de la dilución: 97.8 %. Se diluyeron dos muestras de suero y plasma EDTA humanos, cada una con valores elevados de MRP8/14, con tampón de incubación y posteriormente se ensayaron siguiendo el procedimiento. Los valores esperados se calcularon a partir del valor observado que se detectó en la primera dilución. Los valores se presentan en Table 14.

Recuperación del spiking: 100.8 %. Se ensayaron dos muestras diluidas de suero y plasma EDTA cada una, antes y después de enriquecerlas con cantidades distintas de MRP8/14 humana. Los valores se presentan en Table 15.

Reacción cruzada: Se midió el tampón de incubación enriquecido con cantidades diferentes de uno de los dos monómeros MRP8 y MRP14 siguiendo el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 16.

VALORES NORMALES

Se determinó MRP8/14 en muestras de plasma EDTA y suero humanos normales, con el uso de muestras de donantes de sangre aparentemente sanos y asintomáticos (varones y mujeres adultos de 18 a 70 años). Se analizaron 56 muestras de plasma EDTA y 93 muestras de suero, según el procedimiento del ensayo, y los resultados se muestran en Table 17.

En el caso del **plasma EDTA**, la mediana es de **0,79 µg/ml**, y el 95º percentil, a una concentración de **2,7 µg/ml**.

En el caso del **suero**, la mediana es de **1,14 µg/ml**, y el 95º percentil, a una concentración de **2,9 µg/ml**.

Un análisis de correlación de 49 muestras de suero y plasma EDTA extraídas de los mismos donantes de sangre, al mismo tiempo, muestra que los valores de plasma EDTA son ligeramente más bajos que las concentraciones de suero (véase Figure 3).

Para la diferenciación de los posibles valores patológicos que sólo están ligeramente aumentados, BÜHLMANN recomienda el uso de plasma EDTA con el cual se han observado variaciones preanalíticas mucho menores.

Nota: Estos valores se han calculado con muestras de plasma con EDTA y de suero de donantes de sangre aparentemente sanos. Debe establecerse un valor umbral clínicamente relevante por cada indicación única por cada laboratorio y estudios adicionales, respectivamente.

Table 11: **Example of Results**

	MRP8/14 Conc. [µg/ml]	Absorb. [OD]	CV Conc [%]
Blank Avg.		0.060	
Cal A	0.4	0.073	
Cal A	0.4	0.070	
Cal A Avg.	0.4	0.072	2.2
Cal B	1.2	0.217	
Cal B	1.2	0.216	
Cal B Avg.	1.2	0.217	0.3
Cal C	4.0	0.669	
Cal C	4.0	0.686	
Cal C Avg.	4.0	0.678	1.7
Cal D	12.0	1.563	
Cal D	12.0	1.547	
Cal D Avg.	12.0	1.555	0.7
Cal D	24.0	2.199	
Cal D	24.0	2.167	
Cal D Avg.	24.0	2.183	1.0
Ctrl Low		0.303	
Ctrl Low		0.302	
Ctrl Low Avg.	1.7	0.303	0.1
Ctrl High		0.997	
Ctrl High		0.958	
Con High Avg.	6.2	0.978	3.5
Serum 1		1.920	
Serum 1		1.881	
Serum 1 Avg.	17.4	1.901	3.0
Plasma 1		0.157	
Plasma 1		0.165	
Plasma 1 Avg.	0.9	0.161	3.5

Figure 1: **Example of a Standard Curve**

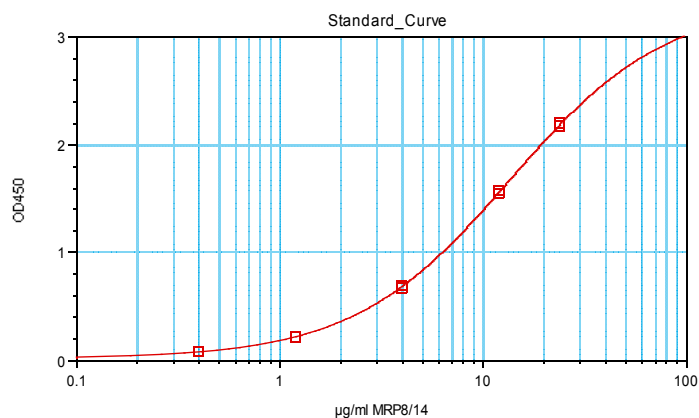


Table 12: **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

Sample	Mean [µg/ml]	SD [µg/ml]	CV [%]
Serum 1	21.64	0.77	3.6
Serum 2	7.46	0.29	3.9
Serum 3	5.76	0.18	3.1
Serum 4	1.46	0.04	2.4
Serum 5	1.01	0.03	3.0
Serum 6	0.51	0.03	6.4
Serum 7	0.21	0.02	7.4
Mean			4.3

Table 13: **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

Sample type	Mean [µg/ml]	SD [µg/ml]	CV [%]
Serum 8	12.1	0.7	5.6
Serum 9	8.2	0.4	4.7
Plasma 1	3.7	0.2	5.5
Plasma 2	0.9	0.1	7.4
Mean			5.8

Figure 2: **Precision Profile**

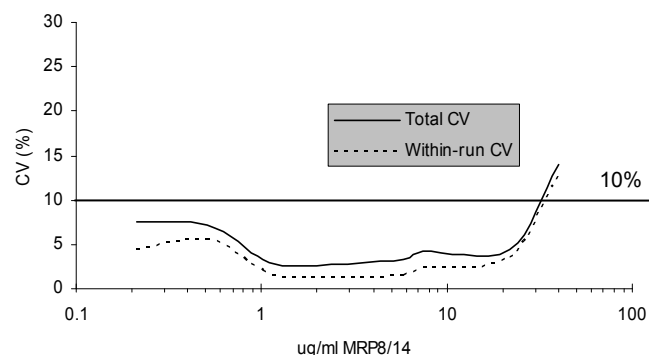


Table 14: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution	Observed [µg/ml]	Expected [µg/ml]	O/E [%]
Serum 10	1:100	23.08	-	--
	1:200	10.76	11.54	93.2
	1:400	4.95	5.77	85.8
	1:800	2.52	2.89	87.3
	1:1600	1.32	1.44	91.5
	1:3200	0.61	0.72	84.6
Serum 11	1:100	7.92	-	--
	1:200	4.10	3.96	103.5
	1:400	2.18	1.98	109.8
	1:800	1.08	0.99	108.6
	1:1600	0.53	0.50	106.7
Plasma 3	1:100	2.49	-	--
	1:200	1.22	1.25	98.0
	1:400	0.60	0.62	96.4
Plasma 4	1:100	4.41	-	--
	1:200	2.20	2.21	99.8
	1:400	1.11	1.10	100.7
	1:800	0.53	0.55	96.1
Mean				97.8

Table 15:

Spiking Recovery

Sample	Basic Value [μg/ml]	Spiked with [μg/ml]	Observed [μg/ml]	Expected [μg/ml]	O/E [%]
Serum 12	0.81	0.2	0.96	1.01	95.0
		1.0	1.95	1.81	107.7
		2.0	2.86	2.81	101.8
		4.0	4.99	4.81	103.7
Serum 13	1.00	0.2	1.03	1.2	85.8
		1.0	1.95	2.0	97.5
		2.0	2.90	3.0	96.7
		4.0	5.44	5.0	108.8
Plasma 5	1.20	0.2	1.42	1.4	101.4
		1.0	2.51	2.2	114.1
		2.0	3.30	3.2	103.1
		4.0	5.30	5.2	101.9
Plasma 6	2.12	0.2	2.29	3.32	98.7
		1.0	3.17	3.12	101.6
		2.0	3.96	4.12	96.1
		4.0	6.01	6.12	98.2
Mean					98.7

Table 16:

Cross Reactivity

Spiked with MRP8	% detected in EK-MRP8/14
100 µg/ml	0.05
10 µg/ml	0.01
1 µg/ml	<0.01
100 ng/ml	<0.01
10 ng/ml	<0.01
1 ng/ml	<0.01

Spiked with MRP14	% detected in EK- MRP8/14
100 µg/ml	0.09
10 µg/ml	0.02
1 µg/ml	<0.01
100 ng/ml	<0.01
10 ng/ml	<0.01
1 ng/ml	<0.01

Table 17:

Normal Values

	EDTA Plasma	Serum
Total (n)	56	93
Range	<0.4-3.7 µg/ml	<0.4-3.9 µg/ml
Mean	1.01 µg/ml	1.42 µg/ml
SD	0.81 µg/ml	0.80 µg/ml
Median	0.79 µg/ml	1.14 µg/ml
IQR	0.79 µg/ml	1.13 µg/ml
95 th Percentile	2.72 µg/ml	2.94 µg/ml

Figure 3:

Comparison Serum vs. EDTA Plasma

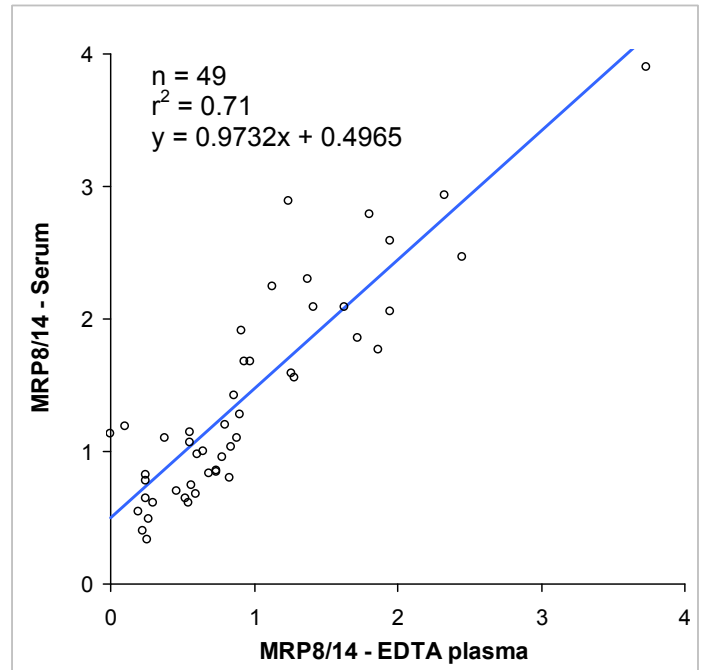


Table description: cf. “Results” (page 3), “Performance Characteristics” (page 3) and “Normal Values” (page 4).

Tabellenbeschreibung: siehe “Resultate” (Seite 6), “Leistungsmerkmale” (Seite 6) und “Normalwerte” (Seite 6).

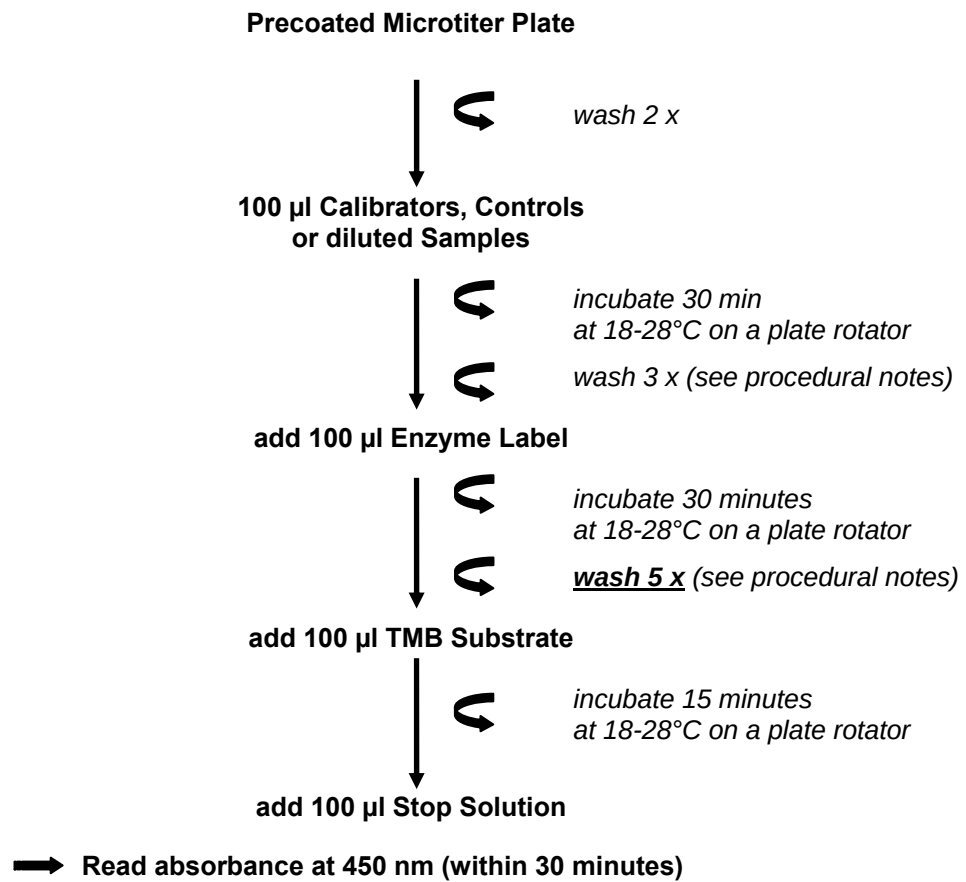
Explications relatives aux tableaux: voir « Résultats » (page 8), « Caractéristiques de Performance » (page 9) et « Valeurs Normales » (page 9).

Descrizione tavola: cf. “Risultati” 11, “Caratteristiche delle Prestazioni” (pagina 12) e “Valori Normali” (pagina 12).

Explicaciones relativas a las tablas: ver “Resultados” (página 14), “Características de Eficiencia” (página 15) y “Valores normales” (página 15).

1. Nacken, W. et al. *S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity*. Microsc Res Tech 60(6), 569-80 (2003)
2. Altwegg L.A. et al. *Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes*. Eur Heart J **28(8)**,941-8 (2007)
3. Healy A.M. et al. *Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein 14 as a novel determinant of cardiovascular events*. Circulation **113**, 2278-84 (2006)
4. Burkhardt, K., et al. *An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection*. J Am Soc Nephrol **12**, 1947-57 (2001).
5. Striz, I., et al. *MRP 8/14 and procalcitonin serum levels in organ transplantations*. Ann Transplant **6**, 6-9 (2001)
6. Hessian, P.A. and Fisher, L. *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure*. Eur J Biochem **268**, 353-63 (2001).
7. Goebeler, M., et al. *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation **58**, 355-61 (1994).
8. Zwadlo et al. *A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues*. J Immunol **137**, 512-8 (1986)

MRP8/14 ELISA



TIME TO RESULT: 75 MINUTES

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de Temperature Limiti di temperature Límite de temperatura
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASCH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
CAL A – CAL E	Calibrator A-E Kalibrator A-E Calibrateur A-E Calibratore A-E Calibrador A-E
CONTROL SL	Control Serum Low Kontrollserum tief Contrôles sériques bas Siero di controllo basso Control sérico bajo
CONTROL SH	Control Serum High Kontrollserum hoch Contrôles sériques élevé Siero di controllo alto Control sérico alto
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2010-03-09

Not for sale in the USA for use with stool and gastrointestinal tract samples/faeces and not for use in gastrointestinal diseases, due to current patent restrictions.