

S100A8/S100A9 ELISA Kit

***Zur Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin, Gewebeextrakt, Zellkulturüberstand
Für Tier-experimentelle Studien (Maus, Ratte; nicht für humanes Probenmaterial geeignet)***

S100A8/S100A9 ELISA Kit

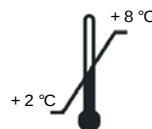
***For the determination of S100A8/S100A9 S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract, cell culture supernatant
For animal experimental studies (mouse, rat; not suitable for human samples)***

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 12.05.2010



K 6936



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin, Gewebeextrakt und Zellkulturüberstand geeignet. Nur für wissenschaftliche Zwecke.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10

Calgranulin B: MRP14, S100A9

Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist ein Calcium-bindendes Protein, das von Neutrophilen und Monozyten gebildet wird. Fäkales S100A8/S100A9 ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher und neoplastischer Genese.

Die Unterscheidung zwischen Patienten mit Colon irritabel und solchen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) fällt häufig schwer. Dies führt zu vielen nicht notwendigen Koloskopien. Mittels des S100A8/S100A9-Tests können diese beiden Patientengruppen jetzt deutlich voneinander unterschieden werden. Der Nachweis aus dem Stuhl korreliert sehr gut mit den histologischen und endoskopischen Befunden der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sowie mit dem bisherigen „Gold-Standard“ für die Aktivitätsbeurteilung bei CED, der Messung der fäkalen Exkretion 111-Indium-markierter neutrophiler Granulozyten. Der Indium-111-Granulozytentest ist jedoch kostenintensiv (Krankenhausaufenthalt, Isotopenbestimmung und Entsorgung) und durch die Radioaktivität belastend für die Patienten. Eine wiederholte Anwendung bei Kindern und Schwangeren ist daher nicht empfehlenswert.

Im Gegensatz zu den bisherigen Standardmarkern für entzündliche Vorgänge (CRP, ESR, HB) zeigen erhöhte S100A8/S100A9-Werte mit größerer Sicherheit ein Rezidiv an. S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist damit ein idealer Verlaufsmarker, z.B. bei M. Crohn oder nach Polypenabtragung. Vergleichende Messungen von S100A8/S100A9 und okkultem Blut zum Nachweis des Kolonkarzinoms ergaben einen eindeutigen diagnostischen Vorteil für S100A8/S100A9. Der Parameter hat eine hohe negative prädiktive Aussagekraft: Ist der S100A8/S100A9-Spiegel im Stuhl niedrig, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung des Intestinaltrakts vor.

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6936MTP	PLATE	Mikrotitermodul	12 x 8 Vertiefungen
K 6936WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6936EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	90 ml
K 6936A2	AB	Detektionsantikörper (monoklonaler anti-S100A8/S100A9 (MRP 8/14)), lyophilisiert	450 µl
K 6936ST	STD	S100A8/S100A9 Standards, lyophilisiert (0; 0.25; 0.98; 3.9; 15.6 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6936KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6936K	CONJ	Konjugat (anti-Maus, Peroxidase-markiert), Konzentrat	200 µl
K 6936TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6936AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2.5** mit aqua bidest. verdünnt werden (90 ml EXBUF + 135 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist **3 Monate** in einem geschlossenen Gefäß bei **2-8 °C** haltbar.

- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrolle können 4 Wochen bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Der lyophilisierte **AB** (Detektionsantikörper) ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der lyophilisierte **AB** (Detektionsantikörper) wird mit **450 µl verdünntem Waschpuffer** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. Der rekonstituierte Detektionsantikörper wird **1:400 in Waschpuffer** weiter verdünnt (25 µl rekonstituierter Detektionsantikörper + 10 ml Waschpuffer). **Der rekonstituierte Detektionsantikörper ist bei -20° C 4 Wochen lang stabil. Verdünnte Detektionsantikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt, z. B.: 10 µl CONJ + 990 µl Waschpuffer, mischen. **100 µl der pro Well werden im Test eingesetzt.** Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Kotproben

Die Probe wird **1:50** in Extraktionspuffer resuspendiert und bei 13000 g für 5 Min zentrifugiert.

100 µl des Überstandes pro Vertiefung im Test einsetzen.

Serumproben

Die Proben werden vor dem Einsatz im Test **1:100** mit Waschpuffer verdünnt.

100 µl der Verdünnung pro Vertiefung im Test einsetzen.

Urinproben

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:3** mit Waschpuffer verdünnt werden.

100 µl der Verdünnung pro Vertiefung im Test einsetzen.

Zellkulturüberstand

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:2** mit Waschpuffer verdünnt werden. Das Medium als Leerwert mitbestimmen.

100 µl der Verdünnung pro Vertiefung im Test einsetzen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die S100A8/S100A9 erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf S100A8/S100A9 zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit hochaffinen anti-S100A8/S100A9 Antikörpern beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das S100A8/S100A9 aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Im nächsten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper, ein monoklonaler anti-S100A8/S100A9 Antikörper, an das S100A8/S100A9 gebunden. Dann wird das Konjugat (Anti-Maus, Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - S100A8/S100A9 – Detektionsantikörper - Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem S100A8/S100A9-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2. Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 100 µl AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**

10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
15. 5 - 15 Min. bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
16. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
17. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

* Die Intensität der Farbentwicklung ist Temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

**Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne schütteln.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Der ermittelte Wert wird mit **50** multipliziert.

Serumproben

Der ermittelte Wert wird mit **100** multipliziert.

Urin und Zellkulturüberstand

Der ermittelte Wert wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die Testergebnisse stellen nur Relativwerte dar, da keine Daten über die Kreuzreaktivität vorliegen.

9. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 3 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Mittelwert [OD]	Standardab- weichung (SD)	Nachweis- grenze [ng/ml]
1	0,014	0,003	0,076

10. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für wissenschaftliche Zwecke.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

11. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.

- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

S100A8/S100A9 ELISA Kit

*For the determination of S100A8/S100A9 S100A8/S100A9
(Calprotectin, MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue
extract, cell culture supernatant*

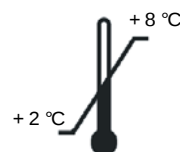
*For animal experimental studies (mouse, rat; not suitable for
human samples)*

For research use only

Valid from 12.05.2010



K 6936



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP (8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract and cell culture supernatant. For research use only.

2. INTRODUCTION

Alternative names:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP (8/14) is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. Fecal S100A8/S100A9 is a marker for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases.

It is often difficult to distinguish between irritable bowel syndrome and chronic inflammatory bowel disease. This leads in many cases to extensive and unnecessary colonoscopic examinations. The S100A8/S100A9 test allows clear differentiation between the two patient groups. Fecal S100A8/S100A9 levels correlate significantly with histological and endoscopic assessment of disease activity in Morbus Crohn's disease and ulcerative colitis as well as with the fecal excretion of indium-111-labelled neutrophilic granulocytes that has been suggested as the "gold standard" of disease activity in inflammatory bowel disease. However, measuring 111-indium-labeled granulocytes is very costly (patient's hospitalization, analysis and disposal of isotopic material) and is connected with radioactive exposition of the patients. For this reason, a repeated application to children and pregnant women is not recommended.

Elevated levels of S100A8/S100A9 are a much better predictor of relapse than standard inflammatory markers (CRP, ESR HB). Comparing this marker with standard fecal occult blood screening in colorectal cancer demonstrates clearly the diagnostic advantages of the fecal S100A8/S100A9 test. The parameter is of a high diagnostic value: If the S100A8/S100A9 level in stool is low, there is a high probability that an organic disease does not exist.

Indication

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6936MTP	PLATE	One holder with strips	12 x 8 wells
K 6936WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6936EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5x	90 ml
K 6936A2	AB	Detection antibody, (monoclonal anti-S100A8/S100A9 (MRP 8/14) antibody), lyophilized	450 µl
K 6936ST	STD	S100A8/S100A9 standards, lyophilized (0; 0.25; 0.98; 3.9; 15.6 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6936KO	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6936K	CONJ	Conjugate (anti-mouse, peroxidase labeled), concentrate	200 µl
K 6936TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6936AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with aqua bidist. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be at 37°C in a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) must be diluted with aqua bidist. **1:2.5** before use (90 ml EXBUF + 135 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37°C in a water bath. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for three months.**

- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control can be stored at 2-8°C for four weeks.**
- The lyophilized **AB** (detection antibody) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. The lyophilized **AB** (detection antibody) must be reconstituted with **450 µl diluted wash buffer**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The reconstituted detection antibody must be further diluted **1:400 in wash buffer** (25 µl reconstituted detection antibody + 10 ml wash buffer). **The reconstituted detection antibody is stable at -20°C up to 4 weeks. Diluted detection antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100 in wash buffer**, e. g.: 10 µl CONJ + 990 µl wash buffer, mix. **100 µl of diluted conjugate per well are used in the assay.** The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date given on the label when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Stool samples

Each sample must be suspended **1:50** in extraction buffer and centrifuged for 5 minutes at 13000 g.

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant per well.

Serum samples

Samples should be diluted **1:100** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Urine samples

Samples should be diluted at least **1:3** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Cell culture supernatants

Samples should be diluted at least **1:2** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

7. ASSAY PROCEDURE*Principle of the test*

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two selected antibodies that bind to S100A8/S100A9.

Standards, controls and diluted samples which are assayed for S100A8/S100A9 are added to wells of microplate coated with high affine anti-S100A8/S100A9 antibodies. During the first incubation step, S100A8/S100A9 in the samples is bound by the immobilized antibodies. In a next incubation step, a monoclonal anti-S100A8/S100A9 antibody is added to each microtiter well. Then a peroxidase labeled anti-mouse conjugate is pipetted into each well and the following complex is formed: capture antibodies - S100A8/S100A9 – detection antibody - Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the S100A8/S100A9 concentration of the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. S100A8/S100A9 present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate on a protocol sheet
3. Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
7. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
8. Add 100 µl AB (detection antibody) into each well
9. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**

10. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11. Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well
12. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
13. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
14. Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
15. Incubate for 5 - 15 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
16. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
17. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

**The above incubation steps at 37 °C on a horizontal mixer are recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 37 °C, while shaking, we recommend to incubate at 37 °C without any shaking.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool samples

To obtain the concentration, the result must be multiplied by **50**.

Serum samples

To obtain the concentration, the result must be multiplied by **100**.

Urine and Cell culture supernatants

To obtain the concentration, the result must be multiplied by the corresponding dilution factor.

The test results represent only relative values, as there are no data on the cross reactivity.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

Serum and EDTA Plasma samples

The sensitivity was set as $B_0 + 3 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0,014	0,003	0,076

10. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

11. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.

-
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number