

# S100A12 ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von S100A12 in Stuhl*

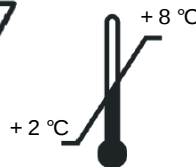
# S100A12 ELISA Kit

*For the in vitro determination of S100A12 in stool*

Gültig ab / valid from 08.11.2010



**K 6938**



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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von S100A12 in Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Alternative Namen: Calgranulin C, EN-RAGE

Die Mitglieder der S100-Proteinfamilie sind niedermolekulare saure Proteine die durch Zelltyp-spezifische Expression sowie zwei Kalziumbindungsmotive (EF-Hände) charakterisiert sind. S100 Proteine bzw. Calgranuline werden von aktivierten Granulozyten im entzündeten Gewebe freigesetzt. Ferner wird eine erhöhte Expression auf infiltrierenden Monozyten und Granulozyten bei chronischen Entzündungen beobachtet. Hofmann et al. (1999) identifizierten RAGE (RAGE=Receptor for Advanced Glycation End products) als Hauptrezeptor für S100A12 und die Mitglieder der S100/Calgranulin Superfamilie und gaben S100A12 den Namen EN-RAGE (Extracellular Newly identified RAGE-binding protein). Interaktion von S100A12 mit zellulärem RAGE auf Endothelzellen, mononuklearen Phagozyten und Lymphozyten führt zu Zellaktivierung und Freisetzung von proinflammatorischen Schlüsselmediatoren. Die Inhibition von S100A12 in Mausmodellen führt zur Minderung der verzögerten Hypersensitivität und der entzündlichen Colitis durch Blockade der Signaltransduktionsaktivierung bzw. der Expression von entzündlichen Mediatoren.

Kaiser et al. (2007) ermittelten die S100A12 Konzentration im Stuhl von 171 Patienten mit verschiedenen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Reizdarmsyndrom und Magen-Darm-Infekten und von 24 gesunden Teilnehmern. Patienten, die an einer chronischen Entzündung des Darms erkrankt waren, wiesen deutlich mehr S100A12 auf als diejenigen, die unter einem Reizdarmsyndrom litten oder gesund waren. Der S100A12 Gehalt im Stuhl korrelierte mit dem Ausmaß der intestinalen Entzündung.

Faecales S100A12 ist ein neuer, nicht invasiver Marker, der die Darmentzündung vom Reizdarmsyndrom und gesundem Darm mit hoher Sensitivität und Spezifität unterscheiden kann. Die S100A12 Konzentration im Stuhl kann als Indikator für Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dienen. Da S100A12 von aktivierten Neutrophilen sezerniert wird, und als proinflammatorischer Mediator wirkt, bietet es sich als Marker für Diagnose und Therapiekontrolle bei entzündlichen Darmerkrankungen.

### Indikationen

- Entzündungsmarker für akute entzündliche Erkrankungen
- Bewertung des Schweregrads einer Entzündung
- Verlaufsparemeter bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Artikel Nr. | Inhalt    | Kit Komponenten                                                               | Menge                  |
|-------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| K 6938MTP   | PLATE     | Mikrotitermodul, vorbeschichtet                                               | 12 x 8<br>Vertiefungen |
| K 6938WP    | WASHBUF   | ELISA Waschpufferkonzentrat 10x                                               | 1 x 100 ml             |
| K 6938EP    | EXBUF     | Extraktionspufferkonzentrat 2,5x                                              | 2 x 100 ml             |
| K 6938PV    | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer,<br>gebrauchsfertig                                   | 1 x 100 ml             |
| K 6938ST    | STD       | S100A12 Standards, lyophilisiert<br>(0; 0.22; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml) | 2 x 7 vials            |
| K 6938KO1   | CTRL      | Kontrolle, lyophilisiert<br>(Bereich der Spezifikation entnehmen)             | 2 x 1 vial             |
| K 6938KO2   | CTRL      | Kontrolle, lyophilisiert<br>(Bereich der Spezifikation entnehmen)             | 2 x 1 vial             |
| K 6938K     | CONJ      | Konjugat                                                                      | 200 µl                 |
| K 6938TMB   | SUB       | TMB Substrat (Tetramethylbenzidin),<br>gebrauchsfertig                        | 15 ml                  |
| K 6938AC    | 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
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 13000 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.
- Der **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 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.
- Der **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2.5** mit aqua bidest. verdünnt werden (100 ml EXBUF + 150 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** (Kontrollen) sind bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **aqua bidest.** rekonstituiert (**Rekonstitutionsvolumen, siehe entsprechende Produktspezifikation**), vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** mit verdünntem Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 9.9 ml Waschpuffer). **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

### *Stuhlprobenextraktion*

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 10 745804 332) verwendet, das **100 mg Stuhlprobe** dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in **5 ml EXBUF** (Extraktionspuffer) suspendiert.

**Puffervolumen konstant: 5 ml**

**Verdünnungsfaktor konstant: 1:50**

2. Alternativ kann eine Stuhlprobenmasse im Bereich von 80 - 120 mg manuell eingewogen werden. Bitte die exakte Menge für jede Probe notieren!
- a. Jede einzelne Probe wird in **5 ml EXBUF** unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

**Puffervolumen konstant: 5 ml**

**Der Verdünnungsfaktor ändert sich** entsprechend der Einwaage. Er kann der folgenden Tabelle entnommen werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

| Einwaage<br>[mg] | Verdünnungs-<br>faktor |
|------------------|------------------------|
| 80               | 62.5                   |
| 82               | 60.9                   |
| 84               | 59.5                   |
| 86               | 58.1                   |
| 88               | 56.8                   |
| 90               | 55.6                   |
| 92               | 54.3                   |
| 94               | 53.2                   |
| 96               | 52.1                   |
| 98               | 51.0                   |
| <b>100</b>       | <b>50</b>              |

| Einwaage<br>[mg] | Verdünnungs-<br>faktor |
|------------------|------------------------|
| 102              | 49.0                   |
| 104              | 48.1                   |
| 106              | 47.2                   |
| 108              | 46.3                   |
| 110              | 45.5                   |
| 112              | 44.6                   |
| 114              | 43.9                   |
| 116              | 43.1                   |
| 118              | 42.4                   |
| 120              | 41.6                   |

- b. **Die Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

### Puffervolumen variabel

#### Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

| Einwaage [mg] | Puffervolumen [ml] |
|---------------|--------------------|
| 80            | 4.0                |
| 82            | 4.1                |
| 84            | 4.2                |
| 86            | 4.3                |
| 88            | 4.4                |
| 90            | 4.5                |
| 92            | 4.6                |
| 94            | 4.7                |
| 96            | 4.8                |
| 98            | 4.9                |
| <b>100</b>    | <b>5.0</b>         |

| Einwaage [mg] | Puffervolumen [ml] |
|---------------|--------------------|
| 102           | 5.1                |
| 104           | 5.2                |
| 106           | 5.3                |
| 108           | 5.4                |
| 110           | 5.5                |
| 112           | 5.6                |
| 114           | 5.7                |
| 116           | 5.8                |
| 118           | 5.9                |
| 120           | 6.0                |

Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension (**Verdünnung I**) in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert.

## Probenverdünnung

### Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1:50 mit SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt. Zum Beispiel:

20 µl Überstand (Verdünnung I) + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50 (**Verdünnung II**)

### Endverdünnung: 1:2500

Im Test werden **100 µl** der Verdünnung II pro Vertiefung eingesetzt.

Wir empfehlen die extrahierten Proben (Verdünnung I) nicht länger als 24 Stunden bei 2-8 °C zu lagern. Die extrahierten Proben können nicht eingefroren gelagert werden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Der S100A12 ELISA Kit basiert auf der quantitativen Sandwich-ELISA Technik. Die Mikrotiterplatte ist mit einem hochspezifischen monoklonalen anti-humanen S100A12 Antikörper beschichtet. Teststandards, Kontrollen und Proben, die auf S100A12 zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert, wobei das S100A12 von dem immobilisierten Antikörper gebunden wird. Nach Auswaschen aller nicht gebundenen Substanzen wird Peroxidase-markiertes Konjugat, (polyklonale anti-S100A12 Antikörper) in die Vertiefungen pipettiert. Nach dem zweiten Waschschrift zur Entfernung des ungebundenen Konjugats, wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin pipettiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Die entstandene gelbe Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem S100A12-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 <b>Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur</b> (18-26°C) bringen, gut mischen                                                                                                         |
| 2. Positionen für <b>STD/SAMPLE/CTRL</b> (Standard/Probe/Kontrollen) in Doppelbestimmung im Protokollblatt <b>markieren</b>                                                                            |
| 3. <b>Benötigte Mikrotiterstreifen</b> aus dem Kit <b>nehmen</b> . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden               |
| 4. Mikrotiterstreifen <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen                    |
| 5. <b>100 µl STD /SAMPLE/CTRL</b> (Standard/Probe/Kontrollen) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren                                                                                |
| 6. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (18-26°C) unter Schütteln inkubieren                                                                                                       |
| 7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen |
| 8. <b>100 µl CONJ</b> (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren                                                                                                                                      |
| 9. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (18-26°C) unter Schütteln inkubieren                                                                                                       |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen                                                                                                                                                               |
| 11. <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 12. <b>10 - 20 Min.</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 13. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14. <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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.

## 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. 0.001).

### 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. 0.001).

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

Die ermittelte S100A12 Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

### **Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 1:50**

Zur Bestimmung der Konzentration im Stuhl wird die ermittelte S100A12 Konzentration mit **2500** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II).

### **Probenvorbereitung 2a: Verdünnungsfaktor ist variabel.**

Der entsprechende Verdünnungsfaktor jeder Probe wird der Tabelle entnommen und mit 50 (Verdünnungsstufe II) multipliziert und mit der ermittelten S100A12 Konzentration multipliziert.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Stuhlproben mit hohen S100A12 Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit SAMPLEBUF verdünnt und nochmals bestimmt.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereichs, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

| Intra-Assay (n=16) |                 |        |
|--------------------|-----------------|--------|
| Probe              | S100A12 [ng/ml] | VK [%] |
| 1                  | 3718.4          | 7.1    |
| 2                  | 918.3           | 3.5    |

| Inter-Assay (n=22) |                 |        |
|--------------------|-----------------|--------|
| Probe              | S100A12 [ng/ml] | VK [%] |
| 1                  | 3003.64         | 15.42  |
| 2                  | 1363.49         | 20.18  |

### *Wiederfindung*

Zwei Proben wurden mit 2 unterschiedlichen S100A12 Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

| Probe | Spike [ng/ml] | S100A12 erwartet [ng/ml] | S100A12 gemessen [ng/ml] |
|-------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| 1     | 0.56          | 0.892                    | 0.803                    |
| 1     | 0.28          | 0.602                    | 0.56                     |
| 2     | 1.125         | 1.642                    | 1.701                    |
| 2     | 0.56          | 1.077                    | 0.98                     |

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 1 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 10 mal der Standard null.

| Probe | S100A12 Mittelwert [OD] | Standardabweichung (SD) | Nachweisgrenze [ng/ml] |
|-------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1     | 0.011                   | 0.0008                  | 0.016*                 |

\*Entspricht einer Konzentration von 39.6 ng/l bei Berücksichtigung der Stuhlprobenverdünnung von 1 : 2500.

### Linearität

Zwei Patientenproben wurden mit Waschpuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

| Probe | Verdünnung | Erwartet [ng/ml] | Gemessen [ng/ml] |
|-------|------------|------------------|------------------|
| P1    | 1:2500     | 8797.3           | 8797.3           |
|       | 1:5000     | 4399             | 4239.8           |
|       | 1:10000    | 2199.5           | 1986             |
| P2    | 1:2500     | 2016.1           | 2016.1           |
|       | 1:5000     | 1008             | 932.2            |
|       | 1:10000    | 504              | 362              |

## 12. LITERATUR

1. Hofmann MA, Drury S; Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach, D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**: 889-901, 1999
2. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, Zolg W. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;6(10):1122-8.
3. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):183-92.
4. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;14(3):359-66.
5. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J, Foell D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;56:1706-1713
6. de Jong Naomi SH, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: A Novel Noninvasive Marker in Children with Crohn`s Disease. *Inflamm Bowel Dis*. July 2006;12(7):566–572

## 13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

## 14. 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.

## 15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik 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



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

**Manual**

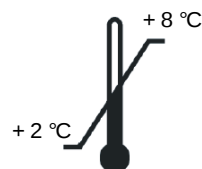
# S100A12 ELISA Kit

*For the in vitro determination of S100A12 in stool*

Valid from 08.11.2010



**K 6938**



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of S100A12 in stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Alternative names: Calgranulin C, EN-RAGE

Members of the S100 protein family are low molecular mass acidic proteins characterized by cell-type-specific expression and the presence of 2 EF-hand calcium-binding domains. The S100 proteins or calgranulins are expressed in activated granulocytes under conditions of chronic inflammation. Hofmann et al. (1999) reported that RAGE is a central cell surface receptor for S100A12, which they referred to as EN-RAGE (Extracellular Newly identified RAGE-binding protein), and related members of the S100/calgranulin super family. Interaction of S100A12 with cellular RAGE on endothelium, mononuclear phagocytes, and lymphocytes triggered cellular activation, with generation of key pro-inflammatory mediators. In murine models, blockade of S100A12 quenched delayed-type hypersensitivity and inflammatory colitis by arresting activation of central signaling pathways and expression of inflammatory mediators.

Kaiser et al. (2007) determined the S100A12 concentration in stool samples of 171 patients suffering from infectious gastroenteritis, Crohn's disease, ulcerative colitis or irritable bowel syndrome and 24 healthy controls. Faecal S100A12 correlated with the degree of intestinal inflammation. Patients with inflammatory bowel disease had significantly higher S100A12 levels compared to these with irritable bowel syndrome or healthy controls. The S100A12 content in stool correlated with the degree of intestinal inflammation.

Faecal S100A12 is a novel non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS) or healthy individuals with a high sensitivity and specificity. S100A12 stool concentrations can be used as an indicator of inflammation activity in Morbus Crohn's disease and Colitis ulcerosa. Since S100A12 is secreted by activated neutrophils and acts as a pro-inflammatory mediator, it can be used as marker for diagnosis and therapeutic control of inflammatory bowel diseases.

### Indication

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree
- Parameter for monitoring Morbus Crohn's disease and Colitis ulcerosa

### 3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No   | Content   | Kit Components                                                              | Quantity     |
|-----------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| K 6938MTP | PLATE     | One holder with precoated strips                                            | 12 x 8 wells |
| K 6938WP  | WASHBUF   | ELISA wash buffer concentrate 10x                                           | 1 x 100 ml   |
| K 6938EP  | EXBUF     | Extraction buffer concentrate 2,5x                                          | 2 x 100 ml   |
| K 6938PV  | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer, ready-to-use                                        | 1 x 100 ml   |
| K 6938ST  | STD       | S100A12 standards, lyophilized<br>(0; 0.22; 0.66; 2.0; 6.0; 18.0; 54 ng/ml) | 2 x 7 vials  |
| K 6938KO1 | CTRL      | Control, lyophilized<br>(see specification for range)                       | 2 x 1 vial   |
| K 6938KO2 | CTRL      | Control, lyophilized<br>(see specification for range)                       | 2 x 1 vial   |
| K 6938K   | CONJ      | Conjugate                                                                   | 200 µl       |
| K 6938TMB | SUB       | TMB substrate (Tetramethylbenzidine),<br>ready to use                       | 15 ml        |
| K 6938AC  | 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
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 13000 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 **WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved 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 (100 ml EXBUF + 150 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** (controls) are stable **at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **aqua bidest. (reconstitution volume, see product specification)**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards are not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100** in diluted wash buffer (100 µl CONJ + 9.9 ml diluted wash buffer). **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

### *Extraction of the stool sample*

We recommend the following sample preparation:

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing **100 mg of stool sample** (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 10 745804 332). The stool sample must be suspended in **5 ml EXBUF** (extraction buffer).

**Constant buffer volume: 5 ml**

**Constant dilution factor: 1:50**

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
  - a. Add **5 ml EXBUF** to the stool sample not depending on the sample amount.

**Constant buffer volume: 5 ml**

**The dilution factor varies** depending on the sample amount which has to be considered in the subsequent calculations. Please have a look at the table for the correction factors below:

| Weight [mg] | Dilution factor |
|-------------|-----------------|
| 80          | 62.5            |
| 82          | 60.9            |
| 84          | 59.5            |
| 86          | 58.1            |
| 88          | 56.8            |
| 90          | 55.6            |
| 92          | 54.3            |
| 94          | 53.2            |
| 96          | 52.1            |
| 98          | 51.0            |
| <b>100</b>  | <b>50</b>       |

| Weight [mg] | Dilution factor |
|-------------|-----------------|
| 102         | 49.0            |
| 104         | 48.1            |
| 106         | 47.2            |
| 108         | 46.3            |
| 110         | 45.5            |
| 112         | 44.6            |
| 114         | 43.9            |
| 116         | 43.1            |
| 118         | 42.4            |
| 120         | 41.6            |

b. **The buffer volume** for the individual samples varies depending on the sample amount (see table). The dilution factor remains constant.

### Variable buffer volume

#### Constant dilution factor: 1:50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results .

| Weight [mg] | Buffer Volume [ml] |
|-------------|--------------------|
| 80          | 4.0                |
| 82          | 4.1                |
| 84          | 4.2                |
| 86          | 4.3                |
| 88          | 4.4                |
| 90          | 4.5                |
| 92          | 4.6                |
| 94          | 4.7                |
| 96          | 4.8                |
| 98          | 4.9                |
| <b>100</b>  | <b>5.0</b>         |

| Weight [mg] | Buffer Volume [ml] |
|-------------|--------------------|
| 102         | 5.1                |
| 104         | 5.2                |
| 106         | 5.3                |
| 108         | 5.4                |
| 110         | 5.5                |
| 112         | 5.6                |
| 114         | 5.7                |
| 116         | 5.8                |
| 118         | 5.9                |
| 120         | 6.0                |

After  
buffer  
deposition  
consistency.

Transfer ca. 1 ml stool suspension (**dilution step I**) to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm (= 13000 g).

## Dilution of samples

### Stool samples

The supernatant of the extraction (dilution step I) is diluted **1:50 with SAMPLEBUF** (Sample dilution buffer). For example:

20 µl supernatant (dilution I) + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50 (**dilution step II**)

### Final dilution: 1:2500

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

We recommend to store the extracted samples (dilution step I) for no longer than 24 h at 2-8 °C. The extracted samples are not stable and cannot be frozen and stored for later use.

## **7. ASSAY PROCEDURE**

### *Principle of the test*

The S100A12 ELISA Kit employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique.

A monoclonal antibody specific for S100A12 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and the immobilized antibody binds any S100A12 present. After washing away any unbound substances, an HRP-conjugated polyclonal antibody specific for S100A12 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody HRP-conjugate, the remaining conjugate is allowed to react with the HRP substrate tetramethylbenzidine. The reaction is stopped by addition of acidic solution and absorbance of the resulting yellow product is measured at 450 nm. The absorbance is proportional to the concentration of S100A12. A standard curve is constructed by plotting absorbance values versus S100A12 concentrations of calibrators, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

### Test procedure

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

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10. Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper                                                                                                                                  |
| 11. Add <b>100 µl of SUB</b> (substrate) into each well                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 12. Incubate for <b>10 - 20 minutes at room temperature</b> (18-26°C) in the dark*                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 13. Add <b>50 µl of STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14. Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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.

## 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. 0.001).

### 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. 0.001).

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 S100A12 concentration in stool samples, multiply the estimated value by the dilution factor according to the sample preparation:

**Sample preparation 1 and 2b:      dilution factor constant :      1 : 50**

Multiply the obtained result by **2500** (dilution step I x dilution step II) to get the final concentration.

**Sample preparation 2a:                      dilution factor is variable**

The corresponding dilution factor is taken from the table and should be multiplied by 50 (dilution step II) to get the final concentration.

## 9. LIMITATIONS

Stool samples with S100A12 levels greater than the highest standard value, should be diluted with SAMPLEBUF, and be re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

| Intra-Assay (n=16) |                 |        |
|--------------------|-----------------|--------|
| Sample             | S100A12 [ng/ml] | VK [%] |
| 1                  | 3718.4          | 7.1    |
| 2                  | 918.3           | 3.5    |

| Inter-Assay (n=22) |                 |        |
|--------------------|-----------------|--------|
| Sample             | S100A12 [ng/ml] | VK [%] |
| 1                  | 3003.64         | 15.42  |
| 2                  | 1363.49         | 20.18  |

### *Recovery*

Two samples were spiked with 2 different S100A12 standards and measured using this assay.

n=2

| Sample | Spike [ng/ml] | S100A12 expected [ng/ml] | S100A12 measured [ng/ml] |
|--------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| 1      | 0.56          | 0.892                    | 0.803                    |
| 1      | 0.28          | 0.602                    | 0.56                     |
| 2      | 1.125         | 1.642                    | 1.701                    |
| 2      | 0.56          | 1.077                    | 0.98                     |

## Sensitivity

The sensitivity was set as  $B_0 + 1SD$ . The zero-standard was measured 10 times.

| Sample | S100A12 mean value [OD] | Standard variation (SD) | Detection limit [ng/ml] |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1      | 0.011                   | 0.0008                  | 0.016*                  |

\* Corresponds to a concentration of 39.6 ng/l at a stool sample dilution of 1 : 2500.

## Linearity

Two patient samples were diluted with wash buffer and analyzed. The results are shown below:

n= 2

| Sample | Dilution | Expected [ng/ml] | Measured [ng/ml] |
|--------|----------|------------------|------------------|
| P1     | 1:2500   | 8797.3           | 8797.3           |
|        | 1:5000   | 4399             | 4239.8           |
|        | 1:10000  | 2199.5           | 1986             |
| P2     | 1:2500   | 2016.1           | 2016.1           |
|        | 1:5000   | 1008             | 932.2            |
|        | 1:10000  | 504              | 362              |

## 12. REFERENCES

1. Hofmann MA, Drury S; Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach, D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**: 889-901, 1999
2. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, Zolg W. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;6(10):1122-8.
3. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):183-92.
4. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;14(3):359-66.
5. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J, Foell D. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;56:1706-1713
6. de Jong Naomi SH, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: A Novel Noninvasive Marker in Children with Crohn`s Disease. *Inflamm Bowel Dis*. July 2006;12(7):566–572

## 13. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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.

## 14. 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 colourless 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.

## 15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic 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



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number