



Gebrauchsanweisung

Calretinin ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Calretinin
in humanem EDTA-Plasma und Serum

CE

IVD

REF CR00

Σ 96

 2 – 8 °C



WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Inhaltsverzeichnis

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

Verwendete Symbole

 In-Vitro-Diagnostikum

 CE markiert

 Inhalt

 Verwendbar bis

 Chargenbezeichnung

 Temperaturbegrenzung

 Hersteller

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Bestellnummer

 Gebrauchsanweisung beachten

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

1. Einführung und Testprinzip

Seit längerer Zeit ist in mehr als 55 Ländern der Welt die Produktion und Verwendung von Asbest verboten. Trotzdem ist die Zahl der asbestbedingten Krebserkrankungen – in erster Linie bösartige Lungentumoren und Mesotheliome – weiterhin sehr hoch.

Aufgrund der langen Latenzzeit sowie der fortlaufenden Produktion und Verwendung von Asbest in mehreren Ländern wird hier in den nächsten Jahren keine wesentliche Verbesserung erwartet. Durch eine Früherkennung der Tumoren – möglichst in klinisch symptomfreien Entwicklungsstadien – könnten die Chancen einer kurativen Therapie wesentlich gesteigert werden.

In Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr Universität Bochum (IPA) hat die DLD Diagnostika GmbH jetzt eine vielversprechende Methode für den Einsatz des Biomarkers Calretinin zur Früherkennung – speziell von Mesotheliomen – in Plasma- und Serumproben entwickelt. Calretinin (Calbindin 2, *CALB2*) ist einer der zurzeit besten verfügbaren Marker für den Nachweis von Mesotheliomen.

Der Calretinin ELISA ist ein Sandwich Enzymimmunoassay, bei dem gereinigte polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum zur Anwendung kommen. Während der Probeninkubation bindet Calretinin aus verdünnten Patientenproben an Calretinin-Antikörper (Fangantikörper), die auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten-Vertiefungen immobilisiert sind. Nach einem Waschschrift werden dem Test biotinylierte Calretinin-Antikörper (Detektionsantikörper) zugegeben. Diese binden an das zuvor gebundene Calretinin aus der Patientenprobe. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat zugegeben, das an den biotinylierten Detektionsantikörper spezifisch bindet. Nach einem letzten Waschschrift wird die gebundene Enzymmenge – und somit das Calretinin – über den Umsatz des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt.

Durch die Enzymreaktion entsteht zunächst ein blauer Farbstoff. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach gelb.

Die Extinktionen der Proben werden dann mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gemessen und mit Hilfe der im Test eingesetzten Standards und Kontrollen ausgewertet.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testkits* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6. geregelt. Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testkits

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

- 4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1 - 6** 6 Fläschchen
lyophilisiert,

Inhalt eines Fläschchens mit 200 µl dest. Wasser lösen

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

- 4.3 **Kontrolle 1 & 2** 2 Fläschchen
lyophilisiert, **CON 1 & 2**

Inhalt eines Fläschchens mit 200 µl dest. Wasser lösen
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat

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

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

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

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

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

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

- 4.10 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen

4.11	13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure Vorbereitungsplatte für die Verdünnung	PLATE	1 Stück
4.12	Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL	6 Stück
4.13	Verdünnungsfläschchen zur Verdünnung des Enzymkonjugats (max. 14 ml)	DILUTION-VIAL	3 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

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

5. Probengewinnung und -lagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma und Serum

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

Die Proben können bis zu 12 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei - 20°C mindestens 24 Monate gelagert werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien

6.1 Standards und Kontrollen **CAL 1 – 6** **CON 1 & 2**

Den Inhalt jedes Fläschchens mit 200 µl dest. Wasser lösen, mindestens 30 Minuten auf dem Schüttler mischen anschließend vortexen, bis alles vollständig gelöst ist (Sichtkontrolle), übermäßige Schaumbildung

vermeiden.

Die aufgelösten Standards und Kontrollen müssen für den späteren Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden und bleiben so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

6.2 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei $2 - 8^{\circ}\text{C}$ gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in 2 oder 3 Ansätze geteilt, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

6.3 Enzymkonjugat **CONJ**

Nicht vortexen!

Komplettes Fläschchen 5 Minuten bei 2.000 g zentrifugieren. Benötigtes Volumen aus dem Überstand 200fach mit Enzymkonjugatpuffer

CONJ-BUFF in einem Verdünnungsfläschchen **DILUTION-VIAL**

(s. 4.13) verdünnen (max. 14 ml), z.B. für 6 Streifen $30\text{ }\mu\text{l}$ Enzymkonjugat mit 6 ml Enzymkonjugatpuffer verdünnen.

Mindestens 30 Minuten auf einem Rollmischer oder Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Nicht vortexen.

Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

7. Testdurchführung

Die Reagenzien auf Raumtemperatur ($21 - 23\text{ }^{\circ}\text{C}$) bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

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

Kann die Raumtemperatur von $21 - 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ während der Testdurchführung nicht sicher eingehalten werden, sollte ein Thermoschüttler verwendet werden.

7.1 Probenverdünnung

1. **15 μl Standard 1 - 6** **CAL 1 - 6**, **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2**, **Plasma und/ oder Serum** in die entsprechenden Vertiefungen der Vorbereitungsplatte **PLATE** pipettieren.
2. **60 μl Diluent** **DILUENT** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei

Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.

50 µl werden im ELISA eingesetzt.

7.2 Durchführung ELISA

1. **50 µl verdünnte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** (s. 6.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papiertuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
4. **50 µl Antiserum** **AS** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl verdünntes Enzymkonjugat** (s. 6.3) in alle Vertiefungen pipettieren.
8. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 60 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz (600 rpm) mischen. Es empfiehlt sich, vor dem Stoppen der Reaktion die Platte bei 650 nm zu messen. Dabei sollte Standard 6 eine OD zwischen 0,9 und 1,0 erreichen.

10. **100 µl Stopplösung** STOP in alle Vertiefungen pipettieren.
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

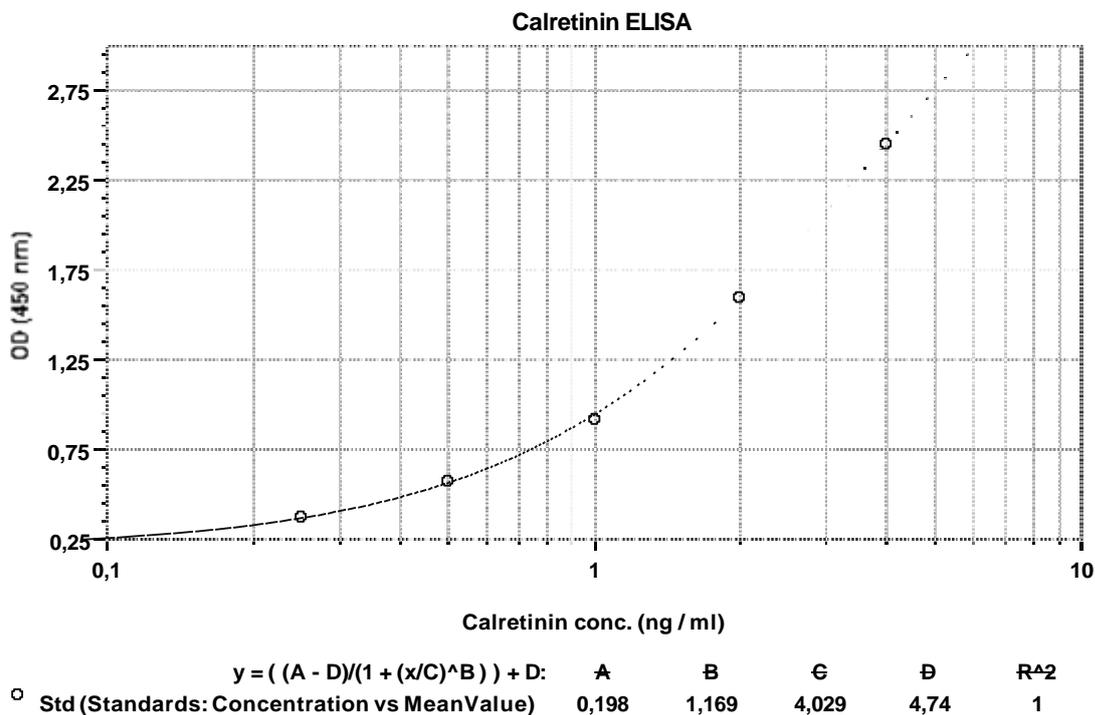
8. Auswertung und Beurteilung

Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

9. Testcharakteristika

9.1 Referenzbereich

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt.

Matrix	Referenzbereich
EDTA-Plasma, Serum	Männer < 0,65 ng / ml
EDTA-Plasma, Serum	Frauen < 1,10 ng / ml

9.2 Sensitivität

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

9.3 Wiederfindung nach Spiken

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

9.4 Linearität

Linearität	Bereich (ng / ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	0,47 – 3,03	1 : 7 mit Wasser	102	108 - 95

9.5 Reproduzierbarkeit

Intra-Varianz	Bereich (ng / ml)	Intra-Assay-Vk
	0,64 – 2,00	8,1 – 6,6 %

Inter-Varianz	Bereich (ng / ml)	Inter-Assay-Vk
	0,57 – 1,54	10,4 – 10,0 %

9.6 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

9.7 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des Calretinin ELISAs ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dest. Wasser (s. 9.4 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.8 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10. Literatur

Johnen G, Burek K, Raiko I, Wichert K, Pesch B, Weber DG, Lehnert M, Casjens S, Hagemeyer O, Taeger D, Brüning T, MoMar Study Group. Prediagnostic detection of mesothelioma by circulating calretinin and mesothelin – a case-control comparison nested into a prospective cohort of asbestos-exposed workers. *Scientific Reports* 2018; 8: 14321

Weber DG, Casjens S, Wichert K, Lehnert M, Taeger D, Rihs HP, Brüning T, Johnen G, MoMar Study Group, Tasks and experiences of the prospective, longitudinal, multicenter MoMar (molecular markers) study for the early detection of mesothelioma in individuals formerly exposed to asbestos using liquid biopsies, *Cancers* 2023; 15: 5896

Casjens S, Johnen G, Raiko I, Pesch B, Taeger D, Töpfer C, Schonefeld S, Moebus S, Jöckel KH, Brüning T, Weber DG, Re-evaluation of potential predictors of calretinin and mesothelin in a population-based cohort study using assays for the routine application in clinical medicine, *BMJ Open* 2021; 11: e039079

Johnen G, Gawrych K, Raiko I, Casjens S, Pesch B, Weber DG, Taeger D, Lehnert M, Kollmeier J, Bauer T, Musk AW, Robinson BWS, Brüning T, Creaney J, Calretinin as a blood-based biomarker for mesothelioma, *BMC Cancer* 2017; 17: 386

Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Gillissen A, Kollmeier J, Scherpereel A, Brüning T, Johnen G, Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients, *BMC Cancer* 2010; 10: 242

Hosbach I, Johnen G, Taeger D, Weber D, Brüning T, Wiethage T, EVA-Mesothel: Früherkennung von Mesotheliomen, *DGUV Forum* 2024; 12: 24

Johnen G, Taeger D, Brüning T, Molekulare Marker zur Krebsfrüherkennung – Follow-up (MoMarFollow), *IPA-Journal* 2022; 3: 17

Johnen G, Burek K, Raiko I, Wichert K, Pesch B, Weber DG, Lehnert M, Casjens S, Hagemeyer O, Taeger D, Brüning T, MoMar Studiengruppe, Früherkennung von Mesotheliomen mit Biomarkern erstmals möglich – Ergebnisse der MoMar-Studie, *IPA-Journal* 2018; 3: 16

Pipettierschema Probenverdünnung

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

Platte mit Haftklebefolie abkleben
60 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln

50 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

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

Platte mit Haftklebefolie abkleben
2 Stunden bei 21 – 23 °C schütteln

4 x Waschen

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

Platte mit Haftklebefolie abkleben
60 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln

4 x Waschen

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

Platte mit Haftklebefolie abkleben
60 Minuten bei 21 – 23 °C schütteln

4 x Waschen

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

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

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

Platte 10 Sekunden schütteln
Messung der Extinktion bei 450 nm