



CanAg S100 EIA

Prod.-Nr. 708-10

Gebrauchsanweisung

Enzymimmunoassay-Kit

2004-03

Für 96 Bestimmungen

ZWECKBESTIMMUNG

Das CanAg S100 EIA-Kit dient zur quantitativen Bestimmung von S100B (S100A1B+S100BB) in Serumproben.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS

S100 ist ein 20-kDa-Protein aus der S100/Calmodulin/Troponin C-Superfamilie der EF-Hand-Calciumbindungsproteine. S100 wurde ursprünglich aus dem menschlichen Gehirn isoliert und galt als Gliazellen-spezifisches Protein (1). Inzwischen sind anhand von strukturellen und funktionalen Ähnlichkeiten 20 Monomere der S100-Familie identifiziert worden (2, 3). Die meisten S100-Proteine liegen als Dimere vor und werden zellspezifisch exprimiert. Zwei der S100-Monomere, S100A1 und S100B (4), sind zwischen den Spezies hochkonserviert und liegen als Homo- (BB) und Heterodimere (A1B) in den Gliazellen des ZNS und in bestimmten peripheren Zellen vor, wie z. B. Schwann-Zellen, Melanozyten, Adipozyten und Chondrozyten (5). S100A1B und S100BB lassen sich ebenfalls in Tumorgewebe, hauptsächlich in Melanomen und in geringerem Maße auch in Gliomen und Karzinomen der Schilddrüsenzellen und der Nierenzellen nachweisen (2).

Die Bestimmung von S100B im Serum hat sich in der Klinik zur Prognose und Therapiemonitoring bei Patienten mit der Diagnose eines malignen Melanoms als nützlich erwiesen (6-9). Studien legen ebenfalls nahe, dass S100B in der Therapie von Patienten mit Hirnschädigung, z. B. nach Schädeltrauma, perinataler Asphyxie, Herzstillstand, Herzoperation und Schlaganfall, nützlich sein könnte (10-13).

PRINZIP DES TESTS

Der CanAg S100 EIA ist ein zweistufiger nicht-kompetitiver Festphasen-Immunoassay, der auf zwei monoklonalen Mausantikörpern beruht, die für zwei verschiedene in S100B exprimierte Epitope spezifisch sind. Der Test bestimmt S100A1B sowie S100BB ohne Kreuzreaktivität mit anderen S100-Monomeren. Kalibratoren und Patientenproben werden zusammen mit biotinyliertem, gegen S100B gerichtetem

monoklonalem Antikörper (mAk) S23 in Streptavidin-beschichteten Mikrostreifen inkubiert. In Kalibratoren oder Proben vorhandenes S100B wird während der Inkubation vom biotinylierten Anti-S100B mAk in den Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen adsorbiert. Danach werden die Mikrostreifen gewaschen und mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiertem Anti-S100B mAk S53 inkubiert. Nach dem Waschen wird in jede Vertiefung gepuffertes Substrat/Chromogen-Reagenz (Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben, und die Enzymreaktion abgewartet. Während der Enzymreaktion entwickelt sich bei Präsenz des Antigens eine Blaufärbung. Die Farbintensität ist zu der in den Proben vorhandenen S100B-Menge proportional.

Die Farbintensität wird mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm (oder wahlweise bei 405 nm nach Zugabe von Stopplösung) bestimmt. Für jeden Assay wird eine Eichkurve erstellt, indem für jeden Kalibrator der Extinktionswert gegen die Konzentration aufgetragen wird. Die S100B-Konzentrationen der Patientenproben werden dann anhand der Eichkurve abgelesen.

REAGENZIEN

- Jedes CanAg S100 EIA-Kit enthält Reagenzien für 96 Tests.
- Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett außen auf dem Karton angegeben.
- Das Kit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Den Kit bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren.
- Die nachstehende Tabelle enthält Angaben zur Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien, sofern diese nicht verunreinigt sind, in den gut verschlossenen Originalbehältnissen aufbewahrt und vorschriftsmäßig verwendet werden. Unmittelbar nach dem Gebrauch wieder bei 2–8 °C lagern.

Komponente	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen
MICROPLA		
Streptavidin-Mikroplatte	1 Platte	bei 2–8 °C bis zu dem auf der Platte angegebenen Verfallsdatum
12 x 8 mit Streptavidin beschichtete Vertiefungen. Nach dem Öffnen nicht benötigte Streifen umgehend in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel zurücklegen. Zum Trockenhalten wieder sorgfältig verschließen.		

Komponente	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen
------------	-------	--

S100-Kalibratoren 6 Fläschchen, lyophilisiert 4 Wochen bei 2–8 °C
3 Monate bei –30 °C oder kälter

CAL	S100	A
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	B
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	C
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	D
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	E
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	F
-----	------	---

1 x 1 ml

Die lyophilisierten Kalibratoren enthalten bovines S100B in einer Proteinmatrix mit 0,02% NaN₃ als Konservierungsmittel. Vor Verwendung mit Wasser rekonstituieren. **ACHTUNG:** Die genaue S100B-Konzentration ist chargenabhängig und ist auf dem Etikett jedes Fläschchens angegeben.

BIOTIN	Anti-S100
--------	-----------

Biotin Anti-S100

1 x 15 ml

bei 2–8 °C bis zu dem auf dem
Fläschchen angegebenen
Verfallsdatum

Biotinylierter monoklonaler Anti-S100 Antikörper von Mäusen, ca. 2 µg/ml. Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2) mit CaCl₂, Rinderserumalbumin, Rinderimmunglobulin, Blockierungsreagenz, Tween 20, einen inerten blauen Farbstoff und 0,01% Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

CONJ	Anti-S100
------	-----------

Tracer, HRP Anti-S100

1 x 0,75 ml

bei 2–8 °C bis zu dem auf dem
Fläschchen angegebenen
Verfallsdatum

Stammlösung von Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markiertem monoklonalem Anti-S100 Antikörper von Mäusen, ca. 20 µg/ml. Enthält Konservierungsstoffe. Vor dem Gebrauch mit Tracer Diluent verdünnen.

Komponente	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen
DIL CONJ Tracer Diluent	1 x 15 ml	bei 2–8 °C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2) mit Rinderserumalbumin, Blockierungsreagenz, Detergenzien, einem inerten blauen Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.		
SUBS TMB TMB-HRP-Substrat	1 x 12 ml	bei 2–8 °C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum
Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.		
STOP Stopplösung	1 x 15 ml	bei 2–8 °C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum
Enthält 0,12 M Salzsäure. Gebrauchsfertig.		
WASHBUF 25X Waschkonzentrat	1 x 50 ml	bei 2–8 °C bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum
Eine Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch 25fach mit Wasser verdünnen.		

Anzeichen für Instabilität

Das TMB-HRP-Substrat sollte farblos oder leicht bläustichig sein. Eine Blaufärbung ist ein Anzeichen dafür, dass das Reagenz verunreinigt ist und nicht mehr verwendet werden sollte.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik.

- Nur für geschultes Fachpersonal.

- Bitte beachten Sie die Vorschriften zur Laborsicherheit in der Publikation Nr. (CDC) 88-8395 des US Department of Health and Human Services (Bethesda, MD, USA) oder andere gleichwertige regionale oder nationale Bestimmungen.
- Alle Patientenproben gelten als potenziell infektiös und sind entsprechend zu handhaben.
- Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN_3) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Um die Bildung von Aziden zu verhindern, nach der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien zur Entsorgung von anfallenden Abfallstoffen.

PROBENNAHME UND UMGANG MIT DEM MATERIAL

Der CanAg S100 EIA dient zur Analyse von Serumproben. Durch Venenpunktion Blut abnehmen und das Serum nach üblichen Verfahren trennen. Die Proben können 24 Stunden lang bei 2–8 °C gelagert werden. Bei längeren Lagerzeiten wird eine Temperatur von –20 °C oder darunter empfohlen. Proben nicht wiederholt einfrieren und auftauen. Tiefgefrorene Proben langsam auftauen lassen—am besten über Nacht bei 2–8 °C – und vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen.

VERFAHREN

Nicht im Lieferumfang enthaltene erforderliche Materialien und Laborgeräte

1. Schüttler für Mikroplatten

Das Schütteln sollte mäßig bis kräftig sein. Schüttelbewegung längs: ca. 200 U/min, Schüttelfrequenz: 700-900/min.

2. Waschvorrichtung für Mikroplatten

Waschen der Platte wahlweise vollautomatisch durch 1, 3 und 6 Waschzyklen, oder mit einer halbautomatischen Mikroplatten-Waschvorrichtung, die an eine Vakuumpumpe oder eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe und ein Auffanggefäß für die abgesaugte Flüssigkeit angeschlossen ist. Wird kein automatisches Mikroplatten-Waschgerät eingesetzt, empfiehlt sich die Verwendung des manuellen Waschgerätes Nunc Immuno-8.

3. Mikroplatten-Spektrophotometer

Mit einer Wellenlänge von 620 nm und/oder 405 nm und einem Extinktionsbereich von 0 bis 3,0.

4. Präzisionspipetten

Mit Einweg-Plastikspitzen für Mikroliter-oder Milliliter-Volumina. Eine 8-Kanal-Pipette oder Dispenserpipette mit Einweg-Plastikspitzen für 100 µl ist hilfreich, aber nicht unbedingt erforderlich.

5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Zur Rekonstituierung der S100 Kalibratoren und zur Herstellung der Waschlösung.

Ergänzende Hinweise zum Ablauf

1. Damit der ordnungsgemäße Gebrauch des CanAg S100 EIA-Kits sichergestellt ist, muss die Packungsbeilage genau verstanden werden. Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind gemeinsam zu verwenden. Keine zwar identischen, aber aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern stammenden Reagenzien miteinander mischen. Die Kit-Reagenzien nach dem außen auf dem Karton aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwenden
2. Die Reagenzien sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25 °C) gebracht werden. Damit genaue Ergebnisse erzielt werden, sollte der Assay nur bei Temperaturen zwischen 20–25 °C durchgeführt werden. Gefrorene Proben sollten langsam nur auf Raumtemperatur gebracht werden und sind nach dem Auftauen vorsichtig, aber gründlich zu schütteln.
3. Vor dem Pipettieren von Kalibratoren und Patientenproben ist es ratsam, die Streifen zu markieren, damit die Proben während der Untersuchung und danach eindeutig zugeordnet werden können.
4. Ein sorgfältiges Waschen der Mikrostreifen ist unerlässlich. Es ist darauf zu achten, dass jede Vertiefung vollständig bis zum oberen Rand gefüllt ist und der Inhalt der Vertiefungen zwischen den Waschgängen und danach vollständig abgesaugt wird und die Vertiefungen trocken sind. Wenn Flüssigkeit in den Vertiefungen bleibt, Platte umdrehen und vorsichtig auf saugfähigem Papier ausklopfen.

Automatisches Mikrostreifen-Waschgerät: Wartungsanweisungen des Herstellers befolgen und nach jedem Inkubationsschritt die vorgeschriebene Anzahl der Waschzyklen durchlaufen lassen.

Die Waschlösung sollte nicht über längere Zeiträume in der Ansaug-/Waschvorrichtung verbleiben, da sonst die Nadeln verstopfen könnten. Dies kann zu einer beeinträchtigten Abgabe und Absaugung der Flüssigkeit führen.
5. Das TMB-HRP-Substrat ist sehr empfindlich gegenüber Kontamination. Um eine optimale Haltbarkeit des TMB-HRP-Substrats sicherzustellen, die benötigte Menge aus dem Fläschchen in ein sorgfältig gereinigtes Behältnis oder vorzugsweise in eine Einweg-Plastikschale gießen, um eine Kontamination des Reagenzes zu vermeiden. Es ist darauf zu achten, dass nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen (oder Dispenser-Pipettenspitzen) verwendet werden.
6. Es ist darauf zu achten, dass beim Umgang mit Proben und Reagenzien nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen verwendet werden und eine einwandfreie Pipettiertechnik angewandt wird. Verschleppung ist zu verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über den oberen Rand der Vertiefung gehalten wird. Weder den den Plastikstreifen noch die Oberfläche der Flüssigkeit berühren. Besonders bei der Verwendung der TMB-HRP-Substrat-Lösung ist ordentliches Pipettieren unerlässlich.

Vorbereitung der Reagenzien	Stabilität der vorbereiteten Reagenzien
-----------------------------	---

S100-Kalibratoren

4 Wochen bei 2–8 °C
3 Monate bei –30 °C oder kälter

Exakt 1,0 ml destilliertes Wasser in jedes Fläschchen geben und vorsichtig schütteln. Mindestens 15 Minuten stehen lassen, damit die Rekonstituierung vollständig stattfinden kann. **ACHTUNG:** Die Konzentration der Kalibratoren ist auf den Etiketten angegeben und sollte zur Berechnung der Ergebnisse herangezogen werden.

Waschlösung

2 Wochen bei 2–25 °C in einem fest verschlossenen Behältnis

Die 50 ml Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter geben und 1200 ml destilliertes oder entionisiertes Wasser zugeben, um eine 25fach verdünnte, gepufferte Waschlösung zu erhalten.

Tracer-Arbeitslösung

3 Wochen bei 2–8 °C in einem fest verschlossenen Behältnis

Zur Herstellung der benötigten Menge Tracer-Arbeitslösung pro Streifen 50 µl des HRP-Anti-S100-Tracers mit 1 ml Tracer Diluent mischen (siehe Tabelle):

Anzahl Streifen	Tracer, HRP-Anti-S100 (µl)	Tracer Diluent (ml)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Zur Vorbereitung der Tracer-Arbeitslösung unbedingt eine saubere Plastik-oder Glasflasche verwenden.

Alternative: Den Inhalt des HRP-Anti-S100-Tracer in das Fläschchen mit Tracer Diluent gießen und vorsichtig mischen. Es ist darauf zu achten, dass keine Reste im Tracer-Fläschchen verbleiben und wirklich der gesamte Tracer in das Fläschchen Tracer Diluent gelangt.

ACHTUNG: Die Tracer-Arbeitslösung ist bei 2–8 °C für 3 Wochen stabil. Nicht mehr Tracer-Arbeitslösung vorbereiten, als innerhalb dieses Zeitraums verbraucht wird. Es ist darauf zu achten, dass die Lösung vorschriftsgemäß gelagert wird.

Testdurchführung

Jede Bestimmung für Kalibratoren und Patientenproben sollte doppelt durchgeführt werden. Bei jedem Assay sollte eine Eichkurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben sind vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen.

1. Mit der Vorbereitung der S100-Kalibratoren, der Waschlösung und der Tracer-Arbeitslösung beginnen. Es ist wichtig, nur saubere Behälter zu verwenden und die Anweisungen sorgfältig zu befolgen.
2. Benötigte Anzahl Streifen der Mikroplatte in den Rahmen einsetzen. (Die nicht benötigten Streifen umgehend wieder in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel geben und die Tüte wieder sorgfältig verschließen). Jeden Streifen einmal mit der Waschlösung waschen. Nur so viele Streifen waschen, wie innerhalb von 30 min bearbeitet werden können.
3. Nach folgendem Schema 50 µl der S100-Kalibratoren (CAL A, B, C, D, E, F) und der Patientenproben (Pat.) in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettieren:

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	Cal A	Cal E	etc.				
B	Cal A	Cal E					
C	Cal B	Cal F					
D	Cal B	Cal F					
E	Cal C	Pat. 1					
F	Cal C	Pat. 1					
G	Cal D	Pat. 2					
H	Cal D	Pat. 2					

4. Mit einer 100 µl Präzisionspipette (oder einer 8-Kanal-100-µl-Präzisionspipette) 100 µl Biotin Anti-S100 in jede Vertiefung geben. Verschleppung verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über dem oberen Rand der Vertiefung gehalten wird. Weder den Plastikstreifen noch die Oberfläche der Flüssigkeit berühren.
5. Den Rahmen mit den Mikrotiterstreifen unter konstantem Schütteln auf einem Mikroplatten-Schüttler bei Raumtemperatur (20–25 °C) über 2 Stunden (\pm 10 min) inkubieren.
6. Nach der Inkubation jeden Streifen absaugen und jeden Streifen 3 Mal wie unter Punkt 4 der Ergänzenden Hinweise beschrieben waschen.
7. In jede Vertiefung 100 µl Tracer-Arbeitslösung geben. Wie unter Punkt 4 in diesem Abschnitt beschrieben pipettieren.
8. Den Rahmen mit den Mikrostreifen unter konstantem Schütteln bei Raumtemperatur (20–25 °C) über 1 Stunde (\pm 5 min) inkubieren.

9. Nach der zweiten Inkubation die Streifen absaugen und jeden Streifen 6 Mal wie unter Punkt 4 der Ergänzenden Hinweise beschrieben, waschen.
10. In jede Vertiefung 100 µl TMB-HRP-Substrat geben. Wie unter Punkt 4 in diesem Abschnitt beschrieben, pipettieren. Das TMB-HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in die Vertiefungen gegeben werden: die Zeit zwischen Zugabe in die erste und letzte Vertiefung sollte 5 Minuten nicht überschreiten.
11. Den Rahmen mit den Mikrostreifen unter konstantem Schütteln bei Raumtemperatur 30 Minuten lang (± 5 min) inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden!
12. Die Extinktionswerte sofort bei 620 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer ablesen.

Alternativoption zu Punkt 12:

Verfügt Ihr Labor nicht über ein Mikroplatten-Spektrophotometer zum Ablesen der Extinktion bei 620 nm, können die Extinktionswerte wie folgt bestimmt werden:

- Alt. 12.** 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Mischen und die Extinktion innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer ablesen.

Messbereich

Mit dem CanAg S100 EIA können Konzentrationen zwischen 10 und 3500 ng/l gemessen werden. Wenn mit S100B-Konzentrationen zu rechnen sind, die oberhalb dieses Messbereichs liegen, wird empfohlen, die Proben vor der Analyse mit normalem Humanserum zu verdünnen. **ACHTUNG:** Das zur Verdünnung verwendete Serum sollte ebenfalls analysiert werden, um die endogene S100B-Konzentration bestimmen zu können (vgl. "Berechnung der Ergebnisse").

Qualitätskontrolle

Die CanChek Tumor Marker Kontroll Seren Level 1 und 2 (gesondert erhältlich unter REF 107-20) werden für die Validierung der Testserien empfohlen. Falls Werte außerhalb des angegebenen Bereichs erhalten wurden, sollten die Reagenzien sowie die Funktion des Readers überprüft und die Bestimmung wiederholt werden.

Referenzmaterialien

Da für S100A1B oder S100BB keine handelsüblichen Referenzmaterialien erhältlich sind, werden die CanAg S100-Kalibrator-Werte anhand firmeninterner Referenzstandards abgeglichen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Bei Verwendung eines Mikroplatten-Spektrophotometers mit einem eingebautem Datenkalkulationsprogramm, sollte anhand der Gebrauchsanweisung des Gerätes und der auf den Etiketten jedes einzelnen S100-Kalibrators angegebenen Konzentrationen ein entsprechendes Programm erstellt werden.

Zur automatischen Berechnung der S100-Ergebnisse wird empfohlen, eine der nachfolgend beschriebenen Methoden anzuwenden:

- Kurvenanpassung mit kubischem Spline. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.
- Kurvenanpassung mit geglättetem Spline. Kalibrator 0 sollte als Leerwert eingesetzt werden.
- Interpolation mit Punkt-zu-Punkt-Bewertung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.
- Quadratische Kurvenanpassung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.

HINWEIS: Eine 4-Parameter-Regression oder eine lineare Regression sollte nicht verwendet werden.

Zur manuellen Auswertung wird eine Eichkurve erstellt, indem die Extinktionswerte (E) für jeden S100-Kalibrator gegen die entsprechende S100-Konzentration (in ng/l) aufgetragen werden (siehe Abbildung unten). Die unbekanntes S100-Konzentrationen können dann unter Verwendung des Extinktionsmittelwertes für jede Patientenprobe von der Eichkurve abgelesen werden.

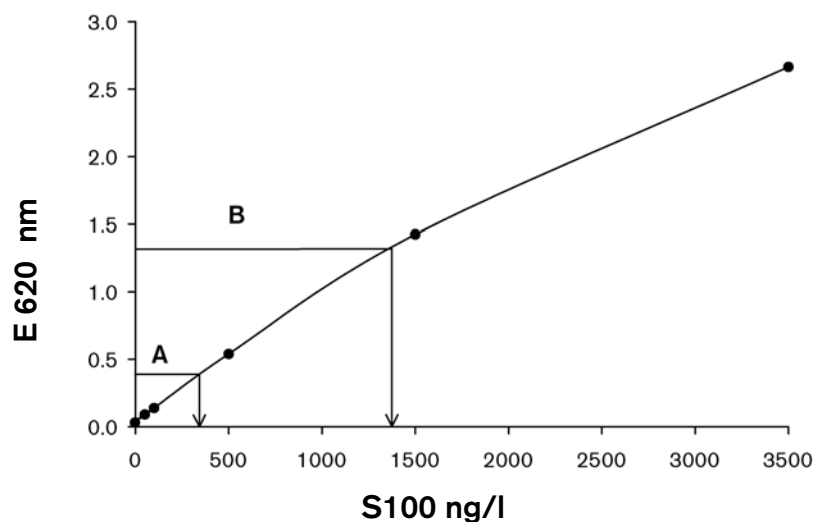
Wenn Proben in einer ersten Analyse S100-Konzentrationen ergeben, die höher liegen als Kalibrator F (ca. 3500 ng /l), sollten die Proben 1:10 mit normalem Humanserum verdünnt und erneut analysiert werden, um die korrekte S100-Konzentration zu erhalten. **ACHTUNG:** Die zur Verdünnung verwendete Probe sollte ebenfalls analysiert werden, um die endogene S100-Konzentration zu bestimmen.

Die S100-Konzentration der unverdünnten Probe wird wie folgt berechnet:

Verdünnung 1:10: $10 \times ([S100]_{\text{Verdünnte Probe}} - (0,9 \times [S100]_{\text{Normales Serum}}))$

Ergebnisbeispiele

Probe	Kalibrator-Werte	Mittlerer Extinktionswert (E)	S100 ng/l
CAL S100 A	0 ng/l	0,041	
CAL S100 B	50 ng/l	0,091	
CAL S100 C	100 ng/l	0,139	
CAL S100 D	500 ng/l	0,540	
CAL S100 E	1500 ng/l	1,425	
CAL S100 F	3500 ng/l	2,663	
Probe A		0,352	305
Probe B		1,377	1435



Beispiel (diese Kurve und die obige Tabelle dürfen nicht zur Bestimmung der tatsächlichen Assay-Ergebnisse verwendet werden!)

GRENZEN DES S100-TESTS

Die S100-Konzentration darf nicht als einziger Nachweis für das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer malignen Erkrankung angesehen werden, und der S100-Test sollte nicht beim Krebs-Screening eingesetzt werden. Die Testergebnisse sollten nur in Verbindung mit anderen Untersuchungen und Verfahren zur Krankheitsdiagnose und Behandlung von Patienten interpretiert werden, und der S100-Test sollte keine anderen etablierten klinischen Untersuchungen ersetzen.

Ein erhöhter S100B-Wert im Serum sollte bei Traumapatienten, z. B. nach Knochenbrüchen, Verbrennungen, inneren Weichteilverletzungen und chirurgischen Eingriffen, vorsichtig interpretiert werden, da in diesen Fällen eine signifikante S100B-Freisetzung stattfindet (14).

Gelegentlich können Anti-reagierende Antikörper (Human-Anti-Maus-Antikörper [HAMA] oder heterophile Antikörper) in der Patientenprobe den Assay stören, obwohl spezifisches Blockierungsreagenz im Puffer enthalten ist.

ERWARTUNGSWERTE

Die S100B-Werte von 269 gesunden Blutspendern wurden bestimmt. Die unteren und oberen Extremwerte des Normbereichs wurden mit von der IFCC empfohlenen nicht-parametrischen statistischen Methoden untersucht. Das Referenzintervall umfasst 95% der um den Mittelwert herum angeordneten Werte der Referenzverteilung, entsprechend liegen die Referenzgrenzen des (unteren) 2,5%-Fraktils und des (oberen) 97,5%-Fraktils. Diese Grenzwerte schließen auf jeder Seite der Referenzverteilung 2,5% der Werte aus. Parameterfreie Schätzungen:

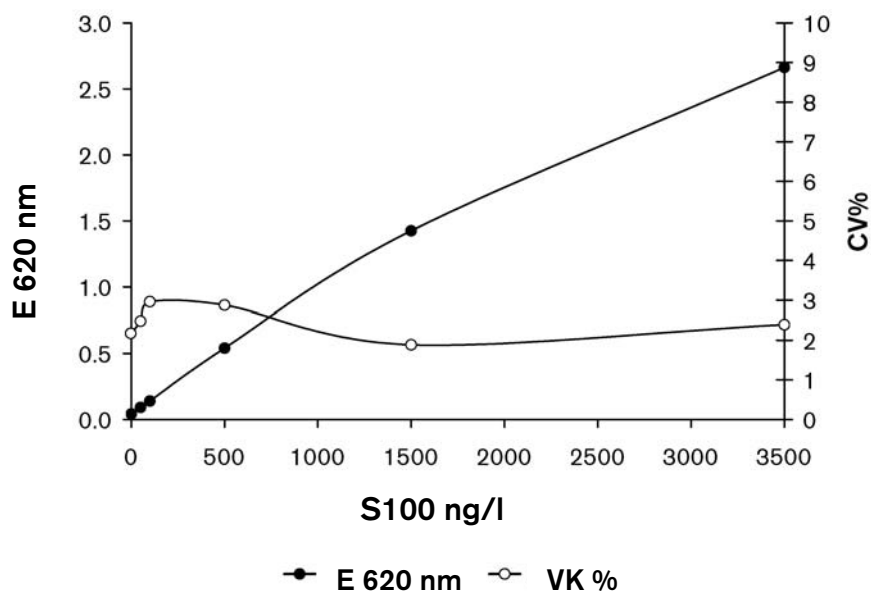
	Mittelwert	SD	Oberen Referenzgrenze
269 gesunden Blutspendern	54 ng/L	15,6 ng/L	90 ng/L

Jedes Labor sollte einen eigenen Normbereich bestimmen, um dem jeweiligen Umfeld wie Ernährung, Klima, Lebensbedingungen, Auswahl des Patientenkollektivs, usw. Rechnung zu tragen.

LEISTUNGSMERKMALE

Ansprechen auf die Dosis und Präzisionsprofil

Ein typisches Beispiel für eine Eichkurve und ein Präzisionsprofil, wie sie mit dem CanAg S100 EIA-Kit erzielt werden, ist nachfolgend dargestellt. Das Präzisionsprofil basiert auf randomisierter Pipettierung von Kalibratoren in nur eine Mikrotiterplatte, n=8.



Präzision

Die Gesamtpräzision wurde nach der NCCLS-Richtlinie EP5-A (15) unter Verwendung von gefrorenem gepooltem humanem Serum, das zusätzlich S100 in 4 verschiedenen Konzentrationen enthielt und 22 verschiedenen CanAg S100 EIA-Reagenzienkombinationen berechnet. Jede Probe wurde nach dem Zufallsprinzip pipettiert (n=2/Analyse) und über 20 Tage zweimal täglich analysiert.

Probe	Parallelprobe	Mittelwert (ng/l)	SD* innerhalb eines Laufs (ng/l)	VK % innerhalb eines Laufs	SD* zwischen den Messtagen (ng/l)	VK % zwischen den Messtagen
S100 1	80	70	2	2,5	2	2,2
S100 2	80	302	5	1,6	8	2,5
S100 3	80	1440	20	1,4	21	1,5
S100 4	80	2260	30	1,3	45	2,0

* SD = Standard Deviation / Standardabweichung

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg S100 EIA ist ≤ 10 ng/l und ist definiert als die Konzentration, die dem Mittelwert der Extinktionswerte des S100-Kalibrators 0 plus 2 Standardabweichungen entspricht. Dies lässt sich folgendermaßen als Formel darstellen:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD}^* \text{ CAL B} - \text{OD}^* \text{ CAL}}$$

*OD = Optical density / optische Dichte

Wiederfindungsrate

Markierte Serumproben wurden hergestellt, indem normalen Serumproben humanes S100-Antigen zugegeben wurde. Die Wiederfindung des zugesetzten Antigens lag im Bereich von 97–105 %.

HINWEIS: Wiederfindungsstudien sollten **nicht** unter Verwendung der Kalibratoren des CanAg S100 EIA-Kits durchgeführt werden.

Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt ist bei Proben bis zu 150.000 ng/l nicht festgestellt worden.

ACHTUNG: In Proben mit sehr hoher Konzentration wechselt die Farbe des Substrats von blau zu grünlich (und bei extrem hohen Konzentrationen schließlich zu gelb). Dies führt zu einem falsch erniedrigten Extinktionswert bei 620 nm, und in extremen Fällen kann die Extinktion in den Bereich der Kalibrationskurve fallen und sich als Hook-Effekt bemerkbar machen.

Linearität

Die Patientenproben wurden mit normalem Humanserum seriell verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen innerhalb $\pm 10\%$ der erwarteten Werte.

Spezifität

Der CanAg S100 EIA basiert auf zwei monoklonalen Maus-Antikörpern, die für zwei verschiedene Epitope spezifisch sind, die in S100BB exprimiert werden: dem Fänger-Antikörper mAk S23 und dem detektierenden Antikörper mAk S53. Der Assay bestimmt auf diese Weise S100A1B sowie S100BB ohne Kreuzreaktivität mit anderen S100-Monomeren. Zur Feststellung möglicher Interferenzquellen wurde die NCCLS-Richtlinie EP7-P (16) befolgt. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden getestet; sie stellten keine Störgrößen für die Bestimmung dar:

	Konzentration ohne signifikante ($\pm 10\%$) Interferenz
Lipämie (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubin, unkonjugiert	0,6 mg/ml
Hämoglobin	3,9 mg/ml

Methodenvergleich

Der CanAg S100 EIA wurde mit dem Sangtec 100 verglichen. Es wurden 98 humane Serumproben von Patienten mit malignem Melanom bestimmt, deren Werte von 0-8000 ng/l reichten. Die lineare Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab folgendes Resultat:

$$\text{CanAg S100} = 0,4 \times \text{Sangtec 100} + 0,03 \quad r = 0,99$$

GARANTIE

Die hier vorgestellten Daten wurden unter Verwendung des angegebenen Assay-Verfahrens erzielt. Jede nicht vom Hersteller CanAg Diagnostics empfohlene Änderung oder Modifizierung des Verfahrens kann die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflussen. Für diese Fälle lehnt CanAg Diagnostics jegliche Garantie (ob ausdrückliche, stillschweigende oder gesetzliche, einschließlich der stillschweigenden Garantie der marktgängigen Qualität und Gebrauchseignung) des Produktes ab.

LITERATUR

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K. et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T. et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E., et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A. et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT., et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H. et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T. et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicentre study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D. (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Anderson R. et al., (2001) High serum S100B levels for trauma patients without head injuries *Neurosurgery* 48: 1255-1258
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).

CanAg® ist ein eingetragenes Warenzeichen der CanAg Diagnostics AB

CanAg Diagnostics AB
Majnabbe Terminal
SE-414 55 Göteborg
Schweden
Tel.: + 46 -31-85 70 30
Fax: + 46 -31-85 70 40
canag@canag.se
www.canag.se