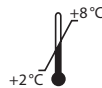


IDK[®] Calprotectin ELISA

***Zur in-vitro-Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14,
S100A8/A9) in Serum und Plasma***

***For the in vitro determination of calprotectin (MRP 8/14,
S100A8/A9) in serum and plasma***

Gültig ab / Valid from 2018-06-19



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Spezifität</i>	11
<i>Rückführbarkeit</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13
<i>Allgemeine Literatur</i>	13
<i>Literatur mit IDK® Calprotectin ELISA</i>	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14, S100A8/A9) aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen für Calprotectin:

- MRP8/14, L1, (p8,14), p34, S100 A8/A9

Alternative Namen für die beiden Proteine des Heterokomplexes Calprotectin:

- S100A8, Calgranulin A, MRP8 (Migration inhibition factor-related protein-8), CP-10 (in Maus)
- S100A9, Calgranulin B, MRP14 (Migration inhibition factor-related protein-14)

Calprotectin ist ein kalziumbindendes Protein, dass hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniert wird. Calprotectin stellt einen Heterokomplex dar und setzt sich aus den beiden zur S100-Familie gehörenden Proteinen S100A8 (Calgranulin A, MRP 8) und S100A9 (Calgranulin B, MRP 14) zusammen. Die Expression von S100A8 und S100A9 in epithelialem Gewebe wurde erstmals im Zusammenhang mit Plattenepithelien sowie mit der Wundheilung bei Mensch und Maus beschrieben. Inzwischen wurde eine Verbindung zwischen der Expression von S100-Proteinen und Adenokarzinomen im Menschen nachgewiesen. Die Gene für S100A8 und S100A9 wurden in einem Gen-Cluster auf Chromosom 1q21 lokalisiert, einer Region, in der im Rahmen einer Tumorentstehung Umlagerungen beobachtet wurden.

Erhöhte MRP8/14 Konzentrationen wurden in vielen inflammatorischen Quellen und Extrazellulärflüssigkeiten bei Patienten mit diversen Entzündungskrankheiten gemessen. Bei rheumatoider Arthritis, cystischer Fibrose, multipler Sklerose und HIV-Infektionen wurden erhöhte MRP8/14 Konzentration im Patientenblut nachgewiesen, während bei Morbus Crohn und kolorektalem Karzinom hohe MRP8/14 Werte im Patientenstuhl detektiert wurden [1-5]. Extrazelluläres MRP8/14 hat antimikrobielle, antiproliferative und apoptotische Wirkungen. Es hemmt das Wachstum von Pilzen und Bakterien [1,2] bzw. die Proliferation von verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Lymphozyten, hämatopoietischen Progenitorzellen und Tumorzelllinien. MRP8/14 kann auch bei manchen Tumorzelllinien Apoptose induzieren [1,2].

Hermani et al. (2005) [6] berichteten über den Zusammenhang zwischen den beiden S100-Proteinen, S100A8 und S100A9, und der Entstehung eines Prostatakarzinoms. Sie stellten fest, dass die verstärkte Expression beider Proteine ein frühes Ereignis bei der Prostatakarzinomentstehung darstellt und möglicherweise zur Entwicklung und Ausbreitung des Prostatakarzinoms beiträgt. Dazu verglichen sie die Serumkonzentrationen

tration von S100A9 bei Krebspatienten mit der Serumkonzentration von gesunden Kontrollen bzw. von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH). Die Serumwerte von S100A9 waren bei Patienten mit einem Prostatakarzinom signifikant erhöht verglichen mit den Werten der Kontrollen bzw. den Werten von BPH-Patienten. Letztere hatten S100A9-Werte ähnlich denen der Kontrollgruppe.

Pathologische Signifikanz und klinische Anwendung

Der diagnostische Wert und Vorteil von MRP8/14 gegenüber anderen Markern besteht darin, dass MRP8/14 bereits synthetisiert in der Zelle vorliegt und unmittelbar nach der Zellaktivierung ausgeschüttet wird. Andere Marker werden erst in nachgeschalteten Ereignissen generiert oder müssen in der Leber *de novo* synthetisiert werden. Es wurden signifikante Korrelationen der MRP8/14 (oder MRP8 bzw. MRP9) Konzentration mit folgenden Krankheitsaktivitäten festgestellt:

- MRP8/14-Konzentration in Serum und insbesondere in Synovialflüssigkeit korreliert stark mit der Krankheitsaktivität bei rheumatoider Arthritis.
- Plasma-MRP8/14-Konzentration ist ein sehr früher, spezifischer und empfindlicher Prognosemarker für akute Abstoßung bei Nierentransplantationen.
- Serum-MRP8/14-Konzentration ist Prognosemarker für Rezidivinfektion und Überlebenschancen bei alkoholischer Leberzirrhose.
- MRP8/14 dient zur Evaluation des Entzündungsgrades bei Paradontose.
- MRP8/14-Expression korreliert mit der Mikrogliaaktivierung bei cerebraler Malaria.
- MRP8/14 ist in Urin- und Zahnstein vorhanden.
- S100A9 kann als Serummarker zur Diskriminierung zwischen einer benignen Prostatahyperplasie und einem Prostatakarzinom eingesetzt werden.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6935	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6935	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6935	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6935	STD	Calprotectin-Standards, gebrauchsfertig (0; 3,9; 15,6; 62,5; 250 ng/ml)	1 x 5 vials
K 6935	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6935	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6935	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6935	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6935	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der

Waschpuffer (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Präanalytik

Bei den Untersuchungen von Plasma oder Serum können sich die ermittelten Calprotectin-Werte deutlich unterscheiden, z. B. bis zu 10-fach höhere Serumwerte im Vergleich zu den Plasmakonzentrationen. Die Ursachen dafür sind:

Im Serum werden während des Gerinnungsprozesses die Granulozyten zur kompletten Freisetzung der Granulozyten-Aktivierungsmarker angeregt. Die Standzeit der Proben sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen führen zu keiner Wertever-schiebung.

Anders im Plasma: je länger die Probe vor dem Zentrifugationsschritt steht und je mehr Einfrier- und Auftauzyklen die Probe durchlebt, umso höhere Calprotectin-Konzentrationen werden ermittelt. Bei Verwendung von Plasma muss die Präanalytik konstant sein. Das gilt generell und unabhängig von dem verwendeten Testsystem.

Immundiagnostik AG empfiehlt daher zur Bestimmung der Calprotectin-Konzentration Serum zu verwenden.

Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.

Serumproben

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:100 mit Probenverdünnpuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B.

50 µl Probe + 450 µl SAMPLEBUF = **Verdünnung I (1:10)**

50 µl Verdünnung I + 450 µl SAMPLEBUF = **Verdünnung II (1:10)**

Endverdünnung 1:100

100 µl der Verdünnung II werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Plasmaproben

EDTA-Plasmaproben werden vor dem Einsatz im Test **1:30 mit Probenverdünnpuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt, z. B.

20 µl Probe + 580 µl SAMPLEBUF.

100 µl der Verdünnung werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14, S100A8/A9). Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes Calprotectin erkennen, verwendet. Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Calprotectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Calprotectin-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Calprotectin – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30°C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.

3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren*.
9.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

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

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.

Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 100** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

EDTA-Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 30** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

Calprotectin im Serum gesunder Personen: < 3 µg/ml (< 3000 ng/ml)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 80)

Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	447,7	3,7
2	784,6	7,9

Inter-Assay (n = 10)

Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	485,28	5,5
2	816,11	7,0

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,52 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD)

0,78 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ)

0,78 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt.

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Serumproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
A	1:50		9,34
	1:100	4,67	4,53
	1:200	2,34	2,27
	1:400	1,17	1,13
B	1:50		18,17
	1:100	9,09	8,9
	1:200	4,54	4,25
	1:400	2,27	2,11

Spike-Wiederfindung

Zwei Serumproben wurden mit unterschiedlichen Calprotectinkonzentrationen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Probe ungespikt [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
1	4,29	8,36	12,65	11,39
	4,25	13,19	17,44	16,41
	4,21	16,83	21,04	19,32
	4,13	24,12	28,25	27,21
2	7,35	8,36	15,71	15,42
	7,28	13,19	20,47	20,27
	7,21	16,83	24,04	23,98
	7,08	24,12	31,20	30,27

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit MPR 8/14 im Mausserum gefunden.

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Plasmaproteinen gefunden:

• Lysozym	0%
• PMN-Elastase	0%
• Myeloperoxidase	0%
• Laktoferrin	0%

Rückführbarkeit

Die Standards des IDK® Calprotectin ELISA basieren auf rekombinantem humanem Calprotectin, das gegen aufgereinigtes MRP8/14 aus humanen Granulozyten kalibriert wurde.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller 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.

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Stríz, I. & Trebichavský, I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **53**, 245–53 (2004).
2. Yui, S., Nakatani, Y. & Mikami, M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* **26**, 753–60 (2003).
3. Odink, K. et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**, 80–2 (1987).
4. Wilkinson, M. M. et al. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *Journal of cell science* **91** (Pt 2), 221–30 (1988).
5. Müller, F., Frøland, S. S., Aukrust, P. & Fagerhol, M. K. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **7**, 931–9 (1994).
6. Hermani, A. et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 5146–52 (2005).

Literatur mit IDK® Calprotectin ELISA

7. Heller, F., Frischmann, S., Grünbaum, M., Zidek, W. & Westhoff, T. H. Urinary calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **6**, 2347–55 (2011).
8. Lönnkvist, M. H., Theodorsson, E., Holst, M., Ljung, T. & Hellström, P. M. Blood chemistry markers for evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease during infliximab therapy. *Scandinavian journal of gastroenterology* **46**, 420–7 (2011).
9. Börekçi, B., Aksoy, H., Öztürk, N. & Kadanali, S. Correlation between Calprotectin and Oxidized LDL in Preeclampsia. *Turkish Journal of Medical Sciences* **39**, 191–195 (2009).

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



In-Vitro-Diagnostikum



Hersteller



Chargenbezeichnung



Achtung



Bestellnummer



Zu verwenden mit



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Verwendbar bis

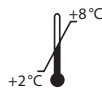


Gebrauchsanweisung beachten

IDK[®] Calprotectin ELISA

***For the in vitro determination of calprotectin (MRP 8/14,
S100A8/A9) in serum and plasma***

Gültig ab / Valid from 2018-06-19



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE _____ 17

2. INTRODUCTION _____ 17

3. MATERIAL SUPPLIED _____ 18

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____ 19

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS _____ 19

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION _____ 20

7. ASSAY PROCEDURE _____ 21

Principle of the test _____ 21

Test procedure _____ 21

8. RESULTS _____ 22

9. LIMITATIONS _____ 23

10. QUALITY CONTROL _____ 23

Reference range _____ 24

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____ 24

Precision and reproducibility _____ 24

Specificity _____ 24

Analytical Sensitivity _____ 24

Spiking Recovery _____ 25

Dilution recovery _____ 25

Traceability _____ 25

12. PRECAUTIONS _____ 26

13. TECHNICAL HINTS _____ 26

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____ 26

15. REFERENCES _____ 27

General literature _____ 27

Literature using IDK® Calprotectin ELISA _____ 27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of calprotectin (MRP (8/14, S100A8/A9) in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Alternative names of calprotectin:

- MRP8/14, L1, (p8,14), p34, S100 A8/A9

Alternative names of the two proteins forming the heterocomplex calprotectin:

- S100A8, Calgranulin A, MRP8 (Migration inhibition factor-related protein-8), CP-10 (in mouse)
- S100A9, Calgranulin B, MRP14 (Migration inhibition factor-related protein-14)

Calprotectin is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. The heterocomplex consists of the two proteins, S100A8 (calgranulin A) and S100A9 (calgranulin B), also designated as MRP8 and MRP14, respectively. Expression of S100A8 and S100A9 in epithelial tissues was first described in context with squamous epithelia and with murine and human wound repair. More recently, an association of S100 protein expression with adenocarcinomas in humans has emerged. The genes S100A8 and S100A9 are located in a gene cluster on chromosome 1q21, a region in which several rearrangements that occur during tumor development have been observed.

Elevated MRP8/14 levels have been found in many sites of inflammation and in the extracellular fluid of patients with many types of inflammatory conditions. The concentration of MRP8/14 in blood is increased in patients with rheumatoid arthritis, cystic fibrosis, multiple sclerosis, and HIV infections, while elevated MRP8/14 levels have been detected in stool of patients with Crohn's disease and colorectal cancer [1-5]. Extracellular MRP8/14 has antimicrobial, antigrowth and apoptotic effects. It suppresses the growth of some fungi and bacteria [1,2]. It also suppresses the proliferation of several different types of cells including: macrophages, lymphocytes, hematopoietic progenitors, and tumor cell lines. MRP8/14 can also induce apoptosis of some tumor cell lines [1,2].

Hermani et al. (2005) [6] reported that enhanced expression of S100A8 and S100A9 is an early event in prostate tumor genesis and may contribute to development and progression or extension of prostate carcinomas. Furthermore, they tested the value of S100A9 as a serum marker for prostate cancer comparing the serum concentrations of S100A9 in cancer patients with healthy controls or patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). Significantly increased S100A9 serum levels in prostate

cancer were found in prostate cancer patients compared to patients with BPH, the latter exhibiting values similar to that obtained for healthy individuals.

Pathological significance and clinical application

The diagnostic value and advantage of MRP8/14 over other disease markers is that they are preformed and released immediately upon activation of the respective cell population. Other markers may be generated in downstream events or need to be synthesised de novo in the liver. Various conditions have shown significant correlation of MRP8/14 (or MRP8, MRP14) levels with disease activity:

- Concentrations of MRP8/14 in serum, and particularly in synovial fluid, correlate strongly with disease activity in rheumatoid arthritis.
- Plasma MRP8/14 levels are very early, specific and sensitive prediction markers for acute rejection in kidney allograft transplantation.
- Serum MRP8/14 concentration is a prognostic marker of recurrent infection and survival in alcoholic liver cirrhosis.
- MRP8/14 is useful for evaluating the extent of periodontal inflammation.
- In cerebral malaria, MRP 8/14 expression correlates with microglial activation in brain.
- MRP8/14 is present in urinary stones and in dental calculus.
- S100A9 in serum may serve as a useful marker for discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH).

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6935	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 6935	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6935	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6935	STD	Calprotectin standards, ready-to-use (0; 3,9; 15,6; 62,5; 250 ng/ml)	1 x 5 vials
K 6935	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6935	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6935	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6935	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6935	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Preanalytic handling

Significant differences in the calprotectin levels can be observed due to different sample preparation procedures, e. g. up to 10-fold higher serum levels compared to the plasma calprotectin concentrations. The reasons are as follows:

Granulocytes are activated during serum clotting and release granulocyte-activating markers. The time between serum collecting and analysis as well as repeated freeze-thaw cycles don't cause a calprotectin concentration shift.

On the contrary, in the case of plasma samples, varying the time between sampling and analysis or the number of freeze-thaw cycles will cause variation in the observed calprotectin levels. Therefore, the preanalytical conditions of plasma samples should be held constant. This is a general requirement independent of the used test-system. Immundiagnostik AG recommends the use of serum samples for calprotectin determinations.

Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.

Serum samples

Serum samples must be diluted **1:100 with sample dilution buffer** (SAMPLEBUF) before performing the assay, e. g.

50 µl sample + 450 µl SAMPLEBUF = **dilution I (1:10)**

50 µl dilution I + 450 µl SAMPLEBUF = **dilution II (1:10)**

Final dilution 1:100

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** per well.

Plasma samples

EDTA plasma samples must be diluted **1:30 with sample dilution buffer** (SAMPLEBUF) before performing the assay, e. g.

20 µl sample + 580 µl SAMPLEBUF).

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of calprotectin (MRP (8/14, S100A8/A9). The assay utilises the two-site sandwich technique with two selected monoclonal antibodies that bind to human calprotectin.

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human calprotectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human calprotectin antibody. During the first incubation step, calprotectin in the samples is bound by the immobilised antibody. Then a peroxidase labelled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human calprotectin – peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the calprotectin concentration of sample.

A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Calprotectin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15–30 °C).
3.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

4.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15–30 °C).
6.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
8.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30 °C) in the dark .
9.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the „4 parameter algorithm“.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the 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 the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

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

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.

Serum

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 100** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

EDTA plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 30** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

Reference range

Calprotectin in serum of healthy persons: < 3 µg/ml (< 3000 ng/ml)

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 80)

Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	447.7	3.7
2	784.6	7.9

Inter-Assay (n = 10)

Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	485.28	5.5
2	816.11	7.0

Specificity

No cross-reactivity with MPR 8/14 in mouse serum was observed.

No cross-reactivity was observed to the following plasma proteins:

- Lysozyme 0%
- PMN-Elastase 0%
- Myeloperoxidase 0%
- Lactoferrin 0%

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0,52 ng/ml

Limit of detection, LoD 0,78 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 0,78 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI-Guideline:EP-17-A.

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different calprotectin concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Sample unspiked [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
1	4.29	8.36	12.65	11.39
	4.25	13.19	17.44	16.41
	4.21	16.83	21.04	19.32
	4.13	24.12	28.25	27.21
2	7.35	8.36	15.71	15.42
	7.28	13.19	20.47	20.27
	7.21	16.83	24.04	23.98
	7.08	24.12	31.20	30.27

Dilution recovery

Two serum samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
A	1:50		9.34
	1:100	4.67	4.53
	1:200	2.34	2.27
	1:400	1.17	1.13
B	1:50		18.17
	1:100	9.09	8.9
	1:200	4.54	4.25
	1:400	2.27	2.11

Traceability

The standards of the IDK® Calprotectin ELISA are based on recombinant human calprotectin which has been calibrated against purified MRP8/14 derived from human granulocytes.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Quality control guidelines should be followed.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.

- 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 should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General literature

1. Stríz, I. & Trebichavský, I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **53**, 245–53 (2004).
2. Yui, S., Nakatani, Y. & Mikami, M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* **26**, 753–60 (2003).
3. Odink, K. et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**, 80–2 (1987).
4. Wilkinson, M. M. et al. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *Journal of cell science* **91** (Pt 2), 221–30 (1988).
5. Müller, F., Frøland, S. S., Aukrust, P. & Fagerhol, M. K. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **7**, 931–9 (1994).
6. Hermani, A. et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 5146–52 (2005).

Literature using IDK® Calprotectin ELISA

7. Heller, F., Frischmann, S., Grünbaum, M., Zidek, W. & Westhoff, T. H. Urinary calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **6**, 2347–55 (2011).

8. Lönnkvist, M. H., Theodorsson, E., Holst, M., Ljung, T. & Hellström, P. M. Blood chemistry markers for evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease during infliximab therapy. *Scandinavian journal of gastroenterology* **46**, 420–7 (2011).

9. Börekçi, B., Aksoy, H., Öztürk, N. & Kadanali, S. Correlation between Calprotectin and Oxidized LDL in Preeclampsia. *Turkish Journal of Medical Sciences* **39**, 191–195 (2009).

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use