

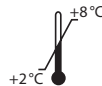
IDK[®] Calprotectin ELISA Kit

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

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

Gültig ab / Valid from 2015-03-11

REF K 6928



IVD CE



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Calprotectin-ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14, S100A8/A9) in Urin. 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 heterodimerer Komplex, der aus den Kalzium-bindenden Proteinen S100A8 und S100A9 besteht. Calprotectin wird gewebespezifisch von Zellen der myeloiden Reihe exprimiert, z.B. von Monozyten, Neutrophilen und nicht ausdifferenzierten Makrophagen. Allerdings können geeignete Botenstoffe die Expression von Calprotectin auch in reifen Makrophagen, Osteoklasten, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen induzieren (Foell, Roth, 2004).

Calprotectin ist ein Teil der angeborenen Immunität und an der Leukozytenadhäsion und -diapedese an aktivierten Endothelzellen beteiligt. Zusätzlich spielt es eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen im Rahmen von chronischen Entzündungen, wobei in letzter Zeit verstärkt die Beteiligung von Calprotectin an entzündungsassoziiierter Krebsentstehung untersucht wird (Gebhardt et al., 2006).

Tatsächlich wird Calprotectin in vielen Tumoren verstärkt exprimiert, so z.B. bei Krebserkrankungen von Magen, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse, Harnblase, Eierstock, Schilddrüse, Brust und Haut. Calprotectin stammt dabei sowohl von den Tumorzellen selbst wie auch von Immunzellen, die das Tumorstroma infiltrieren (Srikrishna, 2012).

Indikationen

- Nachweis von Urothelzellkarzinom der Blase

Ausschlusskriterien

- Akutes Nierenversagen, Nierentransplantation, Harnwegsinfektion, Pyurie, frühere BCG-Behandlung, transurethrale Nachresektion des Blasentumors

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6928	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6928	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6928	SAMPLEBUF	Probenverdünnungsspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6928	STD	Calprotectin-Standards, lyophilisiert (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6928	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6928	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6928	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	15 ml
K 6928	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6928	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	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 (≤ 18,2 MΩ cm).

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 4x 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Urinproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:10 mit Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes Calprotectin erkennen, verwendet.

Teststandards, 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 entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, mit der die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Pipettierschema

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.	Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30°C) bringen, gut mischen.
2.	Positionen für STD / SAMPLE / CTRL (Standard / Probe / Kontrollen) im Protokollblatt markieren .
3.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.
4.	100 µl STD / SAMPLE / CTRL in die Mikrotiterstreifen 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 Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
8.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15–30°C) inkubieren.

9.	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.
10.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
11.	10–20 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren*.
12.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
13.	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.

Urinproben

Der ermittelte Calprotectin-Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor **10** multipliziert. 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

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

- Der Median von Calprotectin im Harn bei gesunden Erwachsenen ist ca. 51 ng/ml (Quartilsabstand 20,5–86,6 ng/ml).
- Ein Cut-off von 140 ng/ml Calproectin im Harn differenziert am besten zwischen urotheliale Karzinom und gesunden Kontrollen (s. Ebbing et al.).

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 27)

Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	416,1	6,499
2	123,9	5,257

Inter-Assay (n = 12)

Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	2289,7	10,7
2	202,6	12,0

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Calprotectinmengen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
A	18,5	25	43,5	47,1
	18,5	12,5	31	30,1
	18,5	6,25	24,7	23,2
	18,5	3,125	21,6	20,2
B	43,6	25	68,6	73,1
	43,6	12,5	56,1	56,3
	43,6	6,25	49,8	49,6
	43,6	3,125	46,7	45,8

Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 0,987 ng/ml.

Die Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 1,132 ng/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Proteinen gefunden:

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

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden 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	1:10		1544,1
	1:20	772	733,5
	1:40	386	354,4
	1:80	193	175,0
	1:160	96	75,4
B	1:10		4334,5
	1:20	2167	2180,9
	1:40	1083	1048,9
	1:80	541	489,1
	1:160	270	223,7

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.

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 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.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Foell, Dirk, and Johannes Roth. 2004. "Proinflammatory S100 Proteins in Arthritis and Autoimmune Disease." *Arthritis and Rheumatism* **50** (12) (December): 3762–71. doi:10.1002/art.20631.
2. Gebhardt, Christoffer, Julia Németh, Peter Angel, and Jochen Hess. 2006. "S100A8 and S100A9 in Inflammation and Cancer." *Biochemical Pharmacology* **72** (11) (November 30): 1622–31. doi:10.1016/j.bcp.2006.05.017.
3. Srikrishna, Geetha. 2012. "S100A8 and S100A9: New Insights into Their Roles in Malignancy." *Journal of Innate Immunity* **4** (1) (January): 31–40. doi:10.1159/000330095.

Literatur mit dem Immundiagnostik Calprotectin ELISA

4. Ebbing, Jan, Susanne Mathia, Felix S Seibert, Nikolaos Pagonas, Frederic Bauer, Barbara Erber, Karsten Günzel, et al. 2013. "Urinary Calprotectin: A New Diagnostic Marker in Urothelial Carcinoma of the Bladder." *World Journal of Urology* [Epub ahead of print]. doi:10.1007/s00345-013-1227-8.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

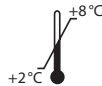
Manual

IDK[®] Calprotectin ELISA Kit

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

Gültig ab / Valid from 2015-03-11

REF **K 6928**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Precision and reproducibility</i>	20
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	22
<i>Specificity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24
<i>General literature</i>	24
<i>Literature using Immundiagnostik Calprotectin ELISA</i>	24

1. INTENDED USE

The described calprotectin ELISA is intended for the quantitative determination of calprotectin (MRP (8/14, S100A8/A9) in urine. 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 heterodimeric complex, which consists of the calcium-binding proteins S100A8 and S100A9. It is expressed in a tissue-specific manner mainly in cells of the myeloid lineage, including monocytes, neutrophils and early differentiation states of macrophages. However, expression of calprotectin is also inducible in mature macrophages, osteoclasts, keratinocytes, fibroblasts and microvascular endothelial cells (Foell, Roth, 2004).

Calprotectin is involved in innate immunity, leukocyte adhesion, and endothelial transmigration. In addition, it also emerges as important mediator of diverse processes within chronic inflammation, with recent attention being focused on its involvement in inflammation-associated carcinogenesis (Gebhardt et al., 2006).

Indeed, strong up-regulation of the S100A8/A9 proteins has been observed in many tumors, including gastric, colon, pancreatic, bladder, ovarian, thyroid, breast and skin cancers, with both tumor cells and infiltrating immune cells in the tumor stroma being a source of calprotectin (Srikrishna, 2012).

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6928	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6928	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6928	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 6928	STD	Calprotectin standards, lyophilized (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6928	CTRL 1	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6928	CTRL 2	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6928	CONJ	Conjugate, ready to use	15 ml
K 6928	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6928	STOP	ELISA stop solution, ready to use	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. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at 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.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should 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 stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions.

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 one month**.

- The **lyophilized STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8 °C for four weeks**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Urine samples should be diluted **1:10 with sample dilution buffer** (SAMPLEBUF) before performing the assay.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes 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 immobilized antibody. Then a peroxidase labeled 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 color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the calprotectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Calprotectin present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

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.	Bring all reagents and samples to room temperature (15–30 °C) and mix well.
2.	Mark the positions of STD / SAMPLE / CTRL (standard / samples / controls) on a protocol sheet.
3.	Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.
4.	Add 100 µl of STD / SAMPLE / CTRL into the respective wells.
5.	Cover plate tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (15–30 °C).
6.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
7.	Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well.
8.	Cover plate tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (15–30 °C).
9.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
10.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
11.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30 °C) in the dark*.
12.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly.

- | | |
|-----|---|
| 13. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference. |
|-----|---|

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the 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 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.

Urine

For calculation of calprotectin concentration in urine, the result must be multiplied by the dilution factor of **10**.

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

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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

- The median value of calprotectin in urine in healthy adults is about 51 ng/ml (interquartile range 20.5–86.6 ng/ml).
- A cut-off of 140 ng/ml has been shown to differentiate best between patients with urothelial bladder carcinoma and healthy subjects (Ebbing et al).

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 27)

Sample	Calprotectin [ng/ml]	CV [%]
1	416.1	6.499
2	123.9	5.257

Inter-Assay (n = 12)

Sample	Calprotectin [ng/ml]	CV [%]
1	2289.7	10.7
2	202.6	12.0

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 0,987 ng/ml.

The LoD (limit of detection) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 1,132 ng/ml.

Spiking Recovery

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

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
A	18.5	25	43.5	47.1
	18.5	12.5	31	30.1
	18.5	6.25	24.7	23.2
	18.5	3.125	21.6	20.2
B	43.6	25	68.6	73.1
	43.6	12.5	56.1	56.3
	43.6	6.25	49.8	49.6
	43.6	3.125	46.7	45.8

Dilution recovery

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

Sample	Dilution	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
A	1:10		1544.1
	1:20	772	733.5
	1:40	386	354.4
	1:80	193	175.0
	1:160	96	75.4
B	1:10		4334.5
	1:20	2167	2180.9
	1:40	1083	1048.9
	1:80	541	489.1
	1:160	270	223.7

Specificity

No cross-reactivity was observed to the following proteins:

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

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 color 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 up 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 assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed 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 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.
- The guidelines for medical laboratories 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES









General literature

1. Foell, Dirk, and Johannes Roth. 2004. "Proinflammatory S100 Proteins in Arthritis and Autoimmune Disease." *Arthritis and Rheumatism* **50** (12) (December): 3762–71. doi:10.1002/art.20631.
2. Gebhardt, Christoffer, Julia Németh, Peter Angel, and Jochen Hess. 2006. "S100A8 and S100A9 in Inflammation and Cancer." *Biochemical Pharmacology* **72** (11) (November 30): 1622–31. doi:10.1016/j.bcp.2006.05.017.
3. Srikrishna, Geetha. 2012. "S100A8 and S100A9: New Insights into Their Roles in Malignancy." *Journal of Innate Immunity* **4** (1) (January): 31–40. doi:10.1159/000330095.

Literature using Immundiagnostik Calprotectin ELISA

4. Ebbing, Jan, Susanne Mathia, Felix S Seibert, Nikolaos Pagonas, Frederic Bauer, Barbara Erber, Karsten Günzel, et al. 2013. "Urinary Calprotectin: A New Diagnostic Marker in Urothelial Carcinoma of the Bladder." *World Journal of Urology* [Epub ahead of print]. doi:10.1007/s00345-013-1227-8.

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