

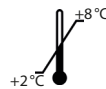
IDK[®] Calprotectin ELISA

*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 2019-01-01

REF K 6928



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenvorbereitung</i>	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>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	9
<i>Linearität</i>	10
<i>Rückführbarkeit</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12
<i>Allgemeine Literatur</i>	12
<i>Literatur mit dem Immundiagnostik Calprotectin ELISA</i>	12

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 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6928	SAMPLEBUF	Probenverdünnungsspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6928	STD	Calprotectin-Standards, gebrauchsfertig (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	1 x 5 vials
K 6928	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6928	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 6928	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	15 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 0003.15	STOP	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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG 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 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 (100ml 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Calprotectin ist in unverdünntem Urin bei -20 °C für 14 Monate stabil.

Probenvorbereitung

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin. Er 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 – Peroxidasekonjugat. 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 Calprotectingehalt 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

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.	Je 100 µl Standards/Kontrollen/Proben in die Mikrotiterstreifen 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 alle Vertiefungen 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 alle Vertiefungen pipettieren.
8.	10–20 min bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren*.
9.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen 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.

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) können 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 Calprotectin 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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=27

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Urinproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	4456,5	6,2
2	4160,7	6,5
3	1238,9	5,3

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=11

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Urinproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	2368,5	8,1
2	211,2	7,7
3	524,4	5,8
4	5133,7	12,5

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,985 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 1,509 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 1,509 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Urinproben wurden dafür mit bekannten Calprotectin-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
18,6	233,0	251,6	294,2	116,9
	116,5	135,1	155,1	114,8
	58,3	76,8	84,0	109,4
	29,1	47,7	47,1	98,8
	14,6	33,1	30,1	90,7
	7,3	25,9	23,3	90,1
	3,6	22,2	20,2	91,0
43,7	233,0	276,7	313,3	113,2
	116,5	160,2	182,8	114,1
	58,3	101,9	110,1	108,0
	29,1	72,8	73,1	100,5
	14,6	58,2	56,3	96,7
	7,3	50,9	49,6	97,4
	3,6	47,3	45,9	97,0

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Lysozyme	10 000	< 0,985	< LoB
PMN Elastase	1 000	2,003	0,2%
MPO	10 000	< 0,985	< LoB
Laktoferrin	100 000	< 0,985	< LoB

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Urinproben nachgewiesen.

Für Calprotectin in Urin wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 10,25 bis 508,70 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:20	508,70	508,70	100,00
	1:40	254,35	285,38	112,20
	1:80	127,18	154,41	121,42
	1:160	63,59	73,35	115,35
	1:320	31,79	35,44	111,48
	1:640	15,90	17,51	110,13
B	1:10	433,46	433,46	100,00
	1:20	216,73	218,10	100,63
	1:40	108,36	104,89	96,80
	1:80	54,18	48,91	90,28
	1:160	27,09	22,38	82,60
	1:320	13,55	10,25	75,71

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 emp-

fohlen, 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 beigelegten 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. 2014. "Urinary Calprotectin: A New Diagnostic Marker in Urothelial Carcinoma of the Bladder." *World Journal of Urology* **32** (6): 1485–92. doi:10.1007/s00345-013-1227-8.

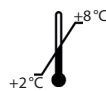
Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

IDK[®] Calprotectin ELISA

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

Valid from 2019-01-01



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample storage</i>	19
<i>Sample preparation</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	21
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Linearity</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Traceability</i>	24
<i>Analytical specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26
<i>General literature</i>	26
<i>Literature using Immundiagnostik Calprotectin ELISA</i>	27

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).

Indications

- Detection of urothelial (transitional cell) carcinoma of the bladder

Exclusion criteria

- Acute kidney injury, renal transplantation, urinary tract infection, pyuria, previous BCG treatment, secondary transurethral resection of the bladder tumor

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6928	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0001.C.100	WASHBUF	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, ready-to-use (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	1 x 5 vials
K 6928	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6928	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 vial
K 6928	CONJ	Conjugate, ready-to-use	15 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	15 ml
K 0003.15	STOP	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 single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use 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 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.
- 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)** 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. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Calprotectin is stable in undiluted urine for 14 months at -20°C.

Sample preparation

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of Calprotectin. 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 the 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 the 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/samples into the respective wells.
2.	Cover plate tightly and incubate for 30 minutes 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 plate tightly and incubate for 30 minutes 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 min at room temperature (15–30 °C) in the dark* .
9.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.
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 observing the colour change and stopping 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 by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can 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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=27

The repeatability was assessed with 3 urine samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	4456.5	6.2
2	4160.7	6.5
3	1238.9	5.3

Reproducibility (Inter-Assay); n=11

The reproducibility was assessed with 4 urine samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	2368.5	8.1
2	211.2	7.7
3	524.4	5.8
4	5133.7	12.5

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, calprotectin spikes with known concentrations were added to 2 different urine samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
18.6	233.0	251.6	294.2	116.9%
	116.5	135.1	155.1	114.8%
	58.3	76.8	84.0	109.4%
	29.1	47.7	47.1	98.8%
	14.6	33.1	30.1	90.7%
	7.3	25.9	23.3	90.1%
	3.6	22.2	20.2	91.0%
43.7	233.0	276.7	313.3	113.2%
	116.5	160.2	182.8	114.1%
	58.3	101.9	110.1	108.0%
	29.1	72.8	73.1	100.5%
	14.6	58.2	56.3	96.7%
	7.3	50.9	49.6	97.4%
	3.6	47.3	45.9	97.0%

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 2 different urine samples.

For calprotectin urine, the method has been demonstrated to be linear from 10.25 to 508.70 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:20	508.70	508.70	100.00
	1:40	254.35	285.38	112.20
	1:80	127.18	154.41	121.42
	1:160	63.59	73.35	115.35
	1:320	31.79	35.44	111.48
	1:640	15.90	17.51	110.13
B	1:10	433.46	433.46	100.00
	1:20	216.73	218.10	100.63
	1:40	108.36	104.89	96.80
	1:80	54.18	48.91	90.28
	1:160	27.09	22.38	82.60
	1:320	13.55	10.25	75.71

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 0.985 ng/ml

Limit of detection, LoD 1.509 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 1.509 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

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.

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to calprotectin. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added [ng/ml]	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
Lysozyme	10 000	< 0.985	< LoB
PMN Elastase	1 000	2.003	0.2 %
MPO	10 000	< 0.985	< LoB
Laktoferrin	100 000	< 0.985	< LoB

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 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 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.
- 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 sent 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. 2014. "Urinary Calprotectin: A New Diagnostic Marker in Urothelial Carcinoma of the Bladder." *World Journal of Urology* **32** (6): 1485–92. 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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		