



Instructions for Use

Calprotectin (Serum) ELISA

IVD



REF EIA-5111

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	2
2	INTRODUCTION.....	2
3	MATERIAL SUPPLIED.....	3
4	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	3
5	PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS.....	3
6	STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES.....	4
7	ASSAY PROCEDURE.....	4
8	RESULTS.....	5
9	LIMITATIONS.....	6
10	QUALITY CONTROL.....	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	6
12	PRECAUTIONS.....	8
13	TECHNICAL HINTS.....	8
14	GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	EINLEITUNG.....	9
3	INHALT DER TESTPACKUNG.....	10
4	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL.....	10
5	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	10
6	PROBENVORBEREITUNG.....	11
7	TESTDURCHFÜHRUNG.....	11
8	ERGEBNISSE.....	12
9	EINSCHRÄNKUNGEN.....	13
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
11	TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
12	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	15
13	TECHNISCHE MERKMALE.....	15
14	ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST.....	15
15	REFERENCES / LITERATURE / LITERATURE.....	16
	SYMBOLS USED.....	17

1 INTENDED USE

This 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 synthesized *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

Content	Kit Components	Quantity
PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
WASHBUF	Wash buffer concentrate 10x	2 x 100 mL
SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 mL
STD	Calprotectin standards, ready to use (0; 3,9; 15,6; 62,5; 250 ng/mL)	1 x 5 vials
CTRL 1	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 1 vial
CTRL 2	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 1 vial
CONJ	Conjugate, ready to use	1 x 15 mL
SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 mL
STOP	Stop solution, ready to use	1 x 15 mL

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

* DRG recommends the use of Ultrapure 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 < 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5 PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- o To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- o **Preparation of the wash buffer:**
The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure 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 °C - 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 °C - 8 °C for 1 month.**
- o All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2 °C - 8 °C.**

6 STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

6.1 Sample stability and storage

Calprotectin is stable in serum for 4 days at 2 °C to 8 °C as well as for 3 days at room temperature.

At -20 °C, the samples can be stored for up to 2 months. More than 3 freeze thaw cycles are to be avoided.

Calprotectin is not stable in plasma.

6.2 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.

DRG recommends the use of serum samples for calprotectin determinations.

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

6.3 Sample preparation

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

7.1 Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of calprotectin (MRP (8/14, S100A8/A9).

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 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.

7.2 Test procedure

Bring all **reagents and samples** to **room temperature** (15 °C - 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 °C - 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 DRG.

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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 standards 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 procedure of 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 optical density and a logarithmic abscissa for 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 optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for 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) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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:

$$\text{highest concentration of the standard curve} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

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

$$\text{LoB} \times \text{sample dilution factor to be used}$$

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10 QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analyzed 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.

10.1 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

11.1 Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=80

The repeatability was assessed with 2 serum samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/mL]	CV [%]
1	447.7	3.0
2	788.8	3.3

Reproducibility (Inter-Assay); n=27

The reproducibility was assessed with 3 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/mL]	CV [%]
1	484.7	8.6
2	649.8	9.0
3	827.2	7.6

11.2 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 serum 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 [%]
4.4	8.4	12.7	11.4	90.0
	13.2	17.4	16.4	94.1
	16.8	21.0	19.3	91.8
	24.1	28.3	27.2	96.3
7.5	8.4	15.7	15.4	98.1
	13.2	20.5	20.3	99.0
	16.8	24.0	24.0	99.7
	24.1	31.2	30.3	97.0

11.3 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 serum samples.

For calprotectin in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 6.0 to 89.1 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	1:100	89.1	89.1	100.0
	1:200	44.5	45.2	101.4
	1:400	22.3	18.9	85.0
	1:800	11.1	9.2	82.7
B	1:100	61.6	61.6	100.0
	1:200	30.8	30.0	97.4
	1:400	15.4	13.7	88.8
	1:800	7.7	6.0	78.4

11.4 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 0.522 ng/mL

Limit of detection, LoD 0.789 ng/mL

Limit of quantitation, LoQ 0.897 ng/mL

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

11.5 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	< 0.522	< LoB
PMN elastase	1 000	2.003	0.2 %
MPO	10 000	< 0.522	< LoB
Lactoferrin	100 000	< 0.522	< LoB

11.6 Traceability

The standards of the 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 color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulfuric 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colorless 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.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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. DRG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Calprotectin (MRP8/14, 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 Bezeichnungen 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, das hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniert wird. Calprotectin stellt einen Hetero-komplex 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 epitheliale 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 Progenitor-zellen 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 Serumkonzentration 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 Parodontose.
- 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

Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 mL
SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 mL
STD	Calprotectin Standards, gebrauchsfertig (0; 3,9; 15,6; 62,5; 250 ng/mL)	1 x 5 Fläschchen
CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 Fläschchen
CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 Fläschchen
CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	50 µL
SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 mL
STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	15 mL

4 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

* DRG 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 < 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ 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 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist einen Monat bei **2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2 °C - 8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6 PROBENVORBEREITUNG

6.1 Probenstabilität und -lagerung

Calprotectin ist in Serum für 4 Tage bei 2 °C bis 8 °C sowie für 3 Tage bei Raumtemperatur stabil.

Bei -20 °C können die Proben für bis zu 2 Monate aufbewahrt werden. Dabei sind mehr als 3 Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden.

Calprotectin ist in Plasma nicht stabil.

6.2 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 Werteverchiebung.

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.

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

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

6.3 Probenvorbereitung

Serumproben

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

20 µL Probe + 580 µL SAMPLEBUF.

100 µL der **Verdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7 TESTDURCHFÜHRUNG

7.1 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 entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

7.2 Pipettierschema

Vor Gebrauch **Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur** (15 °C - 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 °C - 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 DRG

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1. **Je 100 µL Standards/Kontrollen/verdünnte Proben** in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. Streifen abdecken und **30 min bei Raumtemperatur** (15 °C - 30 °C) inkubieren.
3. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x 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 Vertiefungen pipettieren
5. Streifen abdecken und **30 min bei Raumtemperatur** (15 °C - 30 °C) inkubieren.
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x 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 Minuten bei Raumtemperatur** (15 °C - 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 die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **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) 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:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10 QUALITÄTSKONTROLLE

DRG 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 DRG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

10.1 Referenzwerte

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11 TESTCHARAKTERISTIKA

11.1 Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=80

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/mL]	VK [%]
1	447,7	3,0
2	788,8	3,3

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=27

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/mL]	VK [%]
1	484,7	8,6
2	649,8	9,0
3	827,2	7,6

11.2 Genauigkeit - Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serumproben wurden dafür mit bekannten Calprotectinkonzentrationen 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 [%]
4,4	8,4	12,7	11,4	90,0
	13,2	17,4	16,4	94,1
	16,8	21,0	19,3	91,8
	24,1	28,3	27,2	96,3
7,5	8,4	15,7	15,4	98,1
	13,2	20,5	20,3	99,0
	16,8	24,0	24,0	99,7
	24,1	31,2	30,3	97,0

11.3 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 Serumproben nachgewiesen. Für Calprotectin in Urin wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 6,0 bis 89,1 ng/mL nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/mL]	Gemessen [ng/mL]	Wiederfindung [%]
A	1:100	89,1	89,1	100,0
	1:200	44,5	45,2	101,4
	1:400	22,3	18,9	85,0
	1:800	11,1	9,2	82,7
B	1:100	61,6	61,6	100,0
	1:200	30,8	30,0	97,4
	1:400	15,4	13,7	88,8
	1:800	7,7	6,0	78,4

11.4 Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,522 ng/mL

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,789 ng/mL

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,897 ng/mL

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

11.5 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	< 0,522	< LoB
PMN Elastase	1 000	2,003	0,2 %
MPO	10 000	< 0,522	< LoB
Laktoferrin	100 000	< 0,522	< LoB

11.6 Rückführbarkeit

Die Standards des Calprotectin (Serum) 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 Kitpackung 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.
- 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.
- 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.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma DRG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

15 REFERENCES / LITERATURE / LITERATURE

1. Striz I, Trebichavsky 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. *Biol Pharm Bull* 2003, 26: 753-760.
3. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G *et al.*: Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 1987, 330: 80-82.
4. Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van H, V: Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci* 1988, 91 (Pt 2): 221-230.
5. Muller F, Froland SS, Aukrust P, Fagerhol MK: Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994, 7: 931-939.
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).

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité