

PhiCal[®] Calprotectin ELISA Kit

***Zur in vitro Bestimmung von PhiCal[®] Calprotectin (MRP 8/14) in
Serum, Plasma und Urin***

PhiCal[®] Calprotectin ELISA Kit

***For the in vitro determination of PhiCal[®] Calprotectin (MRP 8/14)
in serum, plasma and urine***

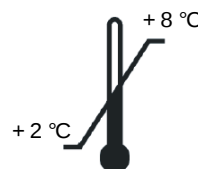
[**PhiCal[®]**: eingetragene deutsche Marke der Immundiagnostik AG]

[Not sold in the USA and Norway]

Gültig ab / valid from 10.01.2011



K 6935



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 / Content

1. Deutsch

2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von **PhiCal®** Calprotectin (MRP8/14) in Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

- Alternative Namen für Calprotectin:
MRP8/14, L1, (p8,14), p34
- 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, dass hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniert wird. Calprotectin stellt einen Heterokomplex dar und setzt sich aus den beiden zur S100-Familie gehörenden Proteinen S100A8 (Calgranulin A, MRP 8) und S100A9 (Calgranulin B, MRP 14) zusammen. Die Expression von S100A8 und S100A9 in epithelialem Gewebe wurde erstmals im Zusammenhang mit Plattenepithelien sowie mit der Wundheilung bei Mensch und Maus beschrieben. Inzwischen wurde eine Verbindung zwischen der Expression von S100-Proteinen und Adenokarzinomen im Menschen nachgewiesen. Die Gene für S100A8 und S100A9 wurden in einem Gen-Cluster auf Chromosom 1q21 lokalisiert, einer Region, in der im Rahmen einer Tumorentstehung Umlagerungen beobachtet wurden.

Erhöhte MRP8/14 Konzentrationen wurden in vielen inflammatorischen Quellen und Extrazellulärflüssigkeiten bei Patienten mit diversen Entzündungskrankheiten gemessen. Bei rheumatoider Arthritis, cystischer Fibrose, multipler Sklerose und HIV-Infektionen wurden erhöhte MRP8/14 Konzentration im Patientenblut nachgewiesen, während bei Morbus Crohn und kolorektalem Karzinom hohe MRP8/14 Werte im Patientenstuhl detektiert wurden [1-5]. Extrazelluläres MRP8/14 hat antimikrobielle, anti-proliferative 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 neulich 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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6935MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6935WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6935A2	AB	Detektionsantikörper (monoklonaler anti-Calprotectin (MRP 8/14), biotinyliert), Konzentrat	50 µl
K 6935ST	STD	Calprotectin Standards, lyophilisiert (0; 3.9; 15.6; 62.5; 250 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6935KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6935KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6935K	CONJ	Konjugat (Extravidin Peroxidase markiert), Konzentrat	50 µl
K 6935TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6935AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter bei 450 oder 405 nm

*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 4 x 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.
- 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. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Der **Detektionsantikörper** (AB) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl AB + 10 ml Waschpuffer pipettieren). Der **unverdünnte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Serum- und Plasmaproben

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 Plasma Konzentrationen. 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.

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

Serumproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:50** mit Waschpuffer verdünnt werden.

EDTA-Plasmaproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:10** mit Waschpuffer verdünnt werden.

Urinproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:10** mit Waschpuffer 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 Patientenseren, 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. Im nächsten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper, ein weiterer monoklonaler anti-human Calprotectin Antikörper (biotinyliert), an das Calprotectin gebunden. Dann wird das Konjugat (Extravidin, Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Calprotectin - Detektionsantikörper (biotinyliert) - 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. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1.	Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2.	Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) in Doppelbestimmung 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.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
7.	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
8.	100 µl AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**

10. 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
11. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
13. 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
14. 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
15. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
16. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
17. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm

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

**Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne schütteln.

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 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).

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

Der ermittelte Calprotectin-Wert wird mit **50** multipliziert.

EDTA-Plasmaproben

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

Urinproben

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Calprotectin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer weiter verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Serumproben

Intra-Assay (n=7)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	878,58	6,16
2	1750,10	4,48
3	877,13	4,90
Inter-Assay (n=13)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	768,62	7,49
2	813,97	10,32
3	1584,67	12,86

EDTA-Plasmaproben

Intra-Assay (n=7)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	269,92	5,28
2	276,35	4,83
3	213,69	4,43
Inter-Assay (n=12)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	201,26	13,23
2	298,37	12,76
3	184,97	13,06

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Calprotectin Standardmengen versetzt und gemessen.

Serumproben

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
24,1	20	44,1	41,3
24,1	30	54,1	50,9
16,5	20	36,5	34,1
16,5	30	46,5	46,1
16,5	40	56,5	53,8

EDTA-Plasmaproben

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
18,9	20	38,9	36,3
18,9	40	58,9	55,8
18,9	60	78,9	74,3
17,1	40	57,1	60,6
17,1	60	77,1	74,9
17,1	80	97,1	94,8

Sensitivität**Serum- und EDTA-Plasmaproben**

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Calprotectin Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0,040	0,052	3,2

Linearität

Zwei Patientenproben wurden mit Waschpuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Serumproben (n= 2)

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:50	1425,38	1425,38
	1:100	712,69	744,54
	1:200	356,34	355,33
B	1:50	1026,11	1026,11
	1:100	513,05	502,04
	1:200	256,52	256,91

EDTA-Plasmaproben (n= 2)

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:10	244,29	244,29
	1:20	122,14	115,10
	1:40	61,10	57,67
B	1:10	374,54	374,54
	1:20	187,30	186,93
	1:40	93,65	97,98

Kreuzreaktivität

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

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Plasmaproteinen gefunden:

Lysozym - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Laktoferrin - 0%

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- 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.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien muss vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im 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.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG - zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Striz I, Trebichavsky I: **Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation.** *Physiol Res* 2004, **53**: 245-253.
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.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 5146-5152.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

PhiCal® Calprotectin ELISA Kit

***For the in vitro determination of PhiCal® Calprotectin (MRP 8/14)
in serum, plasma and urine***

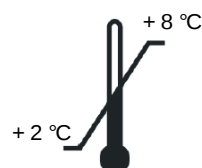
Valid from 10.01.2011

[**PhiCal®**: registered German trademark of Immundiagnostik AG]

[Not sold in the USA and Norway]



K 6935



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for quantitative determination of **PhiCal®** Calprotectin (MRP8/14) in serum, plasma and urine. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

- Alternative names of calprotectin:
MRP8/14, L1, (p8,14), p34
- 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 recently 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

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6935MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6935WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6935A2	AB	Detection antibody, (monoclonal anti-Calprotectin (MRP 8/14) antibody, biotinylated), concentrate	50 µl
K 6935ST	STD	Calprotectin standards, lyophilized (0; 3.9; 15.6; 62.5; 250 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6935KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6935KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6935K	CONJ	Conjugate, (extravidin peroxidase labeled, concentrate)	50 µl
K 6935TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6935AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm

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

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run 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.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA 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 at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** 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. 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.**
- The **detection antibody** (AB) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10 µl AB + 10 ml wash buffer). The antibody is stable at **2-8 °C** until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The antibody is stable at **2-8°C** until expiry date given on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and Plasma samples

Preamalytic handling

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

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

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

Immundiagnostik recommends the use of serum samples for calprotectin determinations.

Serum samples should be diluted **1:50** with wash buffer before assaying.

EDTA Plasma samples should be diluted **1:10** with wash buffer before assaying.

Urine samples should be diluted **1:10** with wash buffer before assaying.

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. In a next incubation step, a biotinylated monoclonal anti-human Calprotectin antibody is added to each microtiter well. Then a peroxidase labeled extravidin conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Calprotectin – biotinylated detection antibody - 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 at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Calprotectin present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Controls) in duplicate 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. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
7. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
8. Add 100 µl AB (detection antibody) into each well
9. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**

10. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11. Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well
12. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
13. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of wash buffer into each well. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
14. Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
15. Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
16. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
17. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

*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.

**The above incubation steps at 37 °C on a horizontal mixer are recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 37 °C, while shaking, we recommend to incubate at 37 °C without any shaking.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 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).

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

For calculation of calprotectin concentration in serum, the result must be multiplied by **50**.

EDTA Plasma

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

Urine

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

9. LIMITATIONS

Samples with Calprotectin levels greater than the highest standard value, should be further diluted with wash buffer, and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

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.

Expected values

Normal range

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Serum samples

Intra-Assay (n=7)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	878,58	6,16
2	1750,10	4,48
3	877,13	4,90
Inter-Assay (n=13)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	768,62	7,49
2	813,97	10,32
3	1584,67	12,86

EDTA Plasma samples

Intra-Assay (n=7)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	269,92	5,28
2	276,35	4,83
3	213,69	4,43
Inter-Assay (n=12)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	201,26	13,23
2	298,37	12,76
3	184,97	13,06

Recovery

Two samples were spiked with different Calprotectin standards and measured using this assay.

Serum samples

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
24,1	20	44,1	41,3
24,1	30	54,1	50,9
16,5	20	36,5	34,1
16,5	30	46,5	46,1
16,5	40	56,5	53,8

EDTA Plasma samples

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
18,9	20	38,9	36,3
18,9	40	58,9	55,8
18,9	60	78,9	74,3
17,1	40	57,1	60,6
17,1	60	77,1	74,9
17,1	80	97,1	94,8

*Sensitivity***Serum and EDTA Plasma samples**

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Calprotectin mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0,040	0,052	3,2

Linearity

Two patient samples were diluted with wash buffer and analyzed. The results are shown below:

Serum samples (n= 2)

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:50	1425,38	1425,38
	1:100	712,69	744,54
	1:200	356,34	355,33
B	1:50	1026,11	1026,11
	1:100	513,05	502,04
	1:200	256,52	256,91

EDTA Plasma samples (n= 2)

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:10	244,29	244,29
	1:20	122,14	115,10
	1:40	61,10	57,67
B	1:10	374,54	374,54
	1:20	187,30	186,93
	1:40	93,65	97,98

Cross-reactivity

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

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

Lysozyme - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Lactoferrin - 0%

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution contains sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Striz I, Trebichavsky I: **Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation.** *Physiol Res* 2004, **53**: 245-253.
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, Busuttil 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.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 5146-5152.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number