

## 1 INTENDED USE

The **CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)** is a quantitative method for the determination of Calprotectin in stool samples and can thus be used as an aid in identifying organic disease of the small intestine, large bowel, or the stomach in patients, to determine the disease activity and monitor the response to treatment in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease.

The **CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)** has been validated for stool samples.

**The test is for *in vitro* diagnostic use.**

## 2 BACKGROUND

Various types of organic diseases in the gastrointestinal tract may cause damage to the intestinal epithelial lining (mucosa layer). Such damage may vary from increased permeability of the mucosa to inflammation and ulcerations. The bowel content is rich in bacteria and other microorganisms releasing substances which may be toxic or chemotactic, i.e. they stimulate leukocytes, in particular polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMN), to migrate into the gut lumen where they release their contents including antimicrobial substances like Calprotectin. This protein constitutes about 60% of total proteins in the cytoplasm of PMNs <sup>2)</sup> and can be reliably estimated in faecal samples stored for up to seven days at ambient temperature <sup>3)</sup>.

Calprotectin is a 36 kilodalton calcium and zinc-binding protein <sup>4)</sup>, produced by PMNs, monocytes and squamous epithelial cells (except those in normal skin) <sup>5,6)</sup>. After binding of calcium, it can resist degradation by leukocytic and microbial enzymes <sup>3,7)</sup>. By competing with different enzymes for limited, local amounts of zinc, Calprotectin can inhibit many zinc-dependent enzymes <sup>8)</sup> and thereby kill microorganisms or animal and human cells in culture <sup>9,10)</sup>. Different types of disease, for instance bacterial infections, rheumatoid arthritis and cancer, lead to activation of PMNs and increased levels of Calprotectin in plasma, cerebrospinal fluid, synovial fluid, crevicular fluid, urine or other human materials <sup>1)</sup>.

It is of special importance that the concentration of Calprotectin in faeces is correlated with the number of PMNs migrating into the gut lumen <sup>11)</sup>, and that it can be detected reliably even in small (less than one gram) random stool samples <sup>3,12)</sup>. Furthermore, organic diseases of the bowel give a strong Calprotectin signal, i.e. elevations are regularly five to several thousand times the upper reference in healthy individuals <sup>3,13,14,15)</sup>, indicating intestinal inflammation.

Inflammatory bowel diseases (IBD), i.e. ulcerative colitis and Crohn's disease, may appear from early childhood to late adulthood and the diagnosis is often delayed due to vague symptoms or reluctance to perform endoscopy and biopsy. The **CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)** can contribute to an earlier diagnosis of IBD since the test is usually positive in active IBD.

Functional disorders like irritable bowel syndrome (IBS) do not give increased faecal Calprotectin concentrations, but organic abdominal disorders like IBD do. Patients with organic and functional abdominal disorders may have similar symptoms, and clinical examination alone may not be sufficient to give a specific diagnosis. Further diagnostic procedures are complex, expensive and may expose the patient to pain and other risks. A test for faecal Calprotectin is a simple, non-invasive, inexpensive and objective method that can help selecting patients for additional examination like endoscopy. Abdominal symptoms are very common both in children and adults and a negative result as measured by the **CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)** can with high probability rule out inflammatory bowel disorders <sup>13)</sup>.

Mucosal healing is the optimal goal for IBD treatment, and a test for faecal Calprotectin can tell when this has been achieved. Many IBD patients in clinical remission with normal C-reactive protein (CRP) levels still have on-going inflammation <sup>16)</sup>, reflected by increased faecal Calprotectin. Such patients have increased risk of relapse within a few months <sup>17)</sup>. If mucosal healing can be achieved, the risk of relapse and need for major abdominal surgery will be reduced <sup>18,19)</sup>. Normalisation of Calprotectin levels means that mucosal healing has been achieved <sup>20)</sup>. The risk and severity of side effects to treatment should be balanced against the risk of continued inflammation, severe clinical relapse and complications.

The importance of achieving mucosal healing has been the focus of many scientific reviews <sup>21-29)</sup> and articles <sup>30-35)</sup>.

### 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP) is based upon preparation of an extract of faeces using our patented Faecal Extraction Buffer. The level of Calprotectin is determined by testing the extract in an enzyme-linked immunoassay (ELISA) specific for Calprotectin.

In the ELISA, samples and standards are incubated in separate microtiter wells coated with monoclonal antibodies which bind Calprotectin. After incubation and washing of the wells, bound Calprotectin is allowed to react with enzyme-labelled, immunoaffinity-purified Calprotectin-specific antibodies. After this reaction, the amount of enzyme bound in the microtiter wells is proportional to the amount of Calprotectin in the sample or standard, which is determined by incubation with a substrate for the enzyme giving a coloured product. The colour intensity is determined by absorbance using an ELISA plate reader and is proportional with the concentration of Calprotectin in the standards and samples. The assay is calibrated using Calprotectin purified from leukocyte extract.

### 4 MATERIALS

#### 4.1 Reagents and components supplied with the kit

- **MTP** **Coated microtiterplate:** 12 strips, 8 wells per strip, coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. The plate is stored in a sealed bag with desiccant.
- **DIL 5x** **Sample Dilution Buffer (5x conc.)** \*\*\*: 1 x 20 mL, 5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, yellow coloured solution, bottle with blue cap.
- **WASH|BUF 20x** **Washing Solution (20x conc.)** \*: 1 x 50 mL, 20x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water, for washing the microtiter wells; pH 7.8 ± 0.2, clear solution, bottle with white cap.
- **FEC|EXTR|BUF 2,5x** **Faecal Extraction Buffer (2.5x conc.)** \*\*: 2 x 90 mL, 2.5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, clear solution, bottles with white caps.
- **CAL|A - F** **Calprotectin Standards** \*\*\*: 6 vials with 1.0 mL, ready to use; yellow coloured solution, vials with different coloured caps:
 

Standard A: Blue cap	0	ng/mL
Standard B: Green cap	7.8	ng/mL
Standard C: Yellow cap	31.3	ng/mL
Standard D: Red cap	62.5	ng/mL
Standard E: White cap	125	ng/mL
Standard F: Black cap	500	ng/mL
- **CTR|LOW|CTR|HIGH** **Calprotectin Controls “Low” and “High”** \*\*\*: 2 vials with 1.0 mL, ready to use; yellow coloured solution; Ctr Low: vial with brown cap;. Ctr High: vial with purple cap.
- **CONJ** **Enzyme Conjugate** \*\*\*\*: 13 mL horseradish peroxidase-labelled, immunoaffinity-purified polyclonal rabbit antibodies against Calprotectin, ready to use; red coloured solution, 25 mL Dynex reagent tube with white cap.
- **SUB|TMB** **TMB-Substrate Solution:** 13 mL, ready to use; clear to faint yellow solution, opaque bottle with yellow cap.  
*Note:* If using a Dynex instrument, the substrate must be transferred into a 25mL Dynex reagent tube before running the test.
- **SOLN|STOP** **Stop Solution:** The bottle contains 13 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26), 25 mL Dynex reagent tube with white cap.
  - \* Contains ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1)
  - \*\* Contains < 0.1% sodium azide
  - \*\*\* Contains ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and < 0.1% sodium azide
  - \*\*\*\* Contains 0.02% MIT and 0.02% bromonitrodioxane
- 2 Sealing foils
- 1 Kit insert (Instructions for Use can be found and downloaded on [www.calpro.no](http://www.calpro.no))
- 1 Plate layout

## 4.2 Materials and equipment required but not supplied.

- Distilled/deionised water
- Extraction devices (see section 7.1.1 and 7.1.2)
- Disposable, breakable inoculation loops (if using weighing method in section 7.1.3)
- Sensitive digital scale (40 – 150 mg) (if using weighing method in section 7.1.3)
- Disposable polystyrene screw cap tubes, 5 mL (if using weighing method in section 7.1.3)
- Vortex mixer
- Disposable tubes for dilution of samples: Eppendorf tubes or similar (if assay is performed manually)
- Pipettes to deliver volumes 10 – 1000 µL (if assay is performed manually)
- Repetitive pipette or multi-channel pipette, 100 µL (if assay is performed manually)
- Microplate well washer or multi-channel pipette, 300 µL (if assay is performed manually)
- Plate shaker (500 – 700 rpm) (if assay is performed manually)
- Timer (if assay is performed manually)
- Microplate reader, filter 405 nm (if assay is performed manually)
- 1M NaOH (stop solution; optional)

## 5 STABILITY AND STORAGE

When stored unopened at 2 – 8°C, kit reagents are stable up to the expiry date stated on the label.

Opened plates, reagents and concentrated buffers are stable for up to three months when stored at 2 – 8°C.

When prepared in clean vessels, working solutions (1x) of Washing Solution, Sample Dilution Buffer and Faecal Extraction Buffer can be stored at 2 – 8°C for up to one month.

Avoid exposure to high temperature.

## 6 PREPARATION

All reagents, samples and controls should be brought to room temperature (18 – 25°C) before starting the test run.

### 6.1. Coated microtiter plate strips

The ready-to-use plate strips are coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. Unused strips should be removed from the frame and immediately re-sealed in the aluminium foil pouch along with the desiccant supplied. Store at 2 – 8°C.

### 6.2. Sample Dilution Buffer

Dilute the 5x concentrated Sample Dilution Buffer by adding 1 part (20 mL) to 4 parts (80 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 100 mL. Mix well. Store the diluted Sample Dilution Buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

*Note:* If using a Dynex DS2 ELISA automat, the Sample Dilution Buffer must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

### 6.3. Washing Solution

Dilute the 20x concentrated Washing Solution by adding 1 part (50 mL) to 19 parts (950 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 1000 mL. Mix well. Store the diluted Washing Solution in a closed vessel at 2 – 8°C.

### 6.4. Faecal Extraction Buffer

Dilute the 2.5x concentrated Faecal Extraction Buffer by adding 1 part (90 mL) to 1.5 parts (135 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 225 mL. Mix well. Store the diluted buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

## 6.5. Standards and controls

The vials labelled with Standard A – F, as well as the controls, contain 1.0 mL each of a ready-to-use solution. The concentration of Calprotectin is printed on the label of each vial. The vials fit directly into Dynex DS2 and DSX ELISA automates.

## 6.6. Enzyme conjugate

The tube contains 13 mL of horseradish peroxidase (HRP)-labelled, immunoaffinity-purified rabbit antibodies against Calprotectin in a buffer with stabilisers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. The tube fits directly into Dynex DS2 ELISA automates. Store at 2 – 8°C.

## 6.7. Enzyme Substrate Solution (TMB)

The bottle contains 13 ml of a tetramethylbenzidine/ hydrogen peroxide (TMB) solution. The solution is ready to use and must be stored in its original, opaque bottle. Store at 2 – 8°C, away from the light.

*Note:* If using a Dynex DS2 ELISA automat, the Enzyme Substrate Solution must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

## 6.8. Stop Solution

The vial contains 13 ml of 0.2 mol/L sulfuric acid (R36/38, S26). The vial fits directly into the Dynex ELISA DS2 vending machines.

# 7 TEST PROCEDURE

## 7.1 Faecal samples

Since Calprotectin is very stable in stools, patients can collect small faecal samples at home. Collect 1 – 5 g (approximately one teaspoonful), place it in a suitable clean container and deliver it to the laboratory as soon as possible but within five days. When put in a container approved for transport, it can be sent by ordinary mail, i.e. no refrigeration is needed. Exposure to temperatures above 30°C should be avoided.

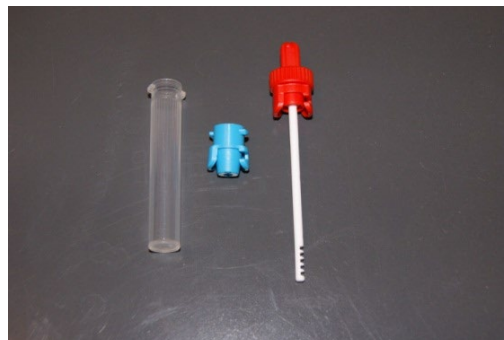
Samples can also be stored frozen, at -20°C or lower, until delivery or mailing. Frozen samples must be thawed and equilibrated to room temperature before extraction and testing.

*Note:* Before commencing extraction, the stool sample should be homogenised well using for example a spatula, before the small amount for extraction is taken out.

For extraction we recommend the use of Calpro EasyExtract™ or the original weighing method, see chapter 7.1.1 and 7.1.2.

### 7.1.1 Extraction using the Calpro EasyExtract®

Instructions for use: please read package insert for product No. CAL0510/CAL0510L



(Calpro AS, Product No. CAL0510)

### 7.1.2 Extraction using the weighing method (without extraction device)

1. Weigh (tare) an empty screw cap tube with an inoculation loop.

2. Take out approx. 100 mg (between 40 and 120 mg) faeces by means of the inoculation loop and place it into the screw cap tube. Avoid taking out solid, undigested material like fibres and seeds.
3. Weigh tube and loop with faeces which will give the net faeces weight.
4. Break or cut off the top half of the loop handle and leave the bottom part inside the tube.
5. Add extraction buffer to a weight: volume ratio 1:50, for instance 4.9 mL buffer to 100 mg faeces. Close the tube.
6. Mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex mixer.
7. Continue the mixing on a shaker (at approx. 1000 rpm) for 30±5 minutes with the loop inside the tube as an agitator.
8. Allow a couple of minutes on the bench for particles to settle and pipette carefully from the top of the tube. No centrifugation is necessary, but a short centrifugation can be performed if a particle-free solution is required.
9. The extract, which represents a 1:50 dilution (weight:volume) of the stool sample, is now ready for dilution and testing.
10. For storage, transfer about 0.5 mL to a new tube. Extracts can be stored at 2 – 8°C for at least five days or frozen below -20°C for up to 2 years <sup>48)</sup>.

## 7.2 Suggested plate layout

	1	2	3	4	etc.	
<b>A</b>	Standard A 0 ng/mL	Standard E 125 ng/mL	Sample 1	Sample 5		
<b>B</b>	Standard A 0 ng/mL	Standard E 125 ng/mL	Sample 1	Sample 5		
<b>C</b>	Standard B 7.8 ng/mL	Standard F 500 ng/mL	Sample 2	Sample 6		
<b>D</b>	Standard B 7.8 ng/mL	Standard F 500 ng/mL	Sample 2	Sample 6		
<b>E</b>	Standard C 31.3 ng/mL	Control "Low"	Sample 3	Sample 7		
<b>F</b>	Standard C 31.3 ng/mL	Control "Low"	Sample 3	Sample 7		
<b>G</b>	Standard D 62.5 ng/mL	Control "High"	Sample 4	Sample 8		
<b>H</b>	Standard D 62.5 ng/mL	Control "High"	Sample 4	Sample 8		

Suggested ELISA plate layout for standards, controls and samples using manual procedure. Duplicate wells are recommended for increased reliability of results. A full plate takes 40 samples.

## 7.3 ELISA procedure

The following procedure is for manual testing. Validated protocols for Dynex DS2 ELISA automate are available upon request. Please note that the standard and positive control vials, as well as the conjugate tube, fit directly into the DS2 ELISA automate.

### Procedural Notes

- Preparation: Please read the test protocol carefully *before* performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, a plate layout for all standards, samples and controls should be carefully established, using for example the sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips. Unused strips should be re-sealed in the aluminium pouch and stored as described in Section 6.1.
- A 1:100 dilution of faeces extracts is recommended. This dilution will give sample results between 22.2 mg/kg (LoQ) and 2500 mg/kg in faeces. Extracts with higher Calprotectin values can be diluted more (> 1:100) and

re-tested if a value is required. Extracts with low Calprotectin values can be diluted less (1:50). The adjusted dilution factor must be taken into account when converting from ng/mL to mg/kg.

- Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.
- A clean, disposable pipette tip must be used for dispensing each standard, control, and sample.
- To achieve the most reliable results, standards, controls, and patient samples should always be run in duplicate.

### ELISA Procedure

1. Dilute faecal extract samples 1:100 (e.g. 10  $\mu$ l sample + 990  $\mu$ l Sample Dilution Buffer) and mix well by vortexing.
2. Add 100  $\mu$ l of each standard, control and diluted sample in duplicate wells; see recommended plate layout in Section 8.
3. Cover the plate with a sealing foil and incubate at room temperature for 40 $\pm$ 5 min on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
4. At the end of the incubation time, remove the liquid and wash the wells by adding 300  $\mu$ l Washing Solution to each well. Remove as much liquid as possible and repeat until a total of three washings have been performed. If a plate washer is used, check that all aspirating and filling probes are unblocked to ensure efficient washing of all wells. After the final wash, invert the plate and tap the well openings thoroughly on absorbent tissue to remove any remaining Washing Solution.
5. Mix the content of the Enzyme Conjugate vial gently prior to use (do not shake). Add 100  $\mu$ l of conjugate to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
6. Cover the plate with sealing foil and incubate at room temperature for 40 $\pm$ 5 min' on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
7. Repeat the washing steps as described above, three times with 300  $\mu$ l Washing Solution per well.
8. Add 100  $\mu$ l Enzyme Substrate Solution to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
9. Incubate the plate at room temperature (without shaking) for 20 – 30 minutes, protected from light.
10. Add 100  $\mu$ l 0.2 M sulphuric acid stop solution to each well.
11. Shake the plate briefly (2-3 seconds) and read the optical density (OD) values at 450 nm using an ELISA reader.

## 8 QUALITY CONTROL

- A new standard curve must be included in each run.
- The positive controls should be included in each run. The value of the controls should be within the limits printed on the vial labels.
- The OD value of Standard F (500 ng/mL) should be  $\geq$  1.6 and the OD value of Standard A (0 ng/mL) should be  $\leq$  0.25. A representative standard curve is shown in figure 1.

## 9 EVALUATION

Calculation of Calprotectin concentration in patient faecal samples:

1. Calculate the mean OD values of all duplicate wells (standards and samples).
2. Plot the value of each standard concentration (ng/mL) on the x axis against its mean OD value on the y axis to obtain a standard curve. **A 4-parameter curve fit function is recommended** (see figure 1 below). If a logarithmic x axis is required, a value of 0.001 ng/mL must be used for standard A (0 ng/mL).
3. Use the calibration curve to determine the Calprotectin concentration in the diluted samples (ng/mL) based on their OD values.
4. **Multiply the Calprotectin concentration (ng/mL) in the diluted faecal extracts by 5 in order to convert to mg/kg Calprotectin in the original stool sample.**

This factor corrects for the total dilution of 1:5000 (1:50 during the extraction procedure and the following 1:100 dilution of the extracts) and converts the value from ng/mL to mg/kg.

*Example: if a diluted extract sample has a value of 100 ng/mL the concentration in the original stool specimen was  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

Note: If extracts have been diluted more than the recommended 1:100, the additional dilution factor must be entered into the calculation.

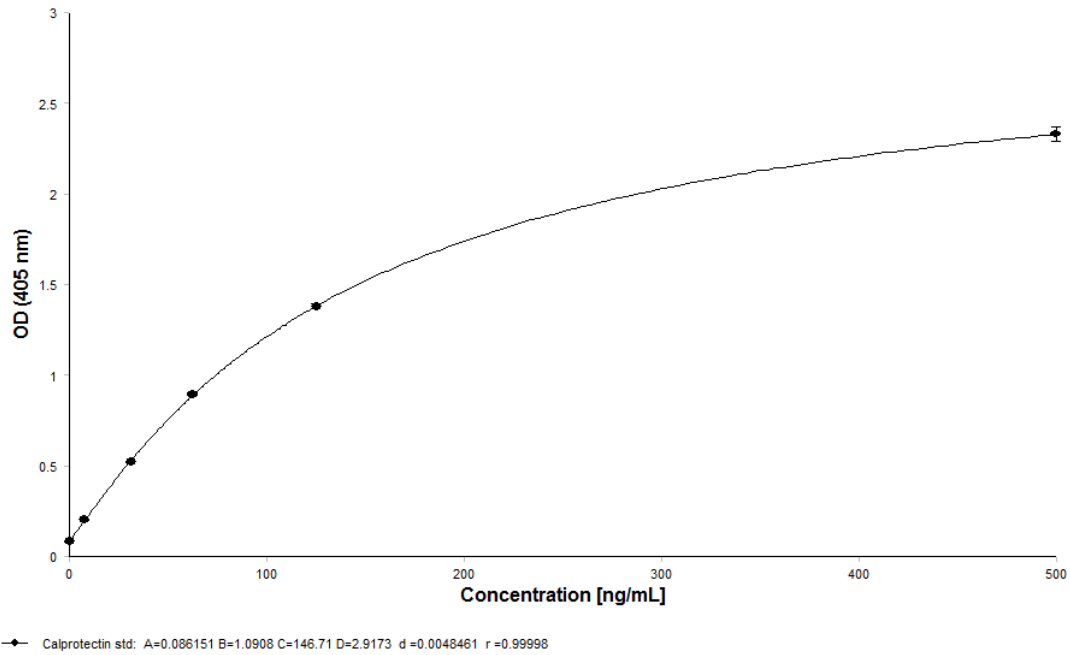


Figure 1: A representative standard curve using 4-parameter curve fit.

## 10 INTERPRETATION OF RESULTS

The following Calprotectin values in stool samples for clinical assessment have been reported in the published literature<sup>3, 36, 37</sup>:

<b>Normal value</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Positive value</b>	> 50 mg/kg
<b>grey zone*</b>	50-100 mg/kg
<b>Active, symptomatic inflammatory bowel disease</b>	200 – 40,000 mg/kg

\*) patients with results within the grey zone are recommended to repeat the test to improve diagnostic accuracy.

Note that a diagnosis should not be established based on a single test result. Diagnosis should take into consideration clinical history and symptoms.

In accordance with scientific literature and published clinical studies<sup>36, 37</sup>, the following clinical performance for detection of inflammatory bowel disease versus functional disease can be expected:

<b>Cut-off</b>	<b>Sensitivity (95% CI)</b>	<b>Specificity (95 % CI)</b>	<b>Positive predictive value</b>	<b>Negative predictive value</b>
50 mg/kg	0.90-0.99	0.70-0.77	0.31-0.44	0.98-1.00
100 mg/kg	0.89-0.99	0.84-0.90	0.46-0.62	0.98-1.00

## 11 SPECIFICATIONS AND PERFORMANCE

**Note:** All design verification studies were performed by manual testing on faeces extract samples (diluted 1:100)

**Precision:** The intra and inter precision studies were performed at three laboratories testing the same samples on two different Calprolab kit batches.

Intra-assay (repeatability) precision, faeces extracts (n=20)

<b>Concentration in faeces (mg/kg)</b>	<b>%CV</b>
29,0	8,3
201,8	4,7
480,3	9,3
716,2	6,6
1314,4	3,2
2155,2	3,0

Inter-assay (total) precision, faeces extracts (n=80)

<b>Concentration in faeces (mg/kg)</b>	<b>%CV</b>
30,5	15,9
209,5	3,7
509,1	12,3
780,3	8,7
1482,9	14,2
2141,9	10,3



**Agreement between extraction methods; weighing method versus EasyExtract\***

Intercept: -6.7, slope: 1.05, R= 0.97

\*) Further details and performance data concerning faecal extraction can be found in the packaging insert for EasyExtract (prod. No. CAL0510).

**Recovery:**

Faeces: 90-113 %; tested with faecal extract spiked with purified Calprotectin at five different levels.

**Limit of Quantification, Limit of Detection and Limit of Blank:**

- Limit of Blank (LoB): 1.47 mg/kg

- Limit of Detection (LoD): 7.34 mg/kg

- Limit of Quantification (LoQ): 19.7 mg/kg

The limit of Quantification, Detection and Blank were performed according to CLSI guideline EP17A-Ed2

**Agreement with****a) Calpro Calprotectin ELISA (prod. no. CAL0100)**

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) versus CALP0270: Acceptable correlation and agreement have been found between samples analysed in both assays:

- **Intercept: 4.3 (95%CI: -0.84 – 14.3), slope: 1.05 (95% CI: 0.86-1.16), R = 0.94**

**Interference**

No observed interference on the ELISA was observed from commonly used pharmaceuticals see list below:

Prednisolone, Imurel, Salazopyrin, Trimetoprim, Ciprofloxacin, Pentasa, Asacol, Ibux, Multivitamin and human Hemoglobin

In addition, S001A12 was tested for possible cross-reactivity and no reactivity was observed.

**Measuring range**

22.2-2500 mg/kg

**12 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- Diagnosis should not be established based on a single test result. Diagnosis should take into consideration clinical history and symptoms.

**13 CONTRAINDICATIONS**

- False negative results could occur in patients who have granulocytopenia due to bone marrow suppression.
- Patients treated with azathioprine can also have granulocytopenia resulting in false negatives.
- Some patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) will have increased levels of faecal calprotectin.
- Results may not be clinically applicable to children less than 2 years of age, as they often have increased faecal calprotectin levels.
- Other intestinal diseases, including many gastrointestinal infections and colorectal cancer can result in elevated levels of calprotectin.
- Faecal calprotectin is a non-specific indicator of inflammation in the gut. Elevated levels do not necessarily mean that the patient has active IBD. The full clinical picture always needs to be evaluated.

## 14 PRECAUTIONS AND WARNINGS


- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the *in vitro* diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore, the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analysers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for *in vitro* diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and hepatitis B antigen (Bag) and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- Do not use reagents from other manufacturers with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label or after 1 months of preparation of concentrated reagents to working solutions.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- To prevent cross contamination, do not interchange screw caps of reagent vials.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage, check conjugate, standards and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results, pipette standards, control and faecal extract samples, and dispense conjugate and substrate, accurately to the bottom of microplate wells, without splashing.
- Some reagents contain sodium azide at less than 0.1% (w/v) and/or less than 0.1% Kathon.
- Store the substrate solution in the original, opaque bottle; the solution should be clear to pale yellow. Mix gently before use.
- The **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** is designed for use by qualified personnel who are trained in good laboratory practice.

**WARNING:** Sulphuric acid irritates eyes and skin! Keep out of reach of children. After contact with eyes, rinse thoroughly with water and seek medical advice.

### Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to point 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	<b>Warning</b>	H317	May cause an allergic skin reaction.
		P261	Avoid breathing spray.
		P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
		P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
		P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
		P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

## **15 DISPOSAL CONSIDERATIONS**

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

# CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)

## QUICK GUIDE

### CalproLab<sup>®</sup> ELISA (HRP) for analysis of Calprotectin in faeces

*Please refer to sections 7 – 9 in the package insert for a full description of the practical steps.*

#### Extraction

- Perform extraction according to one of the methods described in section 7.1.1 and 7.1.2

#### ELISA (manual procedure)

- Dilute faecal extracts 1:100 in Sample Dilution Buffer
- Add 100 µL standards, controls and samples to the ELISA plate.
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Solution
- Add 100 µl of ALP enzyme conjugate to each well
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Solution
- Add 100 µL pNPP Enzyme Substrate Solution to each well.
- Incubate under cover for 20 – 30 min.
- Optional:* add 100 µL 1M NaOH to each well
- Shake the plate for 2-3 seconds and read the OD values at 405 nm using an ELISA reader.
- Using a 4-parameter curve fit, calculate the results (ng/mL)
- mg/kg in faeces = ng/mL × 5

For questions, please contact [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** ist eine quantitative Methode zur Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben. Der Test kann zum Nachweis von organischen Erkrankungen des Dünn- und Dickdarms und des Magens verwendet werden. Die Krankheitsaktivität kann bestimmt und der Therapieverlauf bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn überwacht werden.

Der **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** ist für die Analyse von Stuhlproben validiert worden.

**Nur zur *In vitro* Diagnostik.**

## 2 EINLEITUNG

Verschiedene organische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts können die Darmschleimhaut schädigen. Diese Schäden können von einer erhöhten Permeabilität der Schleimhaut bis zu Entzündungen oder Bildung von Geschwüren führen. Der Darminhalt enthält viele Bakterien und andere Mikroorganismen, die toxische oder chemotaktisch wirkende Substanzen freisetzen können. Diese Substanzen stimulieren z.B. Leukozyten, insbesondere polymorphkernige Granulozyten (PMN) zum Eintritt in das Darmlumen. Dort entleeren sie ihren Inhalt, unter anderem antimikrobielle Substanzen wie Calprotectin. Dieses Protein macht ungefähr 60% der Gesamtproteine in dem Cytoplasma von PMNs aus <sup>2)</sup> und kann verlässlich in Stuhlproben bestimmt werden, die bis zu sieben Tage bei Raumtemperatur gelagert werden können <sup>3)</sup>.

Calprotectin ist ein 36 Kilodalton großes Kalzium- und Zink- bindendes Protein <sup>4)</sup>, das von PMN, Monozyten und Plattenepithelzellen (ausgenommen die in der normalen Haut vorkommenden) gebildet wird <sup>5,6)</sup>. Die Bindung von Kalzium kann das Protein vor dem Abbau durch leukozytäre und bakterielle Enzyme schützen <sup>3,7)</sup>. Im Wettstreit mit verschiedenen Enzymen um die limitierte Anzahl von lokal vorhandenen Zinkmolekülen kann Calprotectin zinkabhängige Enzyme hemmen <sup>8)</sup> und dadurch Mikroorganismen sowie Zellen menschlichen oder tierischen Ursprungs in der Zellkultur abtöten <sup>9,10)</sup>. Verschiedene Krankheiten, beispielsweise bakterielle Infektionen, rheumatoide Arthritis oder Krebs, führen zu einer Aktivierung der PMN und einer erhöhten Calprotectinkonzentration in Plasma, Zerebrospinalflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Zahnhalsflüssigkeit, Urin oder anderen humanen Flüssigkeiten führen <sup>1)</sup>.

Von besonderer Bedeutung ist, dass die Konzentration von Calprotectin im Stuhl mit der Anzahl der PMN, die in das Darmlumen einwandern, korreliert <sup>11)</sup> und selbst in kleinen Stuhlmengen (weniger als 1 g) nachgewiesen werden kann <sup>3,12)</sup>. Hohe Konzentrationen von Calprotectin im Stuhl sprechen für eine organische Darmerkrankung. Bei einer Darmentzündung ist der Anstieg um den Faktors fünf bis zu einigen Tausend im Vergleich zum oberen Referenzwert bei Gesunden erhöht <sup>3,13,14,15)</sup>.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie z. B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, können vom frühesten Kindesalter bis zum fortgeschrittenen Alter auftreten. Die Diagnose ist oft verzögert, aufgrund vager Symptome oder Zurückhaltung gegenüber Endoskopie oder Biopsie. Der **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** kann eine frühere Diagnose von CED ermöglichen, da der Test aktive CED im Regelfall positiv bestimmt.

Funktionale Störungen wie Reizdarmsyndrom (RDS) weisen keine erhöhten Konzentrationen von Calprotectin im Stuhl auf. Hingegen organische abdominale Störungen wie CED deutlich erhöhte Werte aufzeigen können, obwohl noch eine Entzündung vorliegt und Calprotectin immer noch in der Stuhlprobe vorhanden ist. Ein test auf Calprotectin in Stuhl ist eine nicht-invasive und objektive Methode, die helfen kann Patienten für weitere Untersuchungen, wie z.B. die Endoskopie, zu selektieren und unnötige Kosten einzusparen. Abdominelle Beschwerden sind sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen verbreitet. Ein negatives **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** Ergebnis kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine entzündliche Darmerkrankung <sup>13)</sup> ausschließen.

Das Ziel der CED Behandlung ist die komplette Ausheilung der Schleimhaut und ein Test auf Calprotectin im Stuhl kann nachweisen, wenn das Ziel erreicht wurde. Viele CED Patienten in klinischer Remission mit normalen C-Reaktiv-Protein (CRP) Werten haben immer noch eine Entzündung <sup>16)</sup>, welche sich in erhöhten Calprotectin Werten im Stuhl widerspiegelt. Solche Patienten haben ein erhöhtes Rückfallrisiko innerhalb einiger Monate <sup>17)</sup>. Falls eine komplette Ausheilung der Schleimhaut erreicht werden kann, sinkt das Risiko eines Rückfalls and die Notwendigkeit einer großen abdominalen Operation <sup>18,19)</sup>. Die Normalisierung des Calprotectinlevels bedeutet, dass eine komplette Ausheilung der Schleimhaut erzielt wurde <sup>20)</sup>. Das Risiko und der Schweregrad der Nebeneffekte der Behandlung sollte gegen das Risiko einer fortbestehenden Entzündung, schweren klinischen Rückfällen und Komplikationen abgewogen werden.

Die Wichtigkeit der kompletten Ausheilung der Schleimhaut wurde in etlichen wissenschaftlichen Reviews <sup>21-29)</sup> und Artikeln <sup>30-35)</sup> behandelt.

### 3 TESTPRINZIP

Der **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** basiert auf der Extraktion aus einer Stuhlprobe unter Verwendung unseres patentierten Stuhlextraktionspuffers. Der Gehalt an Calprotectin wird bestimmt, indem der Extrakt in einem Enzym gekoppelten Immunoassay (ELISA) spezifisch für Calprotectin gemessen wird.

Im ELISA werden Proben und Standards in separaten Mikrotiterwells inkubiert, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, welche das Calprotectin binden. Nach der Inkubation und dem Waschen reagiert das gebundene Calprotectin mit enzymmarkierten, Immunoaffinitäts-aufgereinigten Calprotectin spezifischen polyklonalen Antikörpern.

Nach der Reaktion ist der Gehalt an gebundenem Enzym proportional zu dem Calprotectin-Gehalt der Standards und der Proben, welcher durch eine Substratinkubation detektiert wird, die eine Farbreaktion bewirkt. Die Absorption der Farbtintensität wird mittels eines ELISA Plattenlesegerät gemessen, wobei diese proportional zu der Konzentration des Calprotectins in den Proben und Standards ist. Der Test ist mittels aufgereinigtem Calprotectin aus Leukozytenextrakt kalibriert.

### 4 MATERIALIEN

#### 1.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **MTP** **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit immunaffinitäts-aufgereinigten, monoklonalen spezifisch gegen Calprotectin gerichteten murine Antikörpern; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.
- **DIL 5x** **Probenverdünnungspuffer (5x konz.) \*\*\*:** 1 x 20 ml, 5-fach Konzentrat, Verdünnung mit Aqua dest./ entionisiertem Wasser; pH 8.0 ± 0.2, gelb gefärbte Lösung, Flasche mit blauer Verschlusskappe.
- **WASH|BUF 20x** **Waschlösung (20x konz.) \*:** 1 x 50 ml, 20-fach Konzentrat, Verdünnung mit Aqua dest./ entionisiertem Wasser; pH 7.8 ± 0.2, klare Lösung, Flasche mit weißer Verschlusskappe.
- **FEC|EXTR|BUF 2,5x** **Stuhlextraktionspuffer (2,5x konz.) \*\*:** 2 x 90 ml, 2,5-fach Konzentrat, Verdünnung mit Aqua dest./ entionisiertem Wasser; pH 7.8 ± 0.2, klare Lösung, Flaschen mit weißen Verschlusskappen.
- **CAL|A - F** **Calprotectin Standards \*\*\*:** 6 Fläschchen mit 1,0 ml, gebrauchsfertig; gelbe Lösungen, Fläschchen mit Verschlusskappen unterschiedlicher Farbe:
 

Standard A: blaue Verschlusskappe	0	ng/ml
Standard B: grüne Verschlusskappe	7,8	ng/ml
Standard C: gelbe Verschlusskappe	31,3	ng/ml
Standard D: rote Verschlusskappe	62,5	ng/ml
Standard E: weiße Verschlusskappe	125	ng/ml
Standard F: schwarze Verschlusskappe	500	ng/ml
- **CTR|LOW|CTR|HIGH** **Calprotectin Kontrollen "Low" und "High" \*\*\*:** 2 Fläschchen mit 1.0 ml, gebrauchsfertig, gelbe Lösungen, Ctr Low: mit brauner Verschlusskappe; Ctr High: mit violetter Verschlusskappe.
- **CONJ** **Enzym Konjugat\*\*\*\*:** 13 ml Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte-Immunoaffinitäts-aufgereinigte polyklonale Kaninchenantikörper gegen Calprotectin, gebrauchsfertig; rot gefärbte Lösung, 25 ml Dynex Fläschchen mit weißer Verschlusskappe.
- **SUB|TMB** **TMB-Substratlösung:** 13 ml, gebrauchsfertig; klare leicht bläuliche Lösung, lichtundurchlässige Flasche mit gelber Verschlusskappe.
- **SOLN|STOP** **Stopplösung:** 13 ml 0,2M Schwefelsäure (R36/38, S26), gebrauchsfertig; 25 ml Dynex Fläschchen mit weißer Verschlusskappe.

\* enthält ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1)

\*\* enthält < 0.1% Natriumazid

\*\*\* enthält  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and  $<0.1\%$  Natriumazid

\*\*\*\* enthält 0.02% MIT und 0.02% Bromonitrodioxan

## 1.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

## 1.3 Erforderliche Materialien und Geräte

- Destilliertes/entionisiertes Wasser
- Extraktionsgerät (wenn für die Extraktion Punkt 7.1.1 verwendet wird z.B. Calpro Produkt No. CAL0500)
- Abrechenbare Einweg-Impfösen zur Stuhlprobenentnahme (wenn für die Extraktion Punkt 7.1.2 verwendet wird)
- Sensitive Digitalwaage (40 – 150 mg) (wenn für die Extraktion Punkt 7.1.2 verwendet wird)
- Verschließbare Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch, 5 ml (wenn für die Extraktion Punkt 7.1.2 verwendet wird)
- Vortex-Mischer
- Einwegröhrchen zum Verdünnen der Proben (Eppendorfggefäße oder Ähnliche) (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Pipetten für das Volumen 10 – 1000  $\mu\text{l}$  (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Multipette oder Mehrkanalpipette, 100  $\mu\text{l}$  (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Automatische Waschvorrichtung oder Mehrkanalpipette, 300  $\mu\text{l}$  (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Plattenschüttler (500 – 700 rpm) (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Timer (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)
- Photometer mit Filter 450 nm (wenn der Test manuell abgearbeitet wird)

## 2 STABILITÄT UND LAGERUNG

Die Reagenzien sind ungeöffnet haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum auf den Etiketten bei einer Lagerung bei 2 – 8°C.

Geöffnete Platten, Reagenzien und konzentrierte Puffer sind bei Lagerung bei 2 – 8°C für 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertigen Waschlösungspuffer, Probenverdünnungspuffer und Extraktionspufferlösung sind in einem geschlossenen, sauberen Gefäß bei 2 – 8°C einen Monat haltbar.

Vor Licht und hohen Temperaturen geschützt aufzubewahren.

## 3 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C) zu bringen!

### 6.1. Beschichtete Streifen

Die gebrauchsfertigen Streifen sind mit Immunaффinitäts-aufgereinigten, monoklonalen Calprotectin-Antikörpern aus der Maus beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen sollten aus dem Rahmen entfernt und im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschlossen und bei 2 – 8°C gelagert werden.

### 6.2. Probenverdünnungspuffer:

Der 5x konzentrierte Probenverdünnungspuffer wird vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. in einer sauberen Flasche verdünnt (20 ml Probenverdünnungskonzentrat + 80 ml Aqua dest./ entionisiertes Wasser) Gut mischen! Den verdünnten Probenverdünnungspuffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

*Beachte:* Wenn ein Dynex DS2 ELISA Automat verwendet wird, muss der Probenverdünnungspuffer vor dem Testlauf in ein 25 ml Dune Fläschchen umgefüllt werden.

### 6.3. Waschlösung

Die 20x konzentrierte Waschlösung wird vor Gebrauch 1:20 mit Aqua dest. / entionisiertem Wasser in einer sauberen Flasche verdünnt (50 ml Waschlösungskonzentrat + 950 ml Aqua dest. / entionisiertes Wasser.). Gut mischen! Den verdünnten Waschlösungspuffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

#### 6.4. Stuhlextraktionspuffer

Der 2,5x konzentrierte Extraktionspuffer wird vor Gebrauch 1:2,5 mit Aqua destio./ entionisiertem Wasser. in einer sauberen Flasche verdünnt (90 ml Extraktionspufferkonzentrat + 135 ml Aqua destio./ entionisiertes Wasser). Gut mischen! Den verdünnten Puffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

#### 6.5. Standards + Kontrollen

Die Fläschchen mit den Standards A - F und die zwei Kontrollen enthalten 1,0 ml gebrauchsfertige Lösungen. Die Calprotectin Konzentration ist auf den Etiketten der Fläschchen angegeben. Die Fläschchen passen direkt in die Dune ELISA Automaten DS2. Die Lagerung der Fläschchen erfolgt bei 2 – 8 °C.

#### 6.6. Enzymkonjugat

Das Fläschchen enthält 13 ml Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, Immunaффinitäts-aufgereingte Kaninchen Antikörper gegen Calprotectin in einem Puffer mit Stabilisatoren und mit einem roten Farbstoff versetzt. Das Konjugat ist gebrauchsfertig. Das Fläschchen passt direkt in die Dynex ELISA Automaten DS2. Die Lagerung des Fläschchens erfolgt bei 2 – 8 °C.

#### 6.7. Enzym-Substratlösung (TMB)

Das Fläschchen enthält 13 ml eines 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist in ihrer originalen lichtundurchlässigen Flasche aufzubewahren. *Beachte:* Wenn ein Dynex DS2 ELISA Automat verwendet wird, muss die Enzym- Substratlösung vor dem Testlauf in ein 25 ml Dynex Fläschchen umgefüllt werden.

#### 6.8. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 13 ml 0,2 mol/L Schwefelsäure (R36/38, S26). Das Fläschchen passt direkt in die Dynex ELISA Automaten DS2.

## 4 SAMMELN UND VORBEREITEN DER STUHLPROBEN

### 7.1. Stuhlproben

Calprotectin ist im Stuhl sehr stabil, Patienten können zu Hause kleine Stuhlproben sammeln. Es sollen 1 – 5 g (ca. 1 Teelöffel) in einen entsprechenden sauberen Behälter überführt und so schnell wie möglich, aber innerhalb von vier Tagen in das Labor gesendet werden. Wenn der Transport in einem dafür freigegebenen Transportgefäß stattfindet, kann die Probe mit der normalen Post ungekühlt verschickt werden. Temperaturen über 30°C sollten vermieden werden.

Die Proben können vor dem Versand auch bei –20°C oder niedriger eingefroren werden. Eingefrorene Proben müssen aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden, bevor die Extraktion durchgeführt wird. Das Einfrieren von Stuhlproben kann in einigen Fällen zu erhöhten Calprotectin Konzentrationen führen, wahrscheinlich durch die Calprotectinfreigabe von Granulocyten.

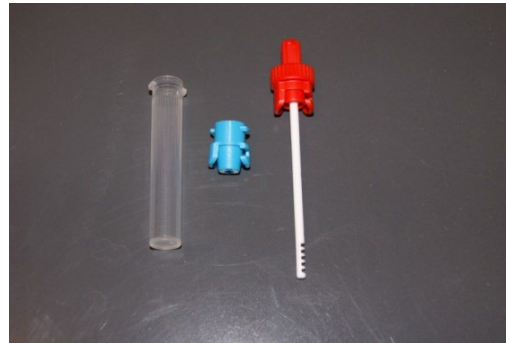
*Beachte:* Vor einer Extraktion sollte die Stuhlprobe homogenisiert werden, z.B. mit einem Spatel, bevor eine kleine Menge für die Extraktion entnommen wird.

Für die Extraktion empfehlen wir die Verwendung von Calpro EasyExtract™ (CAL0510) oder eine der anderen unten aufgeführten Methoden (Kapitel 7.1.1 und 7.1.2) Die Durchführung der Extraktion muß gemäß der Arbeitsanleitung der gewählten Stuhlextraktionsröhrchen oder methode erfolgen. Es können auch andere vom Kunden validierte Methoden oder Stuhlextraktionsröhrchen verwendet werden.



### **7.1.1. Extraktion unter Verwendung des Calpro EasyExtract™**

Gebrauchsanweisung: Bitte lesen Sie die Arbeitsanleitung für Prod. No. CAL0510



(Calpro AS, Product No. CAL0510)

### **7.1.2. Extraktion mittels einwiegen (ohne Extraktionsgerät)**

1. Wiegen (Tara) des leeren Röhrchens mit der Impföse.
2. Es sollten ca. 100 mg Stuhlprobe (zwischen 40 und 120 mg) mit der Impföse in das Röhrchen überführt werden. Die Entnahme von festem unverdaulichem Material, wie Fasern und Samen ist zu vermeiden.
3. Wiegen des Röhrchens mit Öse und Stuhlprobe zur Bestimmung des genauen Nettogewichtes der Stuhlprobe.
4. Abbrechen der oberen Hälfte der Öse (Griff), der untere Teil der Öse bleibt in dem Röhrchen.
5. Extraktionspuffer im Verhältnis 1:50 auf die abgewogene Stuhlprobe pipettieren z.B. 100 mg Stuhlprobe + 4,9 ml Extraktionspufferlösung. Das Probenröhrchen verschließen.
6. Intensiv mischen für 30 Sekunden unter Verwendung eines Vortexers.
7. Die Proben werden auf einem Schüttler bei ca. 1000 rpm weitere 30 +/- 5 Minuten gemischt, die Öse im Röhrchen fungiert als Rührer.
8. Das Röhrchen für einige Minuten auf der Arbeitsfläche stehenlassen, damit vorhandene Partikel sich absetzen können. Vorsichtig aus dem oberen Bereich des Röhrchens pipettieren. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt ist nicht notwendig, aber eine kurze Zentrifugation hilft eine partikelfreie Lösung zu erhalten.
9. Der Extrakt ist nun gebrauchsfertig für die einzusetzende Verdünnung gemäß der Arbeitsanweisung. Der Extrakt entspricht einer 1:50 Verdünnung (Gewicht:Volumen) der Stuhlproben.
10. Ungefähr 0,5 ml in ein neues Gefäß für die Lagerung überführen. Extrakte können bei 2 -8°C für mindestens fünf Tage und im gefrorenen Zustand bei mindestens -20°C für bis zu 2 Jahre gelagert werden <sup>48)</sup>.

## 7.2. Vorgeschlagene Mikrotiterplatten Belegung

	1	2	3	4	etc.	
	Standard A 0 ng/mL	Standard E 125 ng/mL	Probe 1	Probe 5		
	Standard A 0 ng/mL	Standard E 125 ng/mL	Probe 1	Probe 5		
	Standard B 7.8 ng/mL	Standard F 500 ng/mL	Probe 2	Probe 6		
	Standard B 7.8 ng/mL	Standard F 500 ng/mL	Probe 2	Probe 6		
	Standard C 31.3 ng/mL	Kontrolle "Low"	Probe 3	Probe 7		
	Standard C 31.3 ng/mL	Kontrolle "Low"	Probe 3	Probe 7		
	Standard D 62.5 ng/mL	Kontrolle "High"	Probe 4	Probe 8		
	Standard D 62.5 ng/mL	Kontrolle "High"	Probe 8	Probe 8		

Vorgeschlagene Plattenbelegung für Standards, Kontrollen und Proben.  
Doppelbestimmung wird für eine erhöhte Verlässlichkeit der Ergebnisse empfohlen.

## 4.3 Testdurchführung

Die folgende Durchführung ist für die manuelle Abarbeitung. Validierte Protokolle für Dynex DS2 ELISA Automaten sind auf Anfrage verfügbar. Beachte, dass sowohl die Standard – und Kontrollröhrchen, als auch die Konjugat – und Stopplösungsflasche direkt in den DS2 ELISA automaten passen.

### Arbeitstechnische Anweisungen:

- Vorbereitung: Gebrauchsinformation *vor* Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Vor Testbeginn die Proben, Standards und zwei Kontrollen zur Dokumentation festhalten. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sollten vorschriftsmäßig, wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, in dem Aluminiumbeutel verschlossen und gelagert werden.
- Es wird empfohlen eine 1:100 Verdünnung der Stuhlproben zu verwenden. Die Verdünnung der Proben ergibt einen Wert zwischen 25 mg/kg, Limit of Quantification (LoQ), und 2500 mg/kg im Stuhl an. Extrakte mit höheren Calprotectin Werten können weiter verdünnt werden (> 1:100) und erneut getestet werden, wenn ein genauer Wert benötigt wird. Extrakte mit niedrigeren Calprotectin Werten können niedriger verdünnt werden (1:50). Der verwendete Verdünnungsfaktor muss berücksichtigt werden bei der Umwandlung von ng/ml zu mg/kg (siehe Punkt 11 weiter unten).
- Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne nennenswerte Verzögerung zwischen den einzelnen Schritten durchführen.
- Für jeden Pipettierschritt der Standards, Kontrollen und Proben sind saubere Einmalspitzen zu verwenden.
- Um die bestmögliche und verlässlichen Ergebnisse zu erhalten, wird es empfohlen die Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung durchzuführen.
- Alle Proben und Kit Reagenzien sollten auf Raumtemperatur (18 – 25°C) gebracht werden, bevor der Test gestartet wird.

### ELISA Abarbeitung

1. Stuhlprobenextrakte 1:100 verdünnen (z.B. 10 µl Probe + 990 µl Probenverdünnungspuffer) und mittels Vortexers gut mischen.
2. 100 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Siehe Mikrotiterplattenbelegung in Abschnitt 8.
3. Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler (500 - 700 rpm) 40±5 Minuten inkubieren.
4. Nach der Inkubation die Flüssigkeiten der Platte verwerfen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 300 µl Waschlösung waschen. Waschlösung wiederentfernen und diesen Vorgang dreimal wiederholen. Wenn ein Waschautomat verwendet wird, sollten die Absaug- und Waschköpfe überprüft werden, damit sie nicht verstopft sind, um ein effizientes Waschen zu gewährleisten. Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang umdrehen und auf saugfähigem Papier ausschlagen, um verbleibende Waschlösung in den Vertiefungen zu entfernen.
5. Die Konjugatflasche vorsichtig vor Gebrauch mischen (nicht schütteln). 100 µl Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren, vorzugsweise mit einer Multipette oder Mehrkanalpipette.
6. Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler (500 - 700 rpm) 40±5 Minuten inkubieren.
7. Der Waschvorgang wird wie oben beschrieben wiederholt, drei mal 300 µl Waschlösung pro Vertiefung.
8. Zugabe von 100 µl TMB-Substrat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren, bevorzugt mit einer Multipette oder Mehrkanalpipette.
9. Mikrotiterplatte für 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (ohne schütteln) im Dunkeln inkubieren.
10. Zugabe von 100 Stopplösung in jede Vertiefung. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb.
11. Die Extinktion der Mikrotiterplatte wird im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen. Die Platte kurz schütteln lassen (2-4 Sekunden), bevor sie gemessen wird.

## 5 QUALITÄTSKONTROLLE

- Eine neue Standardkurve muss bei jedem Lauf mitgeführt werden.
- Die Positivkontrollen sollten in jedem Lauf mitgeführt werden. Der Wert der Kontrollen sollte innerhalb des Zielbereiches liegen, der auf den Etiketten der Flächen angegeben ist.
- Bei mitführen der Standards F und A soll der OD-Wert von Standard F (500 ng/ml)  $\geq 1.6$  sein und der OD-Wert von Standard A (0 ng/ml) soll unter 0,25 liegen. Eine repräsentative Standardkurve zeigt Abbildung 1.

## 6 AUSWERTUNG

Die Berechnung der Konzentration von Calprotectin in Stuhlproben:

1. Sollten Doppelbestimmungen gemacht worden sein wird der Mittelwert der OD-Werte der Standards und Proben ermittelt.
2. Die Konzentration jedes Standards (ng/ml) wird auf der X-Achse gegen den Mittelwert des OD-Wertes auf der Y-Achse aufgetragen, um eine Standardkurve zu erhalten. Eine **4-Parameter Funktionskurve wird empfohlen** (siehe Abbildung 1 weiter unten). Falls für die X-Achse eine logarithmische Darstellung benötigt wird, muss für den Standard A (0 ng/ml) eine Konzentration von 0,001 ng/ml verwendet werden.
3. Mit der Kalibrationskurve wird die Calprotectin Konzentration der verdünnten Proben (ng/ml) aufgrund ihrer OD-Werte bestimmt.
4. **Die Calprotectin Konzentration (ng/ml) in den verdünnten Stuhlproben wird mit 5 multipliziert, um die Menge an Calprotectin in der ursprünglichen Stuhlprobe in mg/kg zu erhalten.**

Dieser Faktor korreliert mit der Gesamtverdünnung von 1:5000 (1:50 während der Extraktionsprozedur und der anschließenden 1:100 Verdünnungen der Extrakte) und wandelt den Wert von ng/ml in mg/kg um.

*Beispiel: Wenn ein verdünnter Stuhlextrakt einen Wert von 100 ng/mL hat, war die Konzentration der ursprünglichen Stuhlprobe  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

**Achtung:** Falls Extrakte stärker (oder weniger) verdünnt wurden als die empfohlene 1:100 Verdünnung, muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor für die Berechnung berücksichtigt werden.

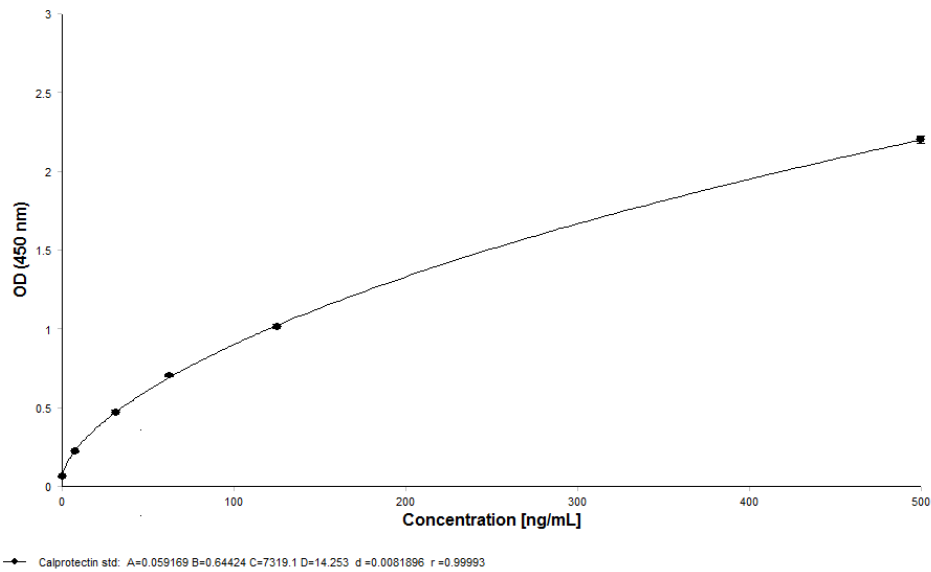


Abbildung 1: Eine repräsentative 4 Parameter Standardkurve.

## 10 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die folgenden Calprotectin-Werte in Stuhlproben zur klinischen Beurteilung wurden in der veröffentlichten Literatur angegeben<sup>3, 36, 37</sup>:

<b>Normalwert</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Positiver Wert</b>	> 50 mg/kg
<b>grauzone*</b>	50-100 mg/kg
<b>Aktive, symptomatisch entzündliche Darmerkrankung</b>	200 – 40,000 mg/kg

\*) Patienten mit Ergebnissen innerhalb der Grauzone wird empfohlen, den Test zu wiederholen, um die diagnostische Genauigkeit zu verbessern

Beachten Sie, dass eine Diagnose nicht auf der Grundlage eines einzelnen Testergebnisses erstellt werden sollte. Die Diagnose sollte die klinische Vorgeschichte und die Symptome berücksichtigen.

In Übereinstimmung mit der wissenschaftlichen Literatur und veröffentlichten klinischen Studien<sup>36, 37</sup> kann die folgende klinische Leistung für die Erkennung von entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu funktionellen Erkrankungen erwartet werden:

<b>Cut-off</b>	<b>Sensitivity (95% CI)</b>	<b>Specificity (95 % CI)</b>	<b>Positive predictive value</b>	<b>Negative predictive value</b>
50 mg/kg	0.90-0.99	0.70-0.77	0.31-0.44	0.98-1.00
100 mg/kg	0.89-0.99	0.84-0.90	0.46-0.62	0.98-1.00

## 11 SPEZIFIKATIONEN

**Hinweis:** Für die Verifizierungsstudien wurden Stuhlproben (1:100 verdünnt eingesetzt, unter Verwendung der ELISA Durchführung wie in Abschnitt 9 beschrieben (manuelle Abarbeitung).

### Präzision

Die Intra- und Inter-Präzisionsstudien wurden durchgeführt, um die gleichen Proben mit zwei verschiedenen Calprolab-Kit-Chargen zu testen.

Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit), Kotextrakte (n=20)

Concentration in faeces (mg/kg)	%CV
29,0	8,3
201,8	4,7
480,3	9,3
716,2	6,6
1314,4	3,2
2155,2	3,0

Inter-assay (total) Präzision (Reproduzierbarkeit), Kotextrakte (n=80)

Concentration in faeces (mg/kg)	%CV
30,5	15,9
209,5	3,7
509,1	12,3
780,3	8,7
1482,9	14,2
2141,9	10,3

### Übereinstimmung zwischen Extraktionsverfahren; Wägemethode versus EasyExtract\*

Intercept: -6.7, slope: 1.05, R= 0.97

\*) Weitere Details und Leistungsdaten zur Fäkalienabsaugung finden Sie in der Packungsbeilage für EasyExtract (Art.-Nr. CAL0510).

### Recovery:

Faeces: 90-113 %; getestet mit Stuhlextrakt, versetzt mit gereinigtem Calprotectin in fünf verschiedenen Konzentrationen.

### Grenze der Quantifizierung, Grenze der Detection und Grenze der Blank:

- Limit of Blank (LoB): 1.47 mg/kg
- Limit of Detection (LoD): 7.34 mg/kg
- Limit of Quantification (LoQ): 19.7 mg/kg

Die Quantifizierungs-, Nachweis- und Leerwerte wurden gemäß den CLSI-Richtlinien durchgeführt

### Vereinbarung mit Calpro Calprotectin-ELISA (Art.-Nr. CAL0100)

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) versus CALP0270: Zwischen den in beiden Assays analysierten Proben wurde eine akzeptable Korrelation und Übereinstimmung gefunden:

- **Intercept: 4.3 (95%CI: -0.84 – 14.3), slope: 1.05 (95% CI: 0.86-1.16), R = 0.94**

### Interferenz

Es wurde keine beobachtete Beeinflussung des ELISA durch häufig verwendete Arzneimittel beobachtet, siehe nachstehende Liste:

Prednisolone, Imurel, Salazopyrin, Trimetoprim, Ciprofloaxcin, Pentasa, Asacol, Ibox, Multivitamin und human Hemoglobin

Darüber hinaus wurde S001A12 auf mögliche Kreuzreaktivität getestet und es wurde keine Reaktivität beobachtet.

**Messbereich:** 19.7-2500 mg/kg

## 12 GRENZEN DES VERFAHRENS

- Die Diagnose darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Der klinische Hintergrund und die Symptome des Patienten müssen zusätzlich zu den Ergebnissen für die Diagnose in Betracht gezogen werden.

## 13 GEGENANZEIGEN

- Bei Patienten mit Granulozytopenie aufgrund einer Knochenmarksuppression können falsch negative Ergebnisse auftreten
- Patienten, die mit Azathioprin behandelt werden, können auch eine Granulozytopenie haben, die zu falsch negativen Ergebnissen führt.
- Einige Patienten, die nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) einnehmen, weisen erhöhte Calprotectin-Spiegel im Stuhl auf.
- Die Ergebnisse sind möglicherweise nicht klinisch auf Kinder unter 2 Jahren übertragbar, da diese häufig erhöhten Calprotectin-Spiegel im Stuhl aufweisen.
- Andere Darmerkrankungen, einschließlich vieler Magen-Darm-Infektionen und Darmkrebs, können zu erhöhten Calprotectin-Spiegeln führen.
- Calprotectin im Stuhl ist ein unspezifischer Indikator für Entzündungen im Darm. Erhöhte Werte bedeuten nicht unbedingt, dass der Patient eine aktive IBD hat. Es muss immer das gesamte Krankheitsbild beurteilt werden.

## 14 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für *in-vitro*-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV- Antikörper, Anti-HCV--Antikörper und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.

- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Für Stabilität von geöffneten Reagenzien siehe Punkt 5.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Standards, Kontrollen, Patientenproben, Konjugat und TMB-Substrat sorgfältig, ohne zu spritzen auf den Boden der Kavitäten pipettieren.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid in einer Konzentration von < 0,1% (w/v) und/ oder 0,1% Kathon.
- Die TMB-Substrat Lösung muss in der lichtundurchlässigen Originalflasche aufbewahrt werden. Die Lösung sollte klar bis hellblau sein. Vor dem Gebrauch vorsichtig mischen.
- Der **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP)** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches in guter Laborpraxis ausgebildet ist.

**WARNUNG:** Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Außerhalb der Reichweite von Kindern aufbewahren. Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

### Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.



**Achtung**

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

### Entsorgungshinweise

Rest von Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

### BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: CALP0270      CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP) (96 Bestimmungen)

# CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)

## KURZANLEITUNG

### CalproLab<sup>®</sup> ELISA (HRP) zur Analyse von Calprotectin in Stuhl

#### Extraktion

- Durchführen der Extraktion nach einer der in Kapitel 7.1 beschriebenen Methoden. Andere Extraktionen, welche einer Verdünnung von 1:50 (Gewicht:Volumen) der Stuhlprobe zur Folge haben, können ebenfalls verwendet werden.

#### ELISA (manuelle Abarbeitung)

- Verdünnen der Stuhlextrakte 1:100 in Probenverdünnungspuffer
  - Pipettieren von 100 µl Standards, Kontrollen und Proben in die ELISA Platte
  - Inkubation auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur für 40 ± 5 min\*
  - Wells drei mal mit 300 µl Waschpuffer waschen
  - Zugabe von 100 µl HRP Enzymkonjugat in jedes Well
  - Inkubation auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur für 40 ± 5 min
  - Wells drei mal mit 300 µl Waschpuffer waschen
  - Zugabe von 100 µl TMB Substratlösung in jedes Well
  - Inkubation unter Abdeckung für 20 – 30 min
  - Zugabe von 100 µl Stopplösung in jedes Well
  - Messen der OD Werte bei 450 nm mittels eines ELISA Photometers
1. Verwendung einer 4-Parameter Funktionskurve, Berechnung der Ergebnisse in (ng/mL). Schütteln Sie die Platte 3-4 Sekunden vor dem Lesen.
- mg/kg in Stuhlproben = ng/mL × 5

Bei Fragen, kontaktieren Sie bitte [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)



## 1 USO PREVISTO

El ELISA de Calprotectina (HRP) de CALPROLAB<sup>®</sup>, es un método cuantitativo para la determinación de calprotectina en muestras de heces y por lo tanto se puede utilizar como una ayuda en la identificación de enfermedad orgánica del intestino delgado, del intestino grueso o del estómago en pacientes, para determinar la actividad de la enfermedad y monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes con Colitis Ulcerosa o Enfermedad de Crohn. El ELISA de **Calprotectina (HRP) de CALPROLAB<sup>®</sup>** ha sido validado para muestras de heces.

**La prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.**

## 2 ANTECEDENTES

Varios tipos de enfermedades orgánicas en el tracto gastrointestinal pueden causar daños en el revestimiento del epitelio intestinal (capa mucosa). Tal daño puede variar desde aumento de la permeabilidad de la mucosa hasta inflamación y ulceraciones. El contenido del intestino es rico en bacterias y otros microorganismos liberadores de sustancias las cuales pueden ser tóxicas o quimiotácticas, es decir, que estimulan los leucocitos, en particular granulocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN por sus siglas en inglés), para migrar en el lumen del intestino donde liberan sus contenidos incluyendo sustancias antimicrobianas como Calprotectina. Esta proteína constituye aproximadamente el 60 % del total de proteínas en el citoplasma de los PMN<sup>2</sup> y puede ser fiablemente estimada en muestras fecales almacenadas hasta por siete días a temperatura ambiente<sup>3</sup>.

La Calprotectina es una proteína de 36 kilodaltons unida a calcio y zinc<sup>4</sup>, producida por los PMNs, monocitos y células epiteliales escamosas (excepto aquellas en la piel normal)<sup>5,6</sup>. Después de la unión de calcio, esta puede resistir la degradación por enzimas leucocitarias y microbianas<sup>3,7</sup>. Al competir con diferentes enzimas por cantidades limitadas, locales de zinc, la Calprotectina puede inhibir muchas enzimas dependientes de zinc<sup>8</sup> y por lo tanto matar microorganismos o células humanas y animales en cultivo<sup>9,10</sup>. Diferentes tipos de enfermedades, por ejemplo, infecciones bacterianas, artritis reumatoide y cáncer, conducen a la activación de los PMNs y a un aumento de los niveles de Calprotectina en plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido crevicular, orina u otros materiales humanos<sup>1</sup>.

Es de especial importancia que la concentración de Calprotectina en heces se correlaciona con el número de PMNs que migran en el lumen intestinal<sup>11</sup>, y que puede ser detectada con fiabilidad incluso en muestras pequeñas (menos de un gramo) aleatorias de heces<sup>3,12</sup>. Por otra parte, las enfermedades orgánicas del intestino dan una fuerte señal de Calprotectina, es decir, las elevaciones son regularmente de cinco a mil veces superior al valor de referencia en individuos sanos<sup>3,13,14,15</sup>, lo que indica inflamación intestinal.

Las enfermedades intestinales inflamatorias (EII), es decir, la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn, pueden aparecer desde la primera infancia hasta la edad avanzada y el diagnóstico a menudo se retrasa debido a los síntomas o renuencia a realizar endoscopia y biopsia. El ELISA de **Calprotectina (HRP) de CALPROLAB<sup>®</sup>** puede contribuir a un diagnóstico precoz de las EII ya que la prueba es positiva por lo general en las EII activas.

Los trastornos funcionales, como el síndrome del intestino irritable (SII) no incrementa las concentraciones de Calprotectina fecal, pero si los trastornos abdominales orgánicos como EII. Los pacientes con trastornos abdominales orgánicos y funcionales pueden tener síntomas similares, y el examen clínico por sí solo puede no ser suficiente para dar un diagnóstico específico. Procedimientos de diagnóstico adicionales son complejos, costosos y pueden exponer al paciente al dolor y otros riesgos. La prueba para la Calprotectina fecal es un método simple, no invasivo, de bajo costo y objetiva que puede ayudar a seleccionar a los pacientes para exámenes adicionales, como endoscopia. Los síntomas abdominales son muy comunes tanto en niños y adultos y un resultado negativo, medido por el ELISA de **Calprotectina (HRP) de CALPROLAB<sup>®</sup>** puede con alta probabilidad excluir trastornos inflamatorios intestinales<sup>13</sup>.

La curación de la mucosa es el objetivo principal en el tratamiento de las EII, y una prueba para Calprotectina fecal puede decir cuando esto se ha logrado. Muchos pacientes con EII en remisión clínica y con los niveles de proteína C reactiva normales (CRP) todavía presentan inflamación en curso<sup>16</sup>, esto reflejado por un aumento de Calprotectina fecal. Dichos pacientes presentan un mayor riesgo de recaída en pocos meses<sup>17</sup>. Si la curación de la mucosa es alcanzada, el riesgo de recaída y la necesidad de una cirugía abdominal mayor se reducen<sup>19</sup>. Normalización de los niveles de Calprotectina fecal significa que la curación de la mucosa se ha logrado<sup>20</sup>. El riesgo y la gravedad de los efectos secundarios al tratamiento deben sopesarse con el riesgo de inflamación continua, recaída clínica severa y complicaciones.

La importancia de lograr la curación de la mucosa ha sido el foco de muchos estudios<sup>21-29</sup> y artículos científicos<sup>30,35</sup>.

### 3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ELISA de **Calprotectina (HRP) de CALPROLAB®** se basa en la preparación de un extracto de heces utilizando nuestro sistema patentado de solución de extracción de heces. El nivel de Calprotectina se determina mediante el ensayo del extracto en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) específico para Calprotectina.

En el ELISA, muestras y calibradores se incuban en pozos de microtitulación separadas recubiertas con anticuerpos monoclonales que se unen a la Calprotectina. Después de la incubación y el lavado de los pozos, la Calprotectina unida se deja reaccionar con la enzima marcada con anticuerpos específicos para Calprotectina. Después de esta reacción, la cantidad de enzima unida en los pozos de microtitulación es proporcional a la cantidad de Calprotectina en la muestra o calibrador, que se determina por incubación con un sustrato para la enzima que da un producto coloreado. La intensidad del color se determina por absorbancia usando un lector de placas de ELISA, y es proporcional a la concentración de calprotectina en los calibradores y las muestras. El ensayo se calibra usando Calprotectina purificada a partir de extracto de leucocitos.

## 4 MATERIALES

### 4.1 Reactivos suministrados con el kit

- **MTP** **Placa de microtitulación recubierta**: 12 tiras de 8 pozos, por tira, recubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón purificados con afinidad específica para la Calprotectina. La placa se almacena en una bolsa sellada con desecante.
- **DIL 5x** **Solución de dilución de la muestra (conc 5x) \*\*\***: 1 x 20 ml, concentrado 5x, que se diluye con agua destilada/desionizada, pH 8.0 ± 0.2, solución de color amarillo, botella con tapa de color azul.
- **WASH|BUF 20x** **Solución de lavado (20x conc)\***: 1 x 50 mL, concentrado 20x, que se diluye con agua destilada/desionizada, para lavar los pozos; pH 7.8 ± 0.2, solución transparente, botella con tapa de color blanco.
- **FEC|EXTR|BUF 2,5x** **Solución de extracción fecal (2,5 x conc) \*\***: 2 x 90 ml, concentrado 2.5x, que se diluye con agua destilada/desionizada, pH 8.0 ± 0.2, solución clara, botellas con tapas blancas.
- **CAL|A-F** **Calibradores de Calprotectina \*\*\***: 6 viales con 1.0 ml, listos para usar; solución de color amarillo, frascos con tapas de diferentes colores:
 

Estándar A: Tapa Azul	0	ng/mL
Estándar B: Tapa Verde	7,8	ng/mL
Estándar C: Tapa Amarilla	31,3	ng/mL
Estándar D: Tapa Roja	62,5	ng/mL
Estándar E: Tapa Blanca	125	ng/mL
Estándar F: Tapa Negra	500	ng/mL
- **CTR|LOW|CTR|HIGH** **Controles Calprotectina "Bajo" y "Alto" \*\*\***: 2 viales con 1.0 ml, listo para usar; solución de color amarillo; Control bajo: vial con tapa de color marrón; Control alto: vial con tapa de color púrpura.
- **CONJ** **Conjugado enzimático \*\*\*\***: 13 ml peroxidasa de rábano marcado, anticuerpos policlonales purificados de conejo contra Calprotectina, listo para usar, solución de color rojo, 25 ml tubo de reactivo Dynex con tapa blanca.
- **SUB|TMB** **Substrato TMB**: El frasco contiene 13 ml de sistema-tetrametilbenzidina/peróxido/hidrógeno. El reactivo está listo para usar.

- **SOLN STOP Solución de parada:** La botella contiene 13 ml de solución de ácido sulfúrico 0,2 M (R 36/38, S 26), 25 ml tubo de reactivo Dynex con tapa blanca.

- \* Contiene  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1)
- \*\* Contiene  $<0.1\%$  azida sodica
- \*\*\* Contien  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1)  $<0.1\%$  azida sodica
- \*\*\*\* Contiene 0.02% MIT y 0.02% bromonitrodioxana

## 4.2 Materiales suministrados

- 2 laminas sellantes
- 1 protocolo de prueba
- 1 diseño de la placa

## 4.3 Material requerido pero no suministrado

- Agua destilada/desionizada
- Dispositivos de extracción (véase la sección 7.1.1 y 7.1.2)
- Asas de siembra rompibles y desechables (si se utiliza método de ponderación en la sección 7.1.3)
- Balanza digital (40-150 mg) (si se utiliza método de ponderación en la sección 7.1.3)
- Tubos tapa rosca de poliestireno desechables, 5 mL (si se utiliza método de ponderación en la sección 7.1.3)
- Vortex
- Tubos desechables para la dilución de muestras: tubos Eppendorf o similar (si el ensayo se realiza de forma manual)
- Pipetas para volúmenes de 10 - 1.000  $\mu$ l (si el ensayo se realiza manualmente)
- Pipeta multicanal, 100 $\mu$ l (si el ensayo se realiza manualmente)
- Lavador de microplacas o pipeta multicanal, 300  $\mu$ l (si el ensayo se realiza manualmente)
- Agitador de placas (500 - 700 rpm) (si el ensayo se realiza manualmente)
- Temporizador (si el ensayo se realiza manualmente)
- Lector de microplacas, filtro de 450 nm (si el ensayo se realiza manualmente)

## 5 ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Cuando se almacena sin abrir de 2 - 8 °C, los reactivos del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Placas abiertas, reactivos y soluciones concentradas son estables durante un máximo de tres meses, cuando se almacena a 2 - 8 ° C.

Cuando se prepara en recipientes limpios, las soluciones diluidas (1x) de solución de lavado, solución de dilución de muestra y la solución de extracción fecal se pueden almacenar a 2 - 8 °C máximo durante un mes. Evite la exposición a las altas temperaturas y la luz solar directa.

## 6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y controles deben estar a temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes de comenzar la prueba.

### 6.1 Tiras recubiertas de la placa de microtitulación

Las tiras recubiertas con anticuerpos monoclonales purificados de ratón específico para Calprotectina están listas para usar. Las tiras sin utilizar deben ser retirados de la base y de inmediato volver a sellarse en la bolsa de papel de aluminio junto con el desecante. Almacenar de 2-8 °C.

## 6.2 Solución Diluyente de Muestra

Diluir la solución diluyente de muestra concentrada 5x, adicionando 1 parte (20 ml) a 4 partes (80 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para un volumen final de 100 ml. Mezclar bien. Conservar en un recipiente cerrado a 2 - 8 °C.

Nota: Si utiliza un DS2 Dynex, la solución de dilución de la muestra debe ser transferida a un tubo Dynex de 25 ml, antes de ejecutar la prueba.

## 6.3 Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada 20x adicionando 1 parte (50 ml) a 19 partes (950 ml) de agua destilada / desionizada en un recipiente limpio para un volumen final de 1000 ml. Mezclar bien. Guarde la solución de lavado en un recipiente cerrado a 2 - 8 °C.

## 6.4 Solución de Extracción fecal

Diluir la solución de extracción fecal concentrada 2,5x, adicionando 1 parte (90 ml) a 1,5 partes (135 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para un volumen final de 225 ml. Mezclar bien. Almacenar el tampón diluido en un recipiente cerrado a 2 - 8 °C.

## 6.5 Calibradores y controles

Los viales marcados con Calibrador A - F, así como los controles, contienen 1,0 ml cada uno, listo para usar. La concentración de Calprotectina está impresa en la etiqueta de cada vial. Los viales se ajustan directamente en Dynex DS2. Almacenar a 2-8 °C.

## 6.6 Conjugado enzimático

El frasco contiene 13 ml de peroxidasa de rábano (HRP), purificado con anticuerpos de conejo contra Calprotectina en un buffer con estabilizadores, conservantes y un colorante rojo inerte. La solución está lista para usar. El frasco encaja directamente en Dynex DS2 y ELISA DSX. Almacenar a 2-8 °C.

## 6.7 Solución de sustrato enzimático (TMB)

El frasco contiene 13 ml de solución de tetrametilbencidina/ peróxido hidrógeno (TMB). La solución está lista para usar y se debe almacenar en su envase original. Almacenar a 2-8 °C, protegido de la luz.

Nota: Si se utiliza un Dynex DS2 ELISA, la solución de sustrato enzimático debe ser transferido a un frasco de reactivo de 25 ml antes de ejecutar la prueba.

## 6.8 Solución de parada

El frasco contiene 13 ml de solución de ácido sulfúrico 0,2 M (R 36/38, S26). La solución está lista para usar. El frasco encaja directamente en DS2. Almacenar a 2-8 °C.

# 7 PROCEDIMIENTO DE TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

## 7.1 Muestras fecales

La Calprotectina es muy estable en las heces, los pacientes pueden recoger pequeñas muestras de heces en casa. Colectar 1-5 g (aproximadamente una cucharadita), colocarla en un recipiente limpio adecuado y entregarlo al laboratorio lo antes posible, pero antes de cinco días. Cuando se ponen en un recipiente aprobado para el transporte, se puede enviar por correo ordinario, es decir, no se necesita refrigeración. Se debe evitar la exposición a temperaturas por encima de 30 °C.

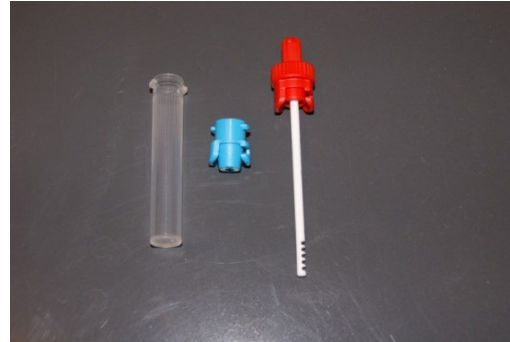
Las muestras también pueden ser congeladas a -20 °C o menos, hasta la entrega o envío. Las muestras congeladas deben descongelarse y atemperarse antes de la extracción y el ensayo. Tenga en cuenta que las muestras fecales congeladas en algunos casos pueden provocar un aumento de los niveles de calprotectina, muy probablemente debido a la liberación de granulocitos.

Nota: Antes de comenzar la extracción, la muestra de heces debe ser bien homogeneizada utilizando, por ejemplo, una espátula, antes de tomar una pequeña cantidad para la extracción.

Para la extracción se recomienda el uso de Calpro® Easy Extract o uno de los otros métodos que se describen a continuación (capítulo 7.1.2 y 7.1.3). Lleve a cabo la extracción, según el inserto del dispositivo de extracción /método elegido. Otros métodos y dispositivos, validados por el cliente, se pueden usar.

### 7.1.1 Extracción con Calpro® Easy Extract

Modo de empleo: por favor, lea el inserto para el producto N ° CAL0510



(Calpro AS, Producto No. CAL0510)

### 7.1.2 Extracción con el método de pesaje (sin dispositivo de extracción)

1. Pesar (tarar) un tubo con tapa de rosca vacío con un asa de siembra.
2. Tomar aprox. 100 mg (entre 40 y 120 mg) de heces mediante el asa de siembra y colocarlo en el tubo tapa rosca. Evite coleccionar material sólido, sin digerir como las fibras y semillas.
3. Pesar tubo y el asa de siembra con heces lo cual le dará el peso neto de las heces.
4. Romper o cortar la parte superior del mango cerrado y dejar la parte inferior en el interior del tubo.
5. Añadir la solución de extracción a una relación peso: volumen de 1:50, por ejemplo 4,9 ml de tampón a 100 mg de heces. Cerrar el tubo.
6. Mezclar vigorosamente durante 30 segundos en un vortex.
7. Continuar la mezcla en un agitador (a aprox. 1.000 rpm) durante  $30 \pm 5$  minutos con el asa de siembra en el interior del tubo, como un agitador.
8. Permitir un par de minutos para que las partículas se asienten y pipetear con cuidado desde la parte superior del tubo. No es necesario centrifugar, pero una corta centrifugación puede llevarse a cabo si se requiere una solución libre de partículas.
9. El extracto, que representa una dilución 1:50 (peso: volumen) de la muestra de heces, está ya listo para la dilución y las pruebas.
10. Para el almacenamiento, transferir aproximadamente 0,5 ml a un tubo nuevo. Los extractos se pueden almacenar a  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  durante al menos cinco días o congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta dos años<sup>48)</sup>

## 7.2 SUGERENCIA DISPOSICIÓN DE LA PLACA

	1	2	3	4	etc.	
<b>A</b>	Calibrador A 0 ng/mL	Calibrador E 125 ng/mL	Muestra 1	Muestra 5		
<b>B</b>	Calibrador A 0 ng/mL	Calibrador E 125 ng/mL	Muestra 1	Muestra 5		
<b>C</b>	Calibrador B 7.8 ng/mL	Calibrador F 500 ng/mL	Muestra 2	Muestra 6		
<b>D</b>	Calibrador B 7.8 ng/mL	Calibrador F 500 ng/mL	Muestra 2	Muestra 6		
<b>E</b>	Calibrador C 31.3 ng/mL	Control "bajo"	Muestra 3	Muestra 7		
<b>F</b>	Calibrador C 31.3 ng/mL	Control "bajo"	Muestra 3	Muestra 7		
<b>G</b>	Calibrador D 62.5 ng/mL	Control "alto"	Muestra 4	Muestra 8		
<b>H</b>	Calibrador D 62.5 ng/mL	Control "alto"	Muestra 4	Muestra 8		

Sugerencia de diseño de la placa de ELISA para calibradores, controles y muestras utilizando el procedimiento manual. Se recomienda procesar por duplicado para mayor fiabilidad de los resultados. Un plato lleno toma 40 muestras.

## 7.3 PROCEDIMIENTO DE ELISA

El siguiente procedimiento es para la prueba manual. Protocolos validados para Dynex DS2 están disponibles bajo petición. Tenga en cuenta que los viales de controles y calibradores, así como el frasco de conjugado enzimático, encajan directamente en el DS2.

### Notas para el Procedimiento

- Preparación: Lea el protocolo de prueba cuidadosamente antes de realizar el ensayo. El resultado depende de seguir estrictamente el protocolo como se describe. Antes de comenzar el ensayo, realice un esquema de la placa con todos los calibradores, muestras y controles utilizando por ejemplo la hoja incluida en el kit. Seleccione el número necesario de tiras de micro titulación. Las tiras sin utilizar se deben devolver a la bolsa de aluminio, cerrarla muy bien y almacenarlos como se describe en la Sección 6.1.
- Se recomienda una dilución 1:100 de los extractos de las heces. Esta dilución dará resultados de la muestra entre 25 mg/kg (LoQ) y 2500 mg/kg en las heces. Los extractos con valores de Calprotectina mayores pueden diluirse más (> 1:100) y se debe realizar de nuevo la prueba, si se requiere un valor. Extractos con valores bajos de calprotectina se pueden diluir menos (1:50). El factor de dilución ajustado debe ser tomado en cuenta cuando se convierte de ng/ml a mg/kg (véase la sección 11).
- Realizar el ensayo en el orden indicado y sin demora entre los pasos.
- Se deben utilizar puntas desechables y limpias para la dispensación de cada calibrador, control y muestra.
- Para obtener resultados más confiables los calibradores, controles y muestras de pacientes deben ser analizados por duplicado.
- Todas las muestras y reactivos del kit deben alcanzar la temperatura ambiente entre (18 - 25 ° C) antes de iniciar la prueba.

## Procedimiento ELISA

1. Diluir los extractos de las heces 1:100 (por ejemplo, 10 $\mu$ l de muestra + 990  $\mu$ l de solución diluyente de muestra) y mezclar en un vortex.
2. Añadir 100 $\mu$ l de cada calibrador, control y muestras diluidas en los pozos de reacción por duplicado, consulte la disposición de la placa recomendada en la Sección 8.
3. Cubrir la placa con el papel sellante e incubar a temperatura ambiente durante  $40 \pm 5$  min en un agitador (aproximadamente 500-700 rpm).
4. Al finalizar el tiempo de incubación retirar el líquido y lavar los pozos adicionando 300  $\mu$ l de solución de lavado en cada pozo. Remueva la mayor cantidad de líquido posible y repeta hasta que se haya realizado un total de tres lavados. Si se utiliza un lavador de placas, compruebe que todas las agujas de aspiración y dispensado no estén obstruidas para asegurar un lavado eficiente de todos los pozos. Después del último lavado, invierta la placa y golpéela vigorosamente sobre papel absorbente para eliminar cualquier resto de solución de lavado.
5. Mezclar el contenido del frasco de conjugado enzimático suavemente antes de su uso (sin agitar). Añadir 100  $\mu$ l de conjugado enzimático a cada pozo, preferiblemente con una pipeta multicanal.
6. Cubrir la placa con papel sellante e incubar a temperatura ambiente durante  $40 \pm 5$  min en un agitador (aproximadamente 500-700 rpm).
7. Repetir el paso de lavado como se ha descrito anteriormente, tres veces con 300 $\mu$ l de solución de lavado por pozo.
8. Añadir 100  $\mu$ l de TMB a cada pozo, preferiblemente usando una pipeta multicanal.
9. Incubar la placa a temperatura ambiente (sin agitar) durante 20 a 30 minutos, protegida de la luz.
10. Añadir 100  $\mu$ l de solución stop 0,2 M a cada pozo se requiere un período de incubación fijo.
11. Leer los valores de densidad óptica (DO) a 450 nm utilizando un lector de ELISA. Si el lector de placa tiene la opción de agitar, realizarla brevemente de (2-3 segundos) antes de la lectura.

## 8 CONTROL DE CALIDAD

- Se debe procesar la curva en cada corrida.
- Los controles positivos deben ser incluidos en cada montaje. El valor de los controles debe estar dentro de los límites impresos en las etiquetas de los viales.
- Como guía, el valor de DO del calibrador F (500 ng/ml) debe ser  $\geq 1.6$  y el valor de DO del calibrador A (0 ng/ml) debe ser  $\leq 0,25$ . Una curva estándar representativa se muestra en la figura 1.

## 9 EVALUACIÓN

Cálculo de la concentración de Calprotectina en muestras fecales de pacientes:

1. Calcular la media de los valores de DO de todos los pozos duplicados (calibradores y muestras).
2. Trazar el valor de cada concentración estándar (ng/ml) en el eje X contra el valor medio de la DO en el eje Y para obtener una curva estándar. Se recomienda utilizar una **curva de 4 parámetros** (véase el gráfico 1). Si se requiere un eje X logarítmico, un valor de 0,001 ng/ml debe ser utilizado para el patrón A (0 ng/ml).
3. Utilice la curva de calibración para determinar la concentración de Calprotectina en las muestras diluidas (ng/ml) en función de sus valores de DO.
4. **Multiplique la concentración de Calprotectina (ng/ml) en los extractos fecales diluidos por 5 con el fin de convertir a mg/kg de Calprotectina en las muestras de heces originales.**

Este factor corrige para la dilución total de 1:5000 (1:50 durante el procedimiento de extracción y la siguiente dilución 1:100 de los extractos) y convierte el valor de ng/ml a mg/kg.

Ejemplo: si una muestra de extracto diluida tiene un valor de 100 ng/ml la concentración en la muestra de heces original fue  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.

Nota: Si los extractos se han diluido más (o menos) que el 1:100 recomendado, el factor de dilución adicional se debe introducir en el cálculo.

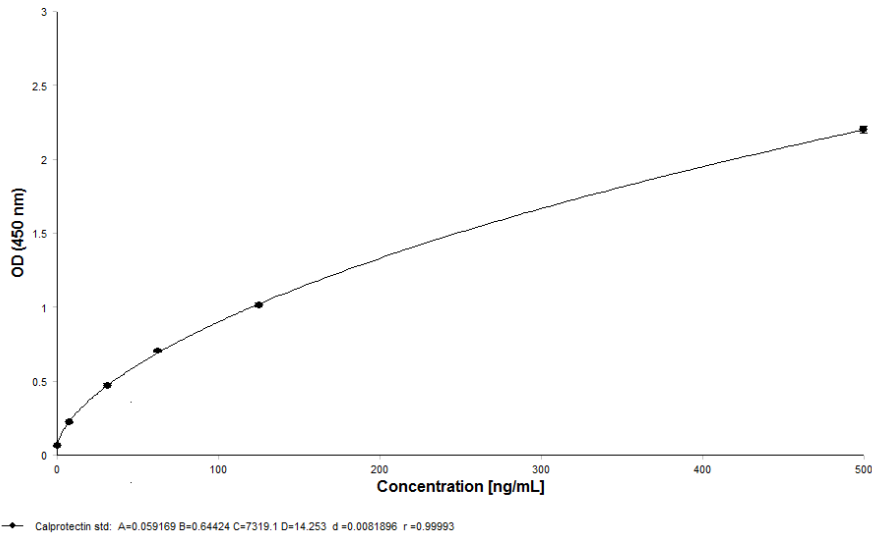


Figura 1: Una curva estándar representativa de 4 parámetros.

## 10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los siguientes valores de Calprotectina en muestras de heces para evaluación clínica se han informado en la literatura publicada<sup>3, 36, 37</sup>:

<b>Valor normal</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Valor positivo</b>	> 50 mg/kg
<b>Zona gris*</b>	50-100 mg/kg
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal activa y sintomática</b>	200 – 40,000 mg/kg

\*) Se recomienda a los pacientes con resultados dentro de la zona gris que repitan la prueba para mejorar la precisión diagnóstica.

Tenga en cuenta que un diagnóstico no debe establecerse en base a un solo resultado de la prueba. El diagnóstico debe tener en cuenta la historia clínica y los síntomas.

De acuerdo con la literatura científica y los estudios clínicos publicados<sup>36, 37</sup>, se puede esperar el siguiente rendimiento clínico para la detección de la enfermedad inflamatoria intestinal frente a la enfermedad funcional:

Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95 % CI)	Positive predictive value	Negative predictive value	
50 mg/kg	0.90-0.99	0.70-0.77	0.31-0.44	0.98-1.00	
100 mg/kg	0.89-0.99	0.84-0.90	0.46-0.62	0.98-1.00	

## 11 ESPECIFICACIONES

**Nota:** Todos los estudios de verificación se realizaron por prueba manual en muestras de extracto de heces (diluido 1:100).



**Precisión:** Los estudios de precisión intra e inter se realizaron en tres laboratorios probando las mismas muestras en dos lotes diferentes de kits Calprolab.

Precisión del ensayo Intra (repetibilidad), extractos de heces (n=20)

Concentration in faeces (mg/kg)	%CV
29,0	8,3
201,8	4,7
480,3	9,3
716,2	6,6
1314,4	3,2
2155,2	3,0

Precisión del ensayo (total), extractos de heces (n=80)

Concentration in faeces (mg/kg)	%CV
30,5	15,9
209,5	3,7
509,1	12,3
780,3	8,7
1482,9	14,2
2141,9	10,3

**Acuerdo entre los métodos de extracción; método de pesaje frente a Easy Extract\***

Intercept: -6.7, slope: 1.05, R= 0.97

\*) Se pueden encontrar más detalles y datos de rendimiento sobre la extracción fecal en el prospecto de EasyExtract (prod. No. CAL0510).

**Recuperación:**

Faeces: 90-113 %; probado con extracto fecal enriquecido con Calprotectin purificado en cinco niveles diferentes.

**Límite de cuantificación, límite de detección y límite de espacio en blanco:**

- Limit of Blank (LoB): 1.47 mg/kg
- Limit of Detection (LoD): 7.34 mg/kg
- Limit of Quantification (LoQ): 19.7 mg/kg

El límite de Cuantificación, Detección y espacio en blanco se realizaron según la directriz CLSI EP17A-Ed2

**Acuerdo con Calpro Calprotectin ELISA (prod. no. CAL0100)**

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) versus CALP0270: Se ha encontrado una correlación y concordancia aceptables entre las muestras analizadas en ambos ensayos:

- Intercept: 4.3 (95%CI: -0.84 – 14.3), slope: 1.05 (95% CI: 0.86-1.16), R = 0.94

**Interferencia**

No se observó ninguna interferencia en el ELISA de productos farmacéuticos de uso común, véase la lista siguiente:

Prednisolone, Imurel, Salazopyrin, Trimetoprim, Cipofloaxcin, Pentasa, Asacol, Ibux, Multivitamin and human Hemoglobin

Adicionalmente, se probó la posible reactividad cruzada de S001A12 y no se observó reactividad.

**Rango de medición**

22.2-2500 mg/kg

**12 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

- El diagnóstico no debe establecerse sobre la base de un único ensayo. El diagnóstico debe tomar en consideración la historia clínica y los síntomas.

**13 CONTRAINDICACIONES**

- Los resultados falsos negativos podrían ocurrir en pacientes que tienen granulocitopenia debido a la supresión de la médula ósea
- Los pacientes tratados con azatioprina también pueden tener granulocitopenia que resulta en falsos negativos.
- Algunos pacientes que toman medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tendrán niveles elevados de calprotectina fecal.
- Los resultados pueden no ser clínicamente aplicables a niños menores de 2 años de edad, ya que a menudo tienen niveles elevados de calprotectina fecal.
- Otras enfermedades intestinales, incluyendo muchas infecciones gastrointestinales y cáncer colorrectal pueden resultar en niveles elevados de calprotectina.
- La calprotectina fecal es un indicador no específico de inflamación en el intestino. Los niveles elevados no significan necesariamente que el paciente tenga EII activa. El cuadro clínico completo siempre necesita ser evaluado.

**14 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

- De conformidad con el artículo 1, apartado 2b, de la Directiva Europea 98/79/CE , el fabricante está destinado a utilizar los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* para garantizar la idoneidad, el rendimiento y la seguridad del producto.
- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.


- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinados para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta o después de 1 mes de diluidos los reactivos concentrados and soluciones de trabajo.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado enzimático y sustrato, así como los estándares no presenten contaminación microbiana antes de continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado enzimático con exactitud hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- Algunos reactivos contienen azida de sodio a menos de 0,1% (w/v) y/o 0,1% de Kathon.
- Almacenar la solución de sustrato en la botella original, opaca, la solución debe ser transparente a amarillo pálido. Mezclar bien antes de usar.
- El ensayo de ELISA de Calprotectina (HRP) está diseñado para su uso por personal calificado con formación en buenas prácticas de laboratorio.

**ADVERTENCIA:** ¡El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! Manténgase fuera del alcance de los niños. Después del contacto con los ojos, enjuagar bien con agua y buscar consejo médico.

## NOTA DE SEGURIDAD PARA LOS REACTIVOS QUE CONTIENEN SUSTANCIAS PELIGROSAS

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

	<b>Atención</b>	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
		P261	Evitar respirar el aerosol.
		P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
		P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón y agua.
		P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
		P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad

## 15 CONSIDERACIONES SOBRE LA ELIMINACIÓN

Residuos de productos químicos y preparaciones se consideran en general como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulado a través de leyes y reglamentos nacionales y

regionales. Comuníquese con las autoridades locales o las empresas de gestión de residuos que dará indicaciones sobre cómo descartar los residuos peligrosos.

## **INFORMACIÓN DEL PEDIDO**

Código de Producto: CALP0270

CALPROLAB® Calprotectina ELISA (HRP) (96 tests)

# CALPROLAB<sup>®</sup> Calprotectin ELISA (HRP)

## GUÍA RÁPIDA

CalproLab<sup>®</sup> ELISA (HRP) para el análisis de calprotectina en heces

### Extracción

- Realizar la extracción de acuerdo con uno de los métodos descritos en la sección 7.1.1 – 7.1.3

### ELISA (procedimiento manual)

- Diluir el extracto de las heces 1:100 en la solución Diluyente de muestra
- Adicionar 100 µL de calibradores, controles and muestras en la placa de MICROELISA
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente por 40 ± 5 min
- Lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado
- Adicionar 100 µL de conjugado enzimático a cada pozo
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente por 40 ± 5 min
- Lavar los pozos tres veces con 300 µL de solución de lavado
- Adicionar 100 µL de TMB en cada pozo
- Incubar cubierto y protegido de la luz por 20 – 30 min
- Adicionar 100 µL de solución de paro a cada pozo
- Leer la DO usando filtro de 450nm. Agite el plato durante 3-4 segundos antes de leer.
- Usar una curva de 4-parametros para calcular los resultados (ng/mL)
- mg/kg en heces = ng/mL × 5

Para preguntas, por favor escribir a [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

## REFERENCES / LITERATUR / REFERENCIAS

- 1) Johne B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50:113-123.
- 2) Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p. 187-210
- 3) Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798.
- 4) Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134: 1-6.
- 5) Dale I et al.: Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. *American J of Clin Pathology* 1985; 84: 24-34
- 6) Brandtzaeg P et al.: Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *American J of Clin Pathology* 1987; 87: 700-707.
- 7) Fagerhol MK: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: M74-M79.
- 8) Isaksen B and Fagerhol MK: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 289-292.
- 9) Steinbakk M et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336: 763-765.
- 10) Yui S et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukaemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudates cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58: 650-658.
- 11) Røseth AG et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54
- 12) Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292: 41-54.
- 13) Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
- 14) Bunn SK et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33: 14-22.
- 15) Bjarnason I and Sherwood R: Fecal calprotectin: A significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Paediatric Gastroenterology Nut* 2001; 33: 11-13
- 16) Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. *Internist* 2010;51:1492-1498
- 17) Tibble JA et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.
- 18) Schnitzler F et al.: Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1295-1301
- 19) Björkstén CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, Sep 21
- 20) Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58:176-80
- 21) Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. *Med Clin North Am*. 2010;94:1-18
- 22) Pineton de Chambrun G et al.: Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(1):15-29
- 23) Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:338-346
- 24) Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics*, 2010;11(3):421-437
- 25) Lin MV et al.: What is the optimal therapy for Crohn's disease: step-up or top-down? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):167-180
- 26) Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010;15(2):309-322
- 27) Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? *Dig Dis* 2010;28(3):548-555
- 28) Schwartz M and Regueiro M: Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011 Feb;13(1):95-100
- 29) Ha C and Kornbluth A: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(6):471-478.
- 30) Fagerberg UL et al.: Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(4):414-420



















- 31) Rutgeerts P et al.: Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2009;136(5):1182-1197
- 32) Jalocha L et al.: Mucosal healing in Crohn disease. *Pol Merkur Lekarski*. 2009;26(155):554-555;
- 33) Baert F et al.: Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2010;138(2):463-468
- 34) Allez M and Lémann M: Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2626-2632
- 35) Lassen A: Calprotectin in feces a well-documented marker of gastrointestinal inflammation. Indicates disease intensity--normalization of values predict mucosal healing. *Läkartidningen*, 2010;107(143):2645-2649
- 36) Sander J et al.: Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*. 1984 Jun;44(4): 357-62
- 37) Golden BE et al.: Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1996 Feb;74(2):136-9
- 38) Berntzen HB et al.: The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(2): 74-82
- 39) Haga HJ et al.: Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993; 2(1): 47-50
- 40) Madland TM et al.: Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol*. 2002;31(6):351-354
- 41) Frosch M et al.: Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2622-2626
- 42) Hammer HB et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1093-97
- 43) Arvesen K et al.: *Eur Heart J*. 1996 Aug;17 Abstr Suppl:1-646.
- 44) Katashima et al.: Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ Journal* 2010;74(4):741-8
- 45) Altwegg LA et al.: Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2007;28(8):941-8
- 46) Calpro AS Information letter, June 2012 (available upon request: [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no))
- 47) Johne B et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia, *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 291-296
- 48) Internal Design Verification Report: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027.2014-04-09

## 16 ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABREVIACIONES

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**ORDER INFORMATION**

Product code: CALP0270, CALPROLAB® Calprotectin ELISA (HRP) (96 Determinations)

<b>Symbols Key / Symbolschlüssel / Tabela de símbolos</b>	
	Produsert av/Manufactured by / Hergestellt von / Fabricado por / Fabricado por
	In Vitro Diagnostisk medisinks utsyr/In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum /
	Lot nummer/Lot Number / Chargenbezeichnung / Número de lote
	Holdbarhetsdato/Expiration Date / Verfallsdatum / Data de Validade
	Lagringstemperatur/Storage Temperature / Lagertemperatur / Temperatura de almacenamiento
	CE merke/CE Mark / CE-Zeichen / Marca CE
	Katalognummer/Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo
	Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo
	Mikroplate/Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaca
	Konjugat/Conjugate / Konjugat / Conjugado
	Kalibrator A-F/Calibrator A-F / Kalibrator A-F / Calibrador A-F
	Lav kontroll/Control Low / Kontrolle Niedrig / Control Bajo
	Høy kontroll/Control High / Kontrolle Hoch / Control Alto
	Prøvefortynningsbuffer 5 x konsentrert/Sample diluent buffer 5x concentrated / Probenverdünnungspuffer 5x konzentriert /
	TMB substratløsning/TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Solución substrato TMB
	Stop solution / Stopplösung / Solución de parada
	Feces ekstraksjonsbuffer 2.5 x konstetert/Faecal Extraction Buffer 2,5x concentrated / Stuhlextraktionspuffer 2,5x konzentriert /
	Inneholder nok for n antgall tester/Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenido suficiente para "n" tests

version 05, 11.04.2023

**Manufactured by:  
for CALPRO AS**

CALPRO AS

Arnstein Arnebergs vei 30

N-1366 Lysaker, Norway

Tel: +47 4004279

[mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)**Produced within the EU**[www.calpro.no](http://www.calpro.no)