

## 1 BRUKSOMRÅDE

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** er en kvantitativ metode for bestemmelse av Kalprotectin i avføringsprøver og kan dermed brukes som et hjelpemiddel til identifisering, av pasienter med organisk sykdom i mage-tarmsystemet, følge sykdomsaktivitet og til monitorering av behandling hos relevante pasienter, særlig med de kroniske tarmsykdommene Crohn's sykdom og ulcerøs kolitt.

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** er validert for avføringsprøver

Testen er kun ment å brukes til *in vitro* diagnostikk.

## 2 BAKGRUNN

Ulike typer organiske sykdommer i gastrointestinalkanalen kan forårsake skade på tarmslimhinnen. Slik skade kan variere fra økt permeabilitet i slimhinnen til betennelse og sårdannelse. Tarmen inneholder rikelige mengder bakterier og mikroorganismer som frigjør substanser som kan være toksiske eller kjemotaktiske, dvs. at de stimulerer leukocytter, særlig nøytrofile granulocytter (PMN-celler), til å migrere inn i tarmlumen hvor de frigjør sitt innhold, inkludert antimikrobielle substanser som Kalprotectin. Dette proteinet utgjør omtrent 60% av totalprotein i granulocyttenes cytoplasma <sup>2)</sup>, og det er så stabilt at det kan måles i avføringsprøver lagret opptil syv dager ved romtemperatur <sup>3)</sup>.

Kalprotectin er et 36 kilodalton stort kalsium- og sink-bindende protein <sup>4)</sup>, produsert av PMN-celler, monocytter og plateepitelceller utenom de i normal hud <sup>5,6)</sup>. Etter binding til kalsium blir Kalprotectin resistent mot nedbryting av proteaser fra leukocytter og mikrober <sup>3,7)</sup>. Ved å konkurrere med ulike enzymer om begrensede mengder sink, hemmer Kalprotectin mange sink-avhengige enzymer <sup>8)</sup> og dreper dermed mikroorganismer <sup>9,10)</sup>. Ulike typer sykdommer, f.eks. bakterieinfeksjoner, revmatoid artritt eller kreft, fører til aktivisering av PMN-celler og økte nivåer av Kalprotectin i plasma, spinalvæske, leddvæske, urin og andre kroppsvæsker <sup>1)</sup>.

Det er av spesiell betydning at Kalprotectin-konsentrasjonen i avføring korrelerer med antall PMN-celler som migrerer til tarmhulen <sup>11)</sup> og at proteinet kan detekteres pålitelig selv i små mengder avføringsprøve (< 1 g)<sup>3,12)</sup>. Organiske sykdommer i tarmen gir en sterk Kalprotectin-nivået. Økningen er ofte mellom fem og flere tusen ganger høyere enn øvre referansegrense hos friske individer <sup>3,13,14,15)</sup>.

Inflammatorisk tarmsykdom (IBD), dvs. Ulcerøs Colitt og Crohn's sykdom, kan oppstå fra tidlig barndom til sen voksen alder og diagnosen er ofte forsinket grunnet vage symptomer eller motstand mot å gjennomgå endoskopi og biopsi. **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** kan bidra til en tidligere diagnose av IBD, da testen med stor sannsynlighet vil være positiv ved aktiv IBD.

Funksjonelle lidelser som irritabelt tarm-syndrom (IBS) gir ikke økt konsentrasjon av Kalprotectin i avføring i motsetning til organisk sykdom. Pasienter med organiske og funksjonelle lidelser kan ha lignende symptomer, og klinisk undersøkelse alene er ofte ikke tilstrekkelig for å kunne gi en spesifikk diagnose. Videre diagnostiske prosedyrer er kompliserte, dyre og kan utsette pasienten for smerte og andre risikoer. En måling av Kalprotectin i avføring er en enkel, ikke-invasiv, rimelig og objektiv metode som kan bidra til å velge ut pasienter for videre undersøkelser som endoskopi. Magesymptomer er veldig vanlig i både barn og voksne og et negativt resultat målt med **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** kan med høy sannsynlighet utelukke inflammatoriske tarmsykdommer <sup>13)</sup>.

Tilheling av tarmslimhinnen er det optimale målet ved behandling av IBD, og fekal Kalprotectin kan fortelle når dette er oppnådd. Mange IBD-pasienter i klinisk remisjon, med normale nivåer av C-reactive protein (CRP) har fortsatt pågående betennelse <sup>16)</sup>, reflektert ved økt fekal Kalprotectin. Slike pasienter har økt sjanse for tilbakefall innen få måneder <sup>17)</sup>. Hvis man kan

oppnå tilheling av slimhinnene, reduseres risikoen for tilbakefall og behov for kirurgiske inngrep <sup>18,19</sup>). Normalisering av Kalprotektin-nivået betyr at tilheling av slimhinnene er oppnådd <sup>20</sup>). I noen tilfeller er det vanskelig å oppnå full remisjon, og da må bivirkninger og ubehag ved behandling balanseres mot risikoen ved fortsatt betennelse, alvorlig kliniske tilbakefall og komplikasjoner.

Viktigheten av å oppnå slimhinnenetilheling er dokumentert i mange vitenskapelige oversiktsartikler <sup>21-29</sup>) og artikler <sup>30-35</sup>).

### 3 TESTPRINSIPP

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** er basert på tillaging av et fekal-ekstrakt laget ved hjelp av vår patenterte ekstraksjonsbuffer. Kalprotektin-nivået i ekstraktet bestemmes i et enzym-linket immunassay (ELISA) spesifikt for Kalprotektin.

I ELISA-testen inkuberes prøver og standarder i separate microtiter-brønner som er coatet med monoklonale antistoffer som binder til Kalprotektin. Etter inkubering og vasking av brønnene lar man bundet Kalprotektin reagere med enzym-merkede, affinitetsrensede og Kalprotektin-spesifikke antistoffer. Etter denne reaksjonen er mengden enzym bundet til microtiter-brønnen proporsjonal med mengden Kalprotektin i prøver og standarder, og bestemmes ved å inkubere med et substrat for enzymet som gir et farget produkt. Fargeintensiteten bestemmes ved å måle absorbansen ved hjelp av en ELISA-plateleser og er proporsjonal med konsentrasjonen av Kalprotektin i prøver og standarder. Testen kalibreres ved hjelp av Kalprotektin renset fra leukocyt-ekstrakt.

### 4 MATERIALER

#### 4.1. Reagenser i kitet

- **MTP Coatet microtiterplate:** 12 striper, 8 brønner per stripe, coatet med affinitetsrenset, monoklonalt muse-antistoff spesifikt for Kalprotektin. Platen lagres i en forseglet pose med et tørkemiddel.
- **DIL 5x Prøvefortynningsbuffer (5x kons.) \*\*\*:** 1 x 20 mL, 5x konsentrert, fortynnes med destillert/deionisert vann; pH 8.0 ± 0.2, guldfarget løsning, flaske med blå kork.
- **WASH|BUF 20x Vaskeløsning (20x kons.) \*:** 1 x 50 mL, 20x konsentrert, fortynnes med destillert/deionisert vann, til vasking av mikrotiter-brønner; pH 7.8 ± 0.2, blank løsning, flaske med hvit kork.
- **FEC|EXTR|BUF 2.5x Fekal Ekstraksjonsbuffer (2.5x kons.) \*\*:** 2 x 90 mL, 2.5x konsentrert, fortynnes med destillert/deionisert vann; pH 8.0 ± 0.2, blank løsning, flasker med hvite korker.
- **CAL|A - F Kalprotektin-standarder \*\*\*:** 6 rør á 1.0 mL, klar til bruk; guldfarget løsning, rør med forskjellige farger på korkene:
 

Standard A: Blå kork	0	ng/mL
Standard B: Grønn kork	7.8	ng/mL
Standard C: Gul kork	31.3	ng/mL
Standard D: Rød kork	62.5	ng/mL
Standard E: Hvit kork	125	ng/mL
Standard F: Sort kork	500	ng/mL
- **CTR|LOW|CTR|HIGH Kalprotektin-kontroller "Low" og "High" \*\*\*:** 2 rør á 1.0 mL, klar til bruk; guldfarget løsning, "Low" rør med brun kork, "High" – rør med lilla kork.

- **CONJ Enzym-konjugat \*\*\*\*:** 13 mL alkaline phosphatase-merket, immunaffinitets-rensede polyklonale kaninantistoffer mot Kalprotektin, klar til bruk; rødfarget løsning, 25 mL Dynex rør med hvit kork.
  - **SUB pNPP Enzym-substratløsning (pNPP):** 13 mL, klar til bruk; blank til svakt gul farget løsning, svart flaske med gul kork. NB! Ved bruk av Dynex DS2 automat, må substratet overføres til et 25 mL Dynex-rør før start.
  - 2 plate-forseglingsfolier
  - 1 pakningsvedlegg. (pakningsvedlegget kan også hentes på vår hjemmeside: [www.calpro.no](http://www.calpro.no))
  - 1 ark med plateoppsett
- \* Inneholder <0.1 % Kathon
- \*\* Inneholder <0.1% natrium azide
- \*\*\* Inneholder <0.1 % Kathon og <0.1% natrium azide
- \*\*\*\* Inneholder 0.02% methylisothiazolone og 0.02% bromonitrodioxane

## 4.2 Nødvendige materialer som ikke er inkludert i kitet

- Destillert vann
- Ekstraksjonsrør beskrevet i avsnitt 7.1.1 og 7.1.2.
- Éngangs podeøse (ved bruk av veiemetoden beskrevet i avsnitt 7.1.3)
- Sensitiv digital vekt (40 – 150 mg; ved bruk av veiemetoden beskrevet i avsnitt 7.1.3)
- Éngangs polystyren-rør med skrukork, 5 mL (ved bruk av veiemetoden beskrevet i avsnitt 7.1.3)
- Vortex mixer
- Éngangsrør til fortykning av prøver (Eppendorf-rør eller lignende (hvis testen blir utført manuelt))
- Pipetter, 10 – 1000 µL (hvis testen blir utført manuelt)
- Repetitiv pipette eller multikanal-pipette, 100 µL. (hvis testen blir utført manuelt)
- Mikroplate-vasker eller multikanal-pipette, 300 µL (hvis testen blir utført manuelt)
- Platerister (500 – 700 rpm). (hvis testen blir utført manuelt)
- Timer (hvis testen blir utført manuelt)
- ELISA-leser med 405 nm filter (hvis testen blir utført manuelt)
- 1M NaOH (stoppløsning; valgfritt)

## 5 STABILITET OG LAGRING

Kit lagret ved 2-8 °C er holdbare fram til påtrykt holdbarhetsdato.

Plate, reagenser og konsentrerte løsninger er holdbar i originalemballasjen etter åpning i 3 måneder lagret ved 2-8 °C.

Bruksløsninger (1x) av Vaskeløsning, Prøvefortynningsbuffer og Fekal Ekstraksjonsbuffer er holdbare i 1 måned under forutsetning av at de er tillaget i rene flasker og lagres ved 2-8 °C når de ikke er i bruk. Unngå eksponering til høy temperatur.

## 6 TILLAGING AV REAGENSER

Alle reagenser, prøver og kontroller bør ekvilibrerers til romtemperatur (18 – 25°C) før testen starter.

### 6.1. Coatede mikrotiterplate-striper

Plate-stripene er klar til bruk og er coatet med affinitetsrensede, monoklonale muse-antistoffer spesifikke for Kalprotektin. Ubrukte striper fjernes fra rammen og bør umiddelbart forsegles i aluminium-posede sammen med tørkemiddelet. Lagres ved 2 – 8°C.

## 6.2. Prøvefortynningsbuffer

Fortynn den 5x konsentrerte Prøvefortynningsbufferen ved å tilsette én del (20 mL) til fire deler (80 mL) destillert/deionisert vann i en ren beholder, slik at totalt volum blir 100 mL. Bland godt. Lagre den fortynnete bufferen i en lukket beholder ved 2 – 8°C.

NB! Ved bruk av Dynex DS2 ELISA automat, må prøvefortynningsbufferen overføres til et 25 mL Dynex rør før kjøring av testen.

## 6.3. Vaskeløsning

Fortynn den 20x konsentrerte Vaskeløsningen ved å tilsette én del (50 mL) til 19 deler (950 mL) destillert/deionisert vann i en ren beholder, slik at totalt volum blir 1000 mL. Bland godt. Lagre den fortynnete Vaskeløsningen i en lukket beholder ved 2 – 8°C.

## 6.4. Fekal Ekstraksjonsbuffer

Fortynn den 2.5x konsentrerte Ekstraksjonsbufferen ved å tilsette én del (90 mL) til 1.5 deler (135 mL) destillert/deionisert vann i en ren beholder, slik at totalt volum blir 225 mL. Bland godt. Lagre den fortynnete Ekstraksjonsbufferen i lukket beholder ved 2 – 8°C.

## 6.5. Standarder og kontroller

Rørene merket med Standard A – F, og kontrollene, inneholder 1.0 mL hver av løsninger som er klare til bruk. Konsentrasjonen av Kalprotektin er skrevet på merkelappene på hvert rør.

Rørene passer direkte inn i Dynex DS2 ELISA automat.

## 6.6. Enzym-konjugat

Røret inneholder 13 mL alkaline fosfatase (ALP)-merkede, immunaffinitets-rensede kanin-antistoffer spesifikke for Kalprotektin. Bufferen inneholder stabiliserende stoffer, konserveringsmidler og et rødt fargestoff. Løsningen er klar til bruk. Røret passer til Dynex DS2 ELISA automater.

## 6.7. Enzymsubstrat-løsning (pNPP)

Flasken inneholder 13 mL *p*-nitrophenylphosphate (pNPP)-løsning, klar til bruk. Substratet må lagres i den originale, svarte flasken.

NB! Ved bruk av Dynex DS2 ELISA automat, må enzymsubstrat-løsningen overføres til et 25 mL Dynex reagensrør før kjøring av testen.

# 7 PRØVESAMLING OG -OPPARBEIDELSE

## 7.1. Avføringsprøver

Siden Kalprotektin er veldig stabilt i avføringsprøver, kan pasienter selv ta prøver hjemme. Ta ut 1 – 5 g (ca. én teskje) avføring over i en egnet, ren beholder og lever til laboratoriet så raskt som mulig, og innen fire dager. I en godkjent transportbeholder kan prøven sendes med vanlig post, og ingen kjøling er nødvendig. Prøvene bør dog ikke utsettes for temperaturer over 30°C.

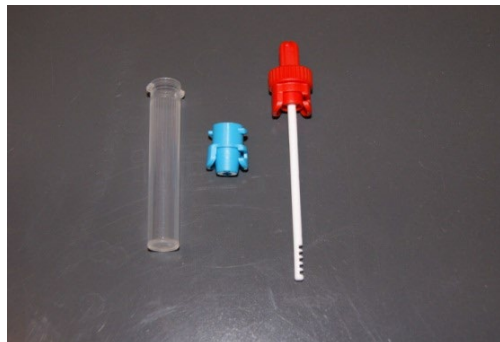
Prøver kan også lagres frosne, under -20°C, frem til den leveres eller sendes med post. Frosne prøver må tines og ekvilibrerer til romtemperatur før ekstraksjon og testing.

NB: Før ekstraksjon bør avføringsprøven blandes godt ved hjelp av f.eks. en spatel, før en liten mengde tas ut.

Til ekstraksjon av avføringsprøver anbefaler vi Calpro Easy Extract® eller den beskrevne veiemetoden (kap. 7.1.2). Utfør ekstraksjonen i henhold til pakningsvedlegget for den valgte metoden.

### **7.1.1. Ekstraksjon ved hjelp av Calpro Easy Extract®**

Bruksanvisning: Les pakningsvedlegget for produkt nummer CAL0510/CAL0510L (Calpro AS)



Calpro AS, Product No, CAL0510

### **7.1.2 Ekstraksjon ved hjelp av veiemetoden (uten ekstraksjonsrør)**

1. Vei (nullstill) et tomt rør med skrukork og en podeøse.
2. Ta ut ca. 100 mg (mellom 40 og 120 mg) avføring ved hjelp av podeøse og legg i røret. Unngå faste, ufordøyde partikler som fibre og frø.
3. Vei røret med kork, podeøse og avføringsprøve. Vekten vil være netto mengde prøve.
4. Brekk eller klipp av ca. halvparten av håndtaket på podeøse og la resten være oppi røret.
5. Tilsett fortynnet Ekstraksjonsbuffer slik at forholdet blir 1:50 (vekt:volum), f.eks. 4.9 mL buffer til 100 mg prøve. Skru på korken.
6. Vortex røret i 30 sekunder.
7. Fortsett ekstraksjonen på en rister (ca. 1000 rpm) i 30±5 minutter. Podeøsen inni røret hjelper til med å løse opp prøven.
8. Ekstraktet, som er en 1:50 fortynning (vekt:volum) av den opprinnelige avføringsprøven, er nå klar til fortynning og analyse.
9. For lagring, overfør ca. 0.5 mL til et nytt, rent rør. Ekstrakter kan lagres ved 2 – 8°C i minst fem dager eller fryses under -20°C i opptil to år <sup>48</sup>).

## 7.2 Anbefalt plateoppsett

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

Forslag til ELISA plateoversikt for standarder, kontroller og prøver ved bruk av manuell prosedyre. Duplikate brønner anbefales for økt pålitelighet av resultatene. En full plate tar da 40 prøver.

## 7.3 ELISA-Prosedyre

Den følgende prosedyren er for manuell testing. Validerte protokoller for Dynex DS2 ELISA automater er tilgjengelige ved forespørsel. NB! Alle rørene til standarder, positive kontroller og konjugatet passer direkte inn i DS2 ELISA-automater.

### Notater til prosedyren

- Forberedelser: Les hele testprosedyren nøye *før* testen utføres. Påliteligheten til resultatene er avhengig av at testen utføres som beskrevet. Før man starter testen bør en plateoversikt med posisjonene til standarder, kontroller og prøver lages, f.eks. ved hjelp av skjemaet som er vedlagt i kitet. Velg antall platestriper. Ubrukte platestriper bør forsegles i aluminiumsposen som beskrevet i kapittel 6.1.
- En 1:100-fortynning av faeces-ekstrakter anbefales. Denne fortynningen vil gi prøveverdier mellom 25 mg/kg (LoQ) og 2500 mg/kg i avføringsprøvene. Ekstrakter med høyere verdier kan fortynnes mer (> 1:100) og testes på ny dersom en verdi er ønsket. Ekstrakter med lave verdier kan fortynnes mindre (1:50) og testes på ny dersom en verdi er ønsket. En endring i fortynningsfaktor må tas med i beregningen når man konverterer mellom ng/mL og mg/kg (se kapittel 11 under).
  - Utfør all trinnene i prosedyren i den rekkefølgen som er angitt, uten unødige pauser mellom trinnene.
  - En ren, engangs pipettespiss må brukes for dispensering av hver standard, kontroll og prøve.
  - For å oppnå mest pålitelige resultater bør standarder, kontroller og prøver analyseres i duplikat.

- Alle prøver og kit-reagenser bør ekvilibrerer til romtemperatur (18 – 25°C) før bruk.

#### ELISA-prosedyre

1. Fortynn fekal-ekstraktene 1:100 i Prøvefortynningsbuffer (f.eks. 10 µL ekstrakt + 990 µL buffer) og bland godt ved hjelp av vortexing.
2. Tilsett 100 µL av hver standard, kontroll og fortynnet prøve til duplikate brønner; se anbefalt plateoversikt i Kapittel 8.
3. Dekk platen med forseglingsfolie og inkuber ved romtemperatur i 40±5 min. på en horisontal platerister (ca. 500 – 700 rpm).
4. Etter endt inkubasjon, fjern væsken i brønnene og vask brønnene ved å tilsette 300 µL Vaskeløsning til hver brønn. Fjern så mye væske som mulig og gjenta til brønnene er vasket totalt tre ganger. Dersom en platevasker brukes, må det sjekkes at ingen av aspirerings- eller dispenseringsprobene er tette. Etter den siste vasken snus platen og bankes tørr mot absorberende papir.
5. Vend Enzym-konjugatflasken et par ganger før bruk (ikke rist). Tilsett 100 µL konjugat til hver brønn. Det anbefales å bruke en stepper- eller multikanal-pipette.
6. Dekk platen med forseglingsfolie og inkuber ved romtemperatur i 40±5 min. på en horisontal platerister (ca. 500 – 700 rpm).
7. Gjenta vasketrinnene som beskrevet over, tre ganger med 300 µL Vaskeløsning per brønn.
8. Tilsett 100 µL Enzymsubstrat-løsning til hver brønn. Det anbefales å bruke en stepper- eller multikanal-pipette.
9. Inkuber platen ved romtemperatur (uten risting) i 20 – 30 minutter, beskyttet mot lys.
10. *Valgfritt:* Tilsett 100 µL 1M NaOH stoppløsning til hver brønn dersom en bestemt inkubasjonstid er ønsket.
11. Rist platen i 2-3 sekunder og les av absorbansen (OD) ved 405 nm ved hjelp av en ELISA-leser.

## 8 KVALITETSKONTROLL

- En ny standardkurve må inkluderes i hver kjøring.
- De positive kontrollene bør være med i hver kjøring. Avlest verdi skal være innenfor akseptansegrenser oppgitt på etiketten påsatt hver flaske.
- OD-verdi for Standard F (500 ng/mL) bør være  $\geq 1.6$  og OD-verdi for standard A (0 ng/mL)  $\leq 0.25$ . En representativ standardkurve er vist i figur 1.

## 9 EVALUERING

Beregning av Kalprotektin- konsentrasjon i avføringsprøver fra pasienter:

1. Beregn gjennomsnittlig OD-verdi basert på duplikatmålingene av hver standard, positiv kontroll og prøve.
2. Plott Kalprotektin-konsentrasjonen for hver standard (ng/mL) på x-aksen mot gjennomsnittlig OD på y-aksen for å lage en standardkurve. En 4-parameter-kurvetilpasningsfunksjon anbefales å bruke (se figur 1). Hvis en logaritmisk x-akse er ønskelig, kan verdien for standard A settes til 0.01 ng/mL istedenfor 0 ng/mL.
3. Bruk standardkurven for å bestemme Kalprotektin-konsentrasjonen i hver enkelt prøve og positiv kontroll basert på gjennomsnittlig OD-verdi for hver av dem.
4. **Multipliser beregnet Kalprotektin-konsentrasjon (ng/mL) med 5 for å konvertere resultatene til mg/kg i opprinnelige avføringsprøver.**

En konverteringsfaktor på 5 fra ng/ml til mg/kg relateres til 1:50 fortynning av avføringsprøve ved ekstraksjon og etterfølgende 1:100 fortynning av ekstrakt.

*Eksempel: Hvis et 1:100 fortynnet ekstrakt gir 100 ng/mL, er konsentrasjonen i den opprinnelige avføringsprøven  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*



Obs: Hvis ekstraktet ble fortynnet mer eller mindre enn den anbefalte 1:100-fortynningen må dette korrigeres for ved omregning fra ng/ml til mg/kg.

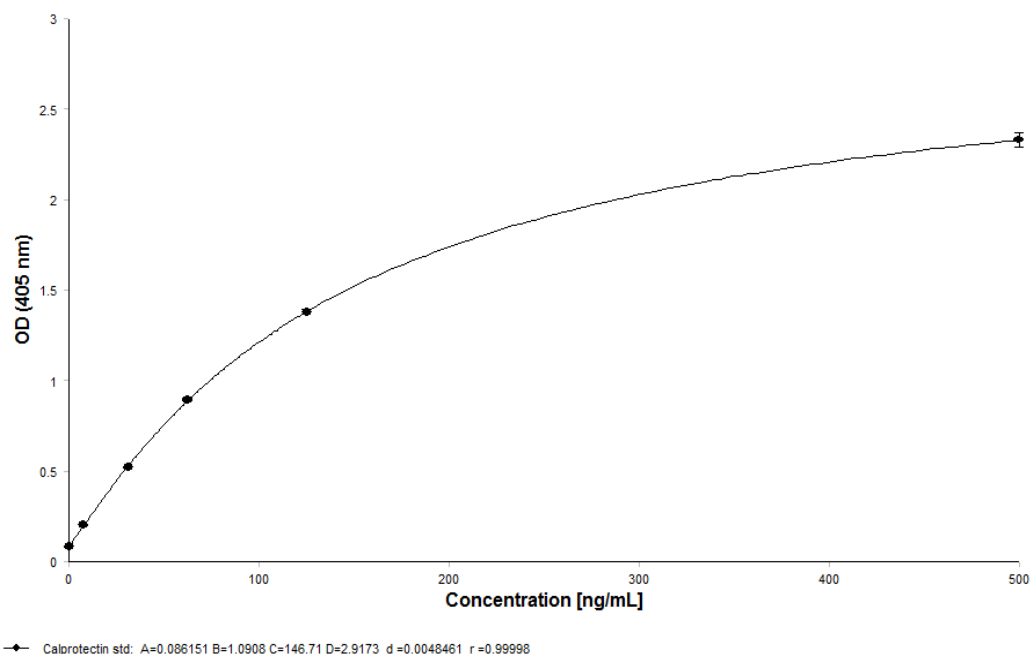


Figure 1: En representativ standard kurve med 4-parameter kurvetilpasning.

## 10 TOLKNING AV RESULTATER

Følgende kalprotektinverdier i avføringsprøver for klinisk vurdering er rapportert i publisert litteratur<sup>3, 36, 37</sup>:

<b>Normalverdier</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Positive verdi</b>	> 50 mg/kg
<b>gråsoner*</b>	50-100 mg/kg
<b>Aktiv, symptomatisk inflammatorisk tarmsykdom</b>	200 – 40,000 mg/kg

\*) Pasienter med resultater innenfor gråsonen anbefales å gjenta testen for å bedre diagnostisk nøyaktighet.

Merk at en diagnose ikke bør etableres basert på et enkelt testresultat. Diagnosen bør ta hensyn til klinisk historie og symptomer.

I samsvar med vitenskapelig litteratur og publiserte kliniske studier<sup>36, 37</sup> kan følgende kliniske ytelse for påvisning av inflammatorisk tarmsykdom versus funksjonell sykdom forventes:

Cut-off	Sensitivitet (95% CI)	Spesifisitet (95 % CI)	Positiv prediktiv verdi	Negative prediktiv verdi
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 SPESIFIKASJONER OG YTELSE

**Merk:** Alle verifikasjonsstudier ble utført ved manuell testing på avføringsekstraktprøver (fortynnet 1:100)

**Presisjon:** Intra- og interpresisjonsstudiene ble utført med samme prøvene på to forskjellige Calprolab kit lot-er.

Intra-assay (repeterbarhet) presisjon, fekale ekstrakter (n=20)

Konsentrasjon i feces (mg/kg)	%CV
29.9	7.3
166.9	4.4
349.2	4.4
530.9	3.8
1033.0	7.7
1634.3	9.8

Inter-assay (total) presisjon, fekale ekstrakter (n=80)

Konsentrasjon i feces (mg/kg)	%CV
33.0	14.6
175.1	7.1
375.6	10.1
583.0	6.0
1138.5	14.0
1795.7	9.6

### Samsvar mellom de angitte ekstraksjonsmetodene; veiemetode versus EasyExtract\*

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

\*) Ytterligere detaljer og ytelsesdata vedrørende fekalekstraksjon finnes i pakningsvedlegget for EasyExtract (prod. nr. CAL0510).

### Recovery:

Feces: 85 – 105%; testet med fekalekstrakter tilsatt renset Kalprotektin på fem forskjellige nivåer.

### Kvantifiserings-, deteksjons- og bakgrunngrense:

- Bakgrunngrense (LoB): 0.54 mg/kg
- Deteksjonsgrense (LoD): 4.36 mg/kg
- Kvantifiseringsgrense (LoQ): 22.15 mg/kg

Grensen for kvantifisering, deteksjon og blank/bakgrunn ble utført i henhold til CLSI-retningslinjen EP17A-Ed2

### Samsvar mellom:

#### a) Phical Test (Eurospital)

Phical Test versus CALP0170: Det ble funnet akseptabel korrelasjon og samsvar mellom prøvene analysert i begge analysene:

- Intercept: -1.8, (95%CI: -6,6—4.6), slope: 0.94 (95% CI: 0.84-1.03), R = 0.92

#### b) Calpro Calprotectin ELISA (prod. no. CAL0100)

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) versus CALP0170: Det ble funnet akseptabel korrelasjon og samsvar mellom prøvene analysert i begge analysene:

- Intercept: 4.3 (95%CI: -0.84 – 14.3), slope: 0.89 (95% CI: 0.85-0.93), R = 0.93

### Interference

Ingen observert interferens på ELISA ble observert fra vanlig brukte legemidler, se listen nedenfor:

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

I tillegg ble S100A12 testet for mulig kryssreaktivitet og ingen reaktivitet ble observert.

**Måleområde:** 22.2-2500 mg/kg

**Matrix Linearitet:** Lineært område: **36 to 1755 mg/kg.**

Matrix linearitetsstudien ble utført i henhold til CLSI retningslinjer EP06-Ed2.

## 12 BEGRENSNINGER

- En diagnose bør ikke stilles bare på grunnlag av en enkel analyse, men ta i betraktning både klinisk historie og symptomer.

## 13 ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Dette produktet er utviklet og produsert i samsvar med artikkel 1 paragraf 2b Europeiske direktiv 98/79/EC for å sikre egnethet, ytelse og sikkerhet ved tiltenkt bruk. Det er derfor viktig at testprosedyre, begrensninger, advarsler og forholdsregler gitt av produsenten leses og følges nøye. Bruk av produktet med analyseinstrumenter som ikke er beskrevet i pakningsvedlegget må valideres av bruker om ikke annet er oppgitt eller informert av produsent. Alle endringer i design, sammensetning, testprosedyre eller bruk i kombinasjon med andre produkter ikke godkjent eller anbefalt av produsenten gjøres helt og holdent på brukers eget ansvar. Produsenten kan ikke holdes ansvarlig for uriktige resultater eller følger av disse ved slik bruk. Produsenten er ikke ansvarlig for resultater framkommet ved visuell analyse av testrespons.
- Skal kun brukes til *in vitro*-diagnostikk..
- Alle komponenter av human opprinnelse benyttet i produksjon av dette produktet er testet og funnet negativ for anti-HIV antistoffer, anti-HVC antistoffer og Hepatitt B antigen. Alle reagenser i produktet bør likevel behandles med forsiktighet og som potensielt smittefarlige.
- Reagenser eller platestriper fra ulike kit-loter skal ikke blandes.
- Reagenser fra andre produsenter eller produkter skal ikke benyttes i produktet.
- Bruk ikke reagenser etter utløpsdato. Bruksløsninger laget fra de konsentrerte løsningene skal ikke brukes mer en én måned etter tillaging.
- Bruk bare rene pipettespisser, dispensere og labutstyr.

- For å unngå krysskontaminering må ikke skrukorker fra de ulike kitflaskene og rørene byttes om.
- Skru korken på flasker og rør godt igjen etter bruk for å forhindre fordampning og mikrobiell kontaminasjon.
- Etter åpning av kit og etterfølgende lagring, sjekk konjugat, standarder og positive kontroller for mulig mikrobiell kontaminasjon før videre bruk.
- For å unngå krysskontaminasjon og falskt forhøyede resultater, pipetter standarder, kontroller, prøver, konjugat og substrat nøyaktig til bunnen av de enkelte platebrønnene. Unngå spruting.
- Enkelte reagenser inneholder Natrium Azide (< 0.1 %) og Kathon (≤ 0.1 %).
- Substrat skal lagres i sin originale, lystette flaske. Løsningen skal være klar, fargeløs eller svakt gul. Bland forsiktig før bruk.
- **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** skal bare benyttes av kvalifisert laboratoriepersonell

## 14 HÅNDTERING AV AVFALL

Rester av reagenser og prøver er generelt å betrakte som potensielt farlig og smittefarlig avfall og må behandles etter nasjonale retningslinjer for slikt avfall.

## 15 REFERANSER

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. Björkesten 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. Lasson 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 Informasjonsbrev, juni 2012 ( tilgjengelig ved forespørsel: [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. Intern Design Verification Rapport: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027, 2014-04-09

## 16 BESTILLINGSINFORMASJON

Produktnummer: CALP0170

CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP) (96 brønner)

Symbolforklaring/ Symbols Key / Symbolschlüssel / Tabela de símbolos	
	Ansvarlig produsent/ Manufactured by
<b>IVD</b>	In Vitro Diagnostisk Medisinsk Utstyr/ In Vitro Diagnostic Medical Device
<b>LOT</b>	Lot nummer/ Lot Number
	Utløpsdato/ Expiration Date
	Oppbevaringstemperatur/ Storage Temperature
<b>CE</b>	CE merke/ CE Mark
<b>REF</b>	Katalognummer/ Catalogue Number
	pakningsvedlegg/ Instruction for use
<b>MTP</b>	Mikrotiterplate/ Microplate
<b>CONJ</b>	Konjugat/ Conjugate
<b>CAL</b>	Kalibrator A-F/ Calibrator A-F / Kalibrator A-F / Calibrador A-F
<b>CTR LOW</b>	Lav kontroll/ Control Low
<b>CTR HIGH</b>	Høy kontroll/ Control High
<b>DIL 5x</b>	Prøvefortynningsløsning/ Sample diluent buffer 5x concentrated
<b>SUB pNPP</b>	pNPP substratløsning/ pNPP Substrate solution
<b>FEC EXTR BUF 2,5x</b>	Fekal ekstraksjonsbuffer/ Faecal Extraction Buffer 2,5x concentrated
	Inneholder nok til "n" tester/ Contains sufficient for "n" tests

Versjon 05, 16.05.2023

**Ansvarlig produsent:**  
**CALPRO AS**

CALPRO AS

Arnstein Arnebergs vei 30

N-1366 Lysaker, Norway

Tel: +47 67 43 01 34

mail@calpro.no

www.calpro.no

**Produsert innen EU for**

Ved spørsmål, kontakt [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

## HURTIGVEILEDNING

### CalproLab™ ELISA (ALP) for analyse av Kalprotektin i avføringsprøver

**Ekstraksjon** Utfør ekstraksjonen i henhold til en av metodene beskrevet i seksjon 7.1.1-2

#### ELISA (manuell prosedyre)

- Fortynn ekstraktet 1:100 i Prøvefortynningsbuffer
- Tilsett 100 µL standarder, kontroller og prøver til ELISA-platen. Dekk platen til med vedlagt forseglingsfolie
- Inkuber på en platerister ved romtemperatur i 40±5 min (ca. 500 – 700 rpm).
- Vask brønnene tre ganger med 300 µL Vaskeløsning
- Tilsett 100 µL ALP enzyme-konjugat til hver brønn. Dekk platen til med vedlagt forseglingsfolie.
- Inkuber på en platerister ved romtemperatur i 40±5 min (ca. 500 – 700 rpm).
- Vask brønnene tre ganger med 300 µL Vaskeløsning
- Tilsett 100 µL pNPP Enzymsubstratløsning til hver brønn
- Inkuber beskyttet mot lys i 20 – 30 min
- Valgfritt:* tilsett 100 µL 1M NaOH til hver brønn
- Rist platen i 2-3 sekunder og les av OD-verdiene ved 405 nm ved hjelp av en ELISA-leser
- Bruk en 4-parameters kurvetilpasning og kalkuler resultatene (ng/mL)
- mg/kg i avføringsprøven = ng/mL × 5