

## 1 AVSEDD ANVÄNDNING

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** är en kvantitativ metod för bestämning av kalprotectin i avföringsprover och kan därmed användas som ett stöd vid identifiering av organisk sjukdom i tunntarm, tjocktarm och magäck hos patienter, bestämma sjukdomsaktiviteten och övervaka behandlingssvaret hos patienter med ulcerös kolit eller Crohn's sjukdom. **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** har validerats för avföringsprover.

Testet är avsett för *in vitro*-diagnostik.

## 2 BAKGRUND

Olika typer av organiska sjukdomar i magtarmkanalen kan skada tarmepitelet (slemhinnan). Sådana skador kan variera från ökad permeabilitet hos slemhinnan till inflammation och sårbildning. Tarm innehåller är rikt på bakterier och mikroorganismer som frisätter ämnen som kan vara toxiska eller kemotaktiska, dvs. som stimulerar leukocyter, särskilt polymorfonukleära neutrofila granulocyter (PMN), att migrera in i tarmlumen där de frisätter sitt innehåll, bland annat antimikrobiella ämnen som kalprotectin. Kalprotectin utgör ca 60 % av det totala proteininnehållet i PMN-cellernas cytoplasma<sup>2)</sup> och kan bestämmas med hög tillförlitlighet i avföringsprover som lagras i upp till sju dagar i rumstemperatur<sup>3)</sup>.

Kalprotectin är ett kalcium- och zinkbindande protein på 36 kilodalton<sup>4)</sup> som produceras av PMN-celler, monocyter och skivepitelceller (förutom av dem som finns i normal hud)<sup>5,6)</sup>. När kalprotectin har bundit kalcium kan det stå emot nedbrytning som katalyseras av leukocytenzymer och mikrobiella enzymer<sup>3,7)</sup>. Genom att konkurrera med olika enzymer om en begränsad lokal tillgång till zink kan kalprotectin hämma många zinkberoende enzymer<sup>8)</sup> och därmed döda mikroorganismer och humana celler i kultur<sup>9,10)</sup>. Olika typer av sjukdomar, till exempel bakterieinfektioner, reumatoid artrit och cancer, leder till aktivering av PMN-celler och förhöjda halter av kalprotectin i plasma, cerebrospinalvätska, synovialvätska, gingivalvätska, urin och andra material i kroppen<sup>1)</sup>.

En viktig egenskap hos kalprotectin är att koncentrationen i avföring är korrelerad till antalet PMN-celler som migrerar till tarmlumen<sup>11)</sup> och att kalprotectin är lätt att detektera även i små mängder (mindre än ett gram) slumpmässiga avföringsprover<sup>3,12)</sup>. Dessutom ger organiska magtarmsjukdomar en stark ökning av kalprotectin. Mängden av kalprotectin är ofta, fem till flera tusen gånger den övre referensgränsen hos friska personer<sup>3,13,14,15)</sup> vilket indikerar en inflammation i tarmen.

Inflammatorisk tarmsjukdom (IBD), dvs. ulcerös kolit och Crohn's sjukdom, kan debutera från tidig barndom till sen vuxenålder, och det tar ofta lång tid innan diagnosen ställs på grund av vaga symtom eller tveksamhet att låta göra endoskopi och biopsi. **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** kan bidra till en tidigare IBD diagnos eftersom testet normalt är positivt vid aktiv IBD.

Funktionella sjukdomar som irritable tarm (IBS) leder inte till en förhöjning av kalprotectin i tarmen medan organiska magtarmsjukdomar som IBD gör det. Patienter med organiska och funktionella magtarmsjukdomar kan ha likartade symtom, och klinisk undersökning enbart kanske inte räcker för en exakt diagnos. Dessutom är diagnosprocedurerna komplexa, dyra och kan utsätta patienten för smärta och andra risker. Ett test för att mäta fekalt kalprotectin är en enkel, icke-invasiv, billig och objektiv metod som kan göra det lättare att selektera patienter för ytterligare undersökningar, till exempel endoskopi. Buksymtom är mycket vanliga både hos vuxna och barn, och ett negativt resultat enligt **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** kan med hög sannolikhet utesluta inflammatoriska tarmsjukdomar<sup>13)</sup>.

Det optimala målet med IBD-behandling är att slemhinnan läker, och ett test för att mäta fekalt kalprotectin kan visa om detta har uppnåtts. Många IBD-patienter i klinisk remission med normala halter av C-reaktivt protein (CRP) har fortfarande en pågående inflammation<sup>16)</sup> som återspeglas i förhöjda halter av fekalt kalprotectin. Dessa patienter löper ökad risk för återfall inom några månader<sup>17)</sup>. Om läkning av slemhinnan kan uppnås minskar risken för återfall, liksom behovet av större bukkirurgi<sup>18,19)</sup>. En normalisering av kalprotectin-nivåerna innebär att slemhinnan har läkt<sup>20)</sup>. Risken för biverkningar och

dess svårighetsgrad bör vägas mot riskerna för fortsatt inflammation, svårt kliniskt återfall och komplikationer.

Vikten att uppnå slemhinne-läkning har varit föremål för många vetenskapliga litteraturoversikter<sup>21-29</sup>) och artiklar<sup>30-35</sup>).

### 3. PRINCIPEN FÖR TESTET

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** bygger på beredning av ett extrakt av fekalier genom användning av vår patentskyddade extraktionsbuffert för fekalier. Halten av Kalprotectin bestäms genom att extraktet testas med en enzymkopplad immunanalys (ELISA) specifik för kalprotectin.

Vid ELISA-analysen inkuberas prover och standarder i separata mikrotiterplattor vars brunnar är belagda med monoklonala antikroppar som binder till kalprotectin. Efter inkubering och tvättning av brunnarna får bundet kalprotectin reagera med enzymmärkta immunaffinitetsrenade antikroppar specifika för kalprotectin. Efter denna reaktion är mängden bundet enzym i mikrotiterbrunnarna proportionell mot mängden kalprotectin i provet eller standarden. Mängden bestäms genom inkubation med ett substrat för enzymet som ger en färgad reaktionsprodukt. Färgintensiteten bestäms genom absorbans-mätning med användning av en ELISA-plattläsare och är proportionell mot koncentrationen av kalprotectin i standarder och prover. Analysen kalibreras med kalprotectin som renats fram från leukocytextrakt.

### 4. MATERIAL

#### 4.1. Reagens som medföljer satsen

- **MTP** **Belagd mikrotiterplatta:** 12 remsor, 8 brunnar per remsa, belagda med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar specifika för kalprotectin. Plattan förvaras i en förseglad påse med torkmedel.
- **DIL** **5x** **Provspädningsbuffert (5x konc.)** \*\*\*: 1 x 20 ml, 5x koncentrat som ska spädas med destillerat/avjonat vatten, pH 8,0 ± 0,2, guldfärgad vätska, flaska med blå kork.
- **WASH** **BUF** **20x** **Tvätt-lösning (20x konc.)** \*: 1 x 50 ml, 20x koncentrat som spädas med destillerat/avjonat vatten för tvätt av mikrotiterbrunnarna. pH 7.8 ± 0,2, klar lösning, flaska med vit kork.
- **FEC** **EXTR** **BUF** **2,5x** **Extraktionsbuffert för fekalier (2,5x konc.)** \*\*: 2 x 90 ml, 2,5x koncentrat som ska spädas med destillerat/avjonat vatten, pH 8,0 ± 0,2, klar lösning, flaskor med vita korkar.
- **CAL** **A - F** **Kalprotectin-standarder**\*\*\*: 6 flaskor med 1,0 ml, färdig att användas, guldfärgad lösning, flaskor med korkar med olika färger:

Standard A: Blå kork	0	ng/ml
Standard B: Grön kork	7,8	ng/ml
Standard C: Gul kork	31,3	ng/ml
Standard D: Röd kork	62,5	ng/ml
Standard E: Vit kork	125	ng/ml
Standard F: Svart kork	500	ng/ml
- **CTR** **LOW** **CTR** **HIGH** **Kalprotectin-kontroller "Låg" och "Hög"**\*\*\*: 2 flaskor med 1,0 ml, färdig att användas, guldfärgad lösning, Ctr Low, flaska med brun kork, Ctr High, flaska med lila kork.
- **CONJ** **Enzymkonjugat**\*\*\*\*: 13 ml alkaliskt fosfatasmärkt, immunaffinitetsrenade polyklonala kaninantikroppar mot kalprotectin, färdig att användas, rödfärgad lösning, 25 ml Dynex reagensrör med vit kork.
- **SUB** **pNPP** **Enzymsubstratlösning (pNPP):** 13 ml, färdig att användas, klar till svagt gul lösning, ogenomskinlig flaska med gul kork.  
*Obs:* Om ett Dynex-instrument används måste substratet överföras till ett 25 ml Dynex reagensrör innan testet körs.
- 2 förseglingsfilmer

- 1 testprotokoll (Bruksanvisning kan hittas och laddas ner på [www.calpro.no](http://www.calpro.no))
- 1 plattlayout
- 
- \* Innehåller 0,1 % Kathon
- \*\* Innehåller < 0,1 % natriumazid
- \*\*\* Innehåller 0,1 % Kathon och < 0,1 % natriumazid
- \*\*\*\* Innehåller 0,02 % metylisotiazolon och 0,02 % bromnitrodioxan

## 4.2. Material som behövs men inte medföljer

- Destillerat/avjonat vatten
- Extraktionsrör (se avsnitt 7.1.1 och 7.1.2)
- Brytbara inokuleringsöglor för engångsbruk (vid användning av vägning-metoden i avsnitt 7.1.3)
- Känslig digital våg (40–150 mg) (vid användning av viktningsmetoden i avsnitt 7.1.3)
- Polystyrenrör för engångsbruk med skruvlock, 5 ml (vid användning av vägningsmetoden i avsnitt 7.1.3)
- Vortex-blandare
- Engångsrör för spädning av prover: Eppendorfrör eller motsvarande (om analysen görs manuellt)
- Pipetter för volymer på 10–1000 µl (om analysen görs manuellt)
- Repetitiv pipett eller multikanal-pipett, 100 µl (om analysen görs manuellt)
- Tvätt för mikrotiterplattor eller multikanal-pipett, 300 µl (om analysen görs manuellt)
- Plattskak (500–700 rpm) (om analysen görs manuellt)
- Timer (om analysen görs manuellt)
- Plattläsare för mikrotiterplattor med 405 nm filter (om analysen görs manuellt)
- 1M NaOH (stopplösning, valfritt)

## 5. STABILITET OCH FÖRVARING

Vid förvaring i öppnade flaskor vid 2–8 °C är reagensen stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

Öppnade plattor, reagens och koncentrerade buffertar är stabila i upp till tre månader vid förvaring vid 2–8 °C.

Vid beredning i rena kärl kan arbetslösningar (1x) av tvätt-lösning, provspädningsbuffert och extraktionsbuffert för fekalier förvaras vid 2–8 °C i upp till en månad.

Undvik att utsätta produkterna för höga temperaturer och direkt solljus.

## 6. FÖRBEREDELSE

Alla reagens, prover och kontroller måste anta rumstemperatur (18–25 °C) innan testet körs.

### 6.1. Belagda mikrotiterplatt-remsor

Remsorna är färdiga att använda och är belagda med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar specifika för kalprotektin. Oanvända remsor ska tas bort från ramen och omedelbart åter förseglas i aluminiumpåsen tillsammans med medföljande torkmedel. Förvaras vid 2–8 °C.

### 6.2. Provspädningsbuffert

Späd den 5x koncentrerade provspädningsbufferten genom att tillsätta 1 del (20 ml) till 4 delar (80 ml) destillerat/avjonat vatten till slutvolymen 100 ml. Blanda väl. Förvara den utspädda provspädningsbufferten i ett slutet kärl vid 2–8 °C.

**Obs:** Om ett Dynex DS2- ELISA-instrument används måste provspädningsbufferten överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

### 6.3. Tvätt-lösning

Späd den 20x koncentrerade tvätt-lösningen genom att tillsätta 1 del (50 ml) till 19 delar (950 ml) destillerat/avjonat vatten i ett rent kärl till slutvolymen 1000 ml. Blanda väl. Förvara den utspädda lösningen i ett slutet kärl vid 2–8 °C.

### 6.4. Extraktionsbuffert för fekalier

Späd den 2,5x koncentrerade extraktionsbufferten för fekalier genom att tillsätta 1 del (90 ml) till 1,5 delar (135 ml) destillerat/avjonat vatten i ett rent kärl till slutvolymen 225 ml. Blanda väl. Förvara den utspädda bufferten i ett slutet kärl vid 2–8 °C.

### 6.5. Standarder och kontroller

Både flaskorna märkta med Standard A–F och kontrollerna innehåller 1,0 ml vardera av lösningar som är färdiga att använda. Koncentrationen av Kalprotektin är tryckt på varje flaskas etikett. Flaskorna passar direkt in i Dynex DS2 ELISA-instrument

### 6.6. Enzymkonjugat

Röret innehåller 13 ml alkaliskt fosfatas-märkta (ALP-märkt), immunaffinitetsrenade kaninantikroppar specifika för kalprotektin. Bufferten innehåller stabiliseringsmedel, konserveringsmedel och ett inert rött färgämne. Lösningen är färdig att använda. Rören passar direkt in i Dynex DS2 ELISA-instrument.

### 6.7. Enzymsubstratlösning (pNPP)

Flaskan innehåller 13 ml *p*-nitrofenylfosfatlösning (pNPP). Lösningen är färdig att användas och ska förvaras i sin originalförpackning, en ogenomskinlig flaska.

*Obs:* Om ett Dynex DS2 ELISA instrument används måste enzymsubstratlösningen överföras till ett 25 ml Dynex reagensrör innan testet körs.

## 7. TESTFÖRFÖRANDE

**CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** har utvecklats och validerats huvudsakligen för avföringsprover men kan även användas för plasma-/serumprover.

### 7.1. Avföringsprover

Eftersom kalprotektin är mycket stabilt i avföring kan patienterna samla små avföringsprover hemma. Samla 1–5 g (ungefär motsvarande en tesked), lägg det i lämplig ren behållare och leverera provet till laboratoriet så snabbt som möjligt men senast inom fem dagar. Om avföringsproverna läggs i behållare som är godkända för transport kan de skickas med vanlig post, dvs. kylförvaring behövs inte. Proverna bör inte utsättas för temperaturer över 30 °C.

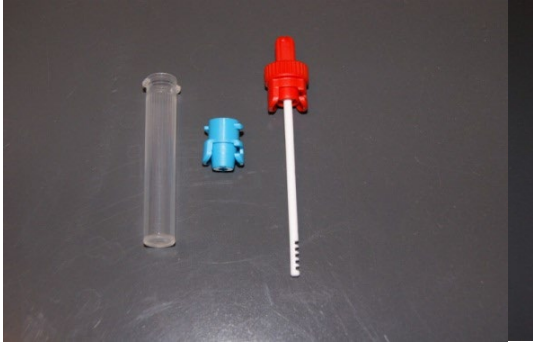
Proverna kan även förvaras frysta, vid -20°C eller lägre, tills de ska levereras eller postas. Frysta prover måste tinas och anta rumstemperatur innan de extraheras och testas.

*Obs:* Innan extraktionen inleds ska avföringsprovet homogeniseras väl, till exempel med hjälp av en spatel, innan den lilla mängden för extraktion tas ut.

För extraktionen rekommenderar vi Calpro Easy Extract® eller ursprungliga vägningsmetoden, se kapitel 7.1.1 och 7.1.2.

### **7.1.1. Extraktion med Calpro Easy Extract®**

Bruksanvisning: Vänligen läs bipacksedeln till produkt nr CAL0510/CAL0510L



(Calpro AS, produkt nr CAL0510)

### **7.1.2. Extraktion med viktningsmetoden (utan extraktionsprodukt)**

1. Väg (tarera) ett tomt provrör med skruvkork med en inokuleringsögla.
2. Ta ut ca 100 mg (mellan 40 och 120 mg) avföring med hjälp av inokuleringsögla och placera provet i röret med skruvkork. Undvik att ta ut fast, osmält material, till exempel fibrer och frön.
3. Väg rör och ögla med avföringsprovet, vilket ger provets nettovikt.
4. Bryt eller klipp av övre delen av öglans handtag och lämna underdelen i röret.
5. Tillsätt extraktionsbuffert till ett vikt: volym-förhållande på 1:50, till exempel 4,9 ml buffert till 100 mg avföringsprov. Förslut röret.
6. Blanda kraftigt i 30 sekunder med hjälp av en vortex-blandare.
7. Fortsätt att blanda på en skakmaskin (vid ca 1000 rpm) i 30±5 minuter med ögla inne i röret som omrörare.
8. Låt stå några minuter på laboratorie-bänken så att partiklarna sjunker till botten och pipettera sedan försiktigt från den övre delen av röret. Det är inte nödvändigt att centrifugera röret, men en kort centrifugering kan göras om man vill ha en partikelfri lösning.
9. Extraktet med en spädning 1:50 (vikt: volym) av avföringsprovet är nu klart för vidare spädning och testning.
10. För förvaring, överför ca 0,5 ml till ett nytt rör. Extrakt kan förvaras vid 2–8 °C i minst fem dagar eller fryst under -20 °C i upp till två år<sup>36</sup>).

## 7.2. FÖRSLAG PÅ PLATTLAYOUT

	1	2	3	4	osv.	
<b>A</b>	Standard A 0 ng/ml	Standard E 125ng/ml	Prov 1	Prov 5		
<b>B</b>	Standard A 0 ng/ml	Standard E 125 ng/ml	Prov 1	Prov 5		
<b>C</b>	Standard B 7.8 ng/ml	Standard F 500ng/ml	Prov 2	Prov 6		
<b>D</b>	Standard B 7.8 ng/ml	Standard F 500ng/ml	Prov 2	Prov 6		
<b>E</b>	Standard C 31.3 ng/ml ng	Kontroll "Låg"	Prov 3	Prov 7		
<b>F:</b>	Standard C 31.3ng/ml	Kontroll "Låg"	Prov 3	Prov 7		
<b>G</b>	Standard D 62.5 ng/ml	Kontroll "Hög"	Prov 4	Prov 8		
<b>H</b>	Standard D 62.5 ng/ml	Kontroll "Hög"	Prov 4	Prov 8		

Föreslagen ELISA-plattlayout för standarder, kontroller och prover vid användning av manuell metod. Duplikatbrunnar rekommenderas för säkrare resultat. En full platta rymmer 40 prover.

## 7.3. TESTFÖRFÖRANDE; ELISA

Följande metod gäller för manuell testning. Validerade protokoll för Dynex DS2 ELISA-instrument kan fås på begäran. Observera att såväl flaskorna med standard och positiv kontroll som konjugat-röret passar direkt in i DS2- ELISA-instrument.

### Metodanteckningar

- Förberedelse: Läs testprotokollet noga *innan* analysen genomförs. Resultatets tillförlitlighet är beroende av att testprotokollet såsom det beskrivs här följs noggrant. Innan analysen inleds ska en plattlayout planeras noga och fastställas för standarder, prover och kontroller. Använd till exempel det ark som medföljer analyssetsen. Välj önskat antal mikrotiterremсор. Oanvända remсор ska återförslutas i aluminiumpåsen och förvaras enligt beskrivningen i avsnitt 6.1.
- En spädning på 1:100 av de fekala extrakten rekommenderas. Denna spädning ger provresultat mellan 22.2 mg/kg (LoQ) och 2 500 mg/kg i avföring. Extrakt med högre värden av kalprotektin kan spädas mer (> 1:100) och testas på nytt om ett värde behövs. Extrakt med låga värden av kalprotektin kan spädas mindre (1:50). Hänsyn måste tas till den justerade spädningsfaktorn vid omräkning från ng/ml till mg/kg (se avsnitt 11 nedan).
- Utför alla analyssteg i den angivna ordningen och utan nämnvärda dröjsmål mellan stegen.
- En ny ren engångspipettspets ska användas för att dispensera varje standard, kontroll och prov.
- För att få ett så tillförlitligt resultat som möjligt ska standarder, kontroller och patientprover alltid köras i duplikat.

### ELISA-metod

1. Späd avföringsextraktet 1:100 i provspädningsbuffert (till exempel 10 µl prov + 990 µl buffert) och blanda väl med vortex-blandare.
2. Tillsätt 100 µl vardera av standard, kontroll och utspätt prov i duplikatbrunnar. Se den rekommenderade plattlayouten i avsnitt 7.2.
3. Täck plattan med förseglingsfilm och inkubera vid rumstemperatur i 40±5 minuter\*) på en horisontell plattskak (ca 500 – 700 rpm).

4. Vid slutet av inkubationstiden ta bort vätskan och tvätta brunnarna genom att tillsätta 300 µl tvätt-lösning till varje brunn. Ta bort så mycket vätska som möjligt och upprepa tills sammanlagt tre tvättar har gjorts. Om en platt-tvättare används, kontrollera att inga aspirations- och påfyllningssonder är igensatta för att säkerställa effektiv tvättning av alla brunnar. Vänd på plattan efter sluttvätten och knacka ur brunnarna väl på absorberande papper så att all tvätt-lösning avlägsnas.
5. Blanda försiktigt innehållet i enzym-konjugatröret (skaka inte). Tillsätt 100 µl konjugat till varje brunn, helst med en repetitiv- eller multikanalspipett.
6. Täck plattan med förseglingsfilm och inkubera vid rumstemperatur i  $40 \pm 5$  minuter\*) på en horisontell plattskak (ca 500–700 rpm).
7. Upprepa tvätt-stegen enligt beskrivningen ovan, tre gånger med 300 µl tvätt-lösning per brunn.
8. Tillsätt 100 µl enzymsubstratslösning till varje brunn, helst med en repetitiv- eller multikanalspipett.
9. Inkubera plattan i rumstemperatur (utan skak) i 20–30 minuter, skyddad från ljus.
10. *Valfritt:* Tillsätt 100 µl 1M NaOH stopplösning till varje brunn om en exakt inkubationsperiod behövs.
11. Skaka plattan kort (2–3 sekunder) före avläsning och avläs OD-värdena (optisk densitet) vid 405 nm med en ELISA-läsare.

## 8. KVALITETSKONTROLL

- En ny standardkurva måste läggas in i varje körning.
- De positiva kontrollerna ska tas med i varje körning. Kontrollernas värden ska ligga inom de gränser som finns tryckta på flaskornas etiketter.
- OD-värdet för standard F (500 ng/ml) bör vara  $\geq 1,6$  och OD-värdet för standard A (0 ng/ml) bör vara  $\leq 0,25$ . En representativ standardkurva visas i figur 1.

## 9. UTVÄRDERING

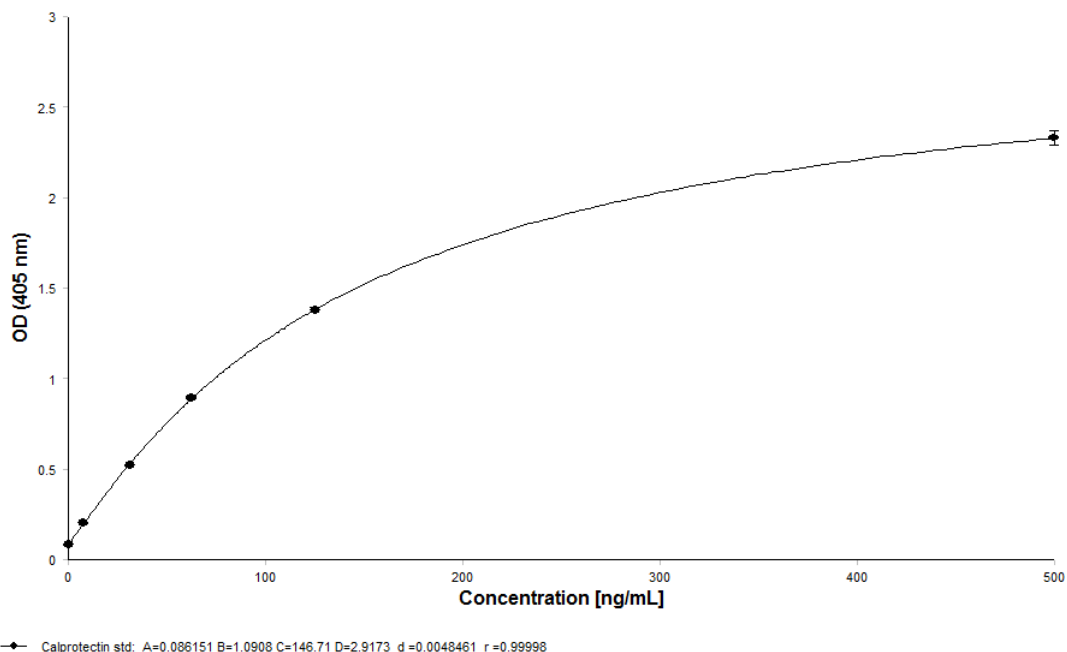
Beräkning av koncentrationen av kalprotektin i avföringsprover från patienter.

1. Beräkna OD-medelvärdena för alla duplikatbrunnar (standarder och prover).
2. Plotta koncentrationen för varje standard (ng/ml) på x-axeln mot OD-medelvärdet på y-axeln för att få fram en standardkurva. **En kurvanpassningsfunktion med 4 parametrar rekommenderas** (se figur 1 nedan). Om en logaritmisk x-axel krävs måste ett värde på 0,001 ng/ml användas för standard A (0 ng/ml).
3. Använd kalibreringskurvan för att bestämma koncentrationen av kalprotektin i de spädda proverna (ng/ml) baserat på deras OD-värden.
4. **Multiplitera koncentrationen av kalprotektin i de spädda avföringsextrakten med 5 för att omvandla värdena till mg/kg kalprotektin i de ursprungliga avföringsproverna.**

Denna faktor korrigerar för den totala spädningsgraden 1:5000 (1:50 under extraktionen och den följande spädningsgraden 1:100 av extrakten) och konverterar värdet från ng/ml till mg/kg.

*Exempel: om ett utspäddt extraktionsprov har ett värde på 100 ng/ml var koncentrationen i det ursprungliga avföringsprovet  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

Obs: Om extrakt har spänts mer (eller mindre) än den rekommenderade spädningsgraden 1:100 måste den extra spädningsfaktorn tas med i beräkningen.



Figur 1: En representativ standardkurva med kurvanpassning med 4 parametrar.

## 10. TOLKNING AV RESULTATET

Följande kalprotectin-värden i avföringsprover för klinisk bedömning har rapporterats i publicerad litteratur<sup>3, 37, 38</sup>:

Normalvärde	5–50 mg/kg
Positivt värde	> 50 mg/kg
Gråzon*	50-100mg/kg
Aktiv, symtomatisk inflammatorisk tarmsjukdom	200–40 000 mg/kg

\*) Patienter med resultat inom gråzonen rekommenderas att upprepa testet för att förbättra diagnostisk noggrannhet.

Observera att en diagnos inte bör byggas på ett enda testresultat. Diagnosen bör även ta hänsyn till klinisk anamnes och symtom.

Enligt vetenskaplig litteratur och publicerade kliniska studier<sup>37, 38</sup> kan följande klinisk prestanda för upptäckt av inflammatorisk tarmsjukdom jämfört med funktionell sjukdom förväntas:

Cut-off	Sensitivitet (95% CI)	Specificitet (95 % CI)	Positivt prediktivt värde	Negativt prediktivt värde
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. SPECIFIKATIONER OCH PRESTANDA

Obs: Alla verifieringsstudier gjordes med manuell testning av avföringsextrakt (spädda 1:100).

**Precision: Intra-och interprecisionsstudierna blev utförda med samma prover på två olika batcher av Calprolab kit.**

Intra-analys (repetierbarhet) precision, avföringsextrakt (n=20)

Koncentration i avföring (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-analys (total), precision, avföringsextrakt (n=80)

Koncentration i avföring (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

### Överensstämmelse mellan de angivna extraktionsmetoderna: Vägningsmetod vs Easy Extract®\*

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

\*) Ytterligare detaljer och prestandauppgifter gällande extraktion av fekalier finns i bruksanvisningen för Easy Extract® (art.nr CAL0510)

### **Återhämtning**

Avföring: 85 – 105% testat med avföringsextrakt spetsat med renat kalprotektin i fem olika koncentrationer.

### **Kvantifieringsgräns, detektionsgräns och blankgräns**

Kvantifieringsgräns (LoQ): 22.15 mg/kg

Detektionsgräns (LoD): 4.36 mg/kg

Blankgräns (LoB): 0.54 mg/kg

Gränsen för kvantifiering, detektion och blank är gjord enligt CLSI-riktlinje EP17A-Ed2.

Överensstämmelse med:

#### **a) Phical (Eurospital)**

Phical test vs CALP0170: Acceptabel korrelation och överensstämmelse har hittats mellan prover analyserade med båda metoderna:

Intercept: -1.8 (95%I: -6.6- -4.6), lutning: 0.94 (95%CI:0.84-1.03), R=0.92

#### **b) Calpro Kalprotektin ELISA (art.nr CAL0100)**

Calpro Kalprotektin ELISA (CAL0100) vs. CALP0170: Acceptabel korrelation och överensstämmelse har hittats mellan prover analyserade med båda metoderna:

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

## Interferens

Ingen interferens på ELISA från vanligt använda läkemedel har observerats, se listan nedan:

prednisolon, imurel, salazopyrin, Trimetopri, ciprofloxacín, Pentasa, Asacol, ibux, Multivitamin och humant hemoglobin.

Dessutom testades S001A12 för möjlig korsreaktion och ingen reaktivitet observerades.

## Mätområde:

22.2 - 2500 mg/kg

## Matrislinjäritet

-Linjäritetsområde: 36 - 1755 mg/kg

Matrislinjäritets-studien utfördes enligt CLSI-riktlinje EP06-Ed2

## 12. METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Diagnos bör inte endast baseras utifrån ett enda testresultat. Diagnosen bör också ta hänsyn till både klinisk anamnes och symtom.

## 13. KONTRAIKATIONER

- Falsknegativa resultat kan uppstå hos patienter som har granulocytopeni på grund av benmärgssuppression.
- Patienter som behandlas med azatioprin kan också ha granulocytopeni som kan leda till falska negativa resultat.
- Vissa patienter som tar icke-steroida anti-inflammatoriska läkemedel (NSAID) kommer ha ökade nivåer av fekalt kalprotektin.
- Resultaten är eventuellt inte är kliniskt applicerbara på barn under 2 år, eftersom de oftast har ökade nivåer av fekalt kalprotektin.
- Andra tarmsjukdomar, inklusive många gastrointestinala infektioner och kolorektal cancer kan resultera i förhöjda nivåer av fekalt kalprotektin.
- Fekalt kalprotektin är en ospecifik biomarkör för inflammation i tarmen. Förhöjda nivåer betyder inte nödvändigtvis att patienten har aktiv IBD, den fullständiga kliniska anamnesen måste alltid utvärderas.

## 14. FÖRSIKTIGHET OCH VARNING

- Denna produkt är utvecklad och producerad i enlighet med artikel 1 paragraf 2 b i EU-direktivet 98/79/EC för att säkerställa produktens lämplighet, prestanda och säkerhet vid tilltänkt bruk. Därför är det viktigt att testförförandet, informationen, försiktighetsåtgärderna och varningarna i bruksanvisningen följs noggrant. Användningen av produkten med analysinstrument eller liknande utrustning som inte är beskrivet i bruksanvisningen måste valideras av användaren om inte annat är informerat av producenten. Alla ändringar i design, sammansättning, testförförande eller att använda produkten i kombination med andra produkter som inte har godkänts av tillverkaren görs helt och hållet på användarens eget ansvar. Tillverkaren kan inte hållas ansvarig för falska resultat och incidenter som orsakas av sådan användning. Tillverkaren kan inte hållas ansvarig för resultat som erhålls genom visuell analys av patientprover.
- Produkten är endast avsedd för *in vitro*-diagnostik.
- Alla komponenter av humant ursprung som använts för framställning av dessa reagens har testats med avseende på anti-HIV-antikroppar, anti-HCV-antikroppar och hepatit B-antigen (Bag) och har konstaterats vara icke-reaktiva. Trots detta ska allt material behandlas och hanteras som potentiellt smittförande.

- Byt inte ut reagens eller remsor från olika tillverkningspartier
- Använd inte reagens från andra tillverkare tillsammans med reagens från detta test-kit.
- Använd inte reagens efter det utgångsdatum som anges på etiketten. Använd inte arbetslösningar mer än 1 månad efter beredning.
- Använd endast rena pipettspetsar, dispensrar och laboratorieartiklar.
- För att undvika korskontaminering, byt inte skruvlock mellan reagensflaskorna.
- Stäng reagensflaskorna ordentligt omedelbart efter användning för att undvika avdunstning och mikrobiell kontaminering.
- Efter öppning av kit och efterföljande förvaring kontrollera alltid konjugat-, standard- och kontroller med avseende på mikrobiell kontaminering innan ytterligare användning.
- För att undvika korskontaminering och falskt förhöjda resultat, pipettera standarder, kontroller och avföringsextrakt och dispensera konjugat och substrat noga mot botten av mikrotiterplattans brunnar, utan att stänka.
- Vissa reagens innehåller natriumazid i mindre än 0.1% (vikt/volym) och/eller mindre än 0.1% Kathon
- Förvara substratlösningen i den ursprungliga ogenomskinliga flaskan; lösningen ska vara klar till svagt gul. Blandaförsiktigt före användning.
- **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** är designad för att användas av kvalificerad laboratoriepersonal.

## Avfallshantering

Rester av kemikalier och beredningar betraktas i allmänhet som farligt avfall. Hanteringen av denna typ av avfall regleras genom nationella och regionala lagar och förordningar. Kontakta lokala myndigheter eller avfallshanteringsföretag för råd om hantering av farligt avfall.

## 15.REFERENSER






1. John 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. Intern Design Verification Rapport: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027, 2014-04-09
37. Kennedy E. Nicholas et. al: Clinical utility and diagnostic accuracy of faecal Calprotectin for IBD at first presentation to gastroenterology services in adults aged 16-50 years. *J.Chron's and Colitis* (2014)
38. Amanda Ricciuto and Anna M. Griffiths: Clinical value of fecal calprotectin. *Critical Review in Clinical Laboratory Sciences*, 2019 (56): 307-320

## 17. BESTÄLLNINGSPÅSÄTTNING

Produktkod: CALP0170

CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP) (96 bestämmingar)

Symbolförklaring/Symbols Key	
	Tilverkad av/ Manufactured by
<b>IVD</b>	Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik/ <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
<b>LOT</b>	Lot-nummer/ Lot Number/
	Utgångsdatum/ Expiration Date
	Förvaringstemperatur/ Storage Temperature
<b>CE</b>	CE-märkning/ CE Mark
<b>REF</b>	Katalognummer/ Catalogue Number
	Katalognummer/ Catalogue Number
<b>MTP</b>	Mikrotiterplatta/ Microplate
<b>CONJ</b>	Konjugat/ Conjugate
<b>CAL</b>	Kalibrator A-F/ Calibrator A-F
<b>CTR LOW</b>	Låg kontroll/ Control Low
<b>CTR HIGH</b>	Hög kontroll/ Control High
<b>DIL 5x</b>	Provspädningsbuffert/ Sample diluent buffer 5x concentrated
<b>SUB pNPP</b>	pNPP Substratlösning/ pNPP Substrate solution
<b>FEC EXTR BUF 2,5x</b>	Fekal Extraktionsbuffert/ Faecal Extraction Buffer 2,5x
	Innehållet räcker till "n" tester/ Contains sufficient for "n" tests

Version 04 (07.06.2023)

### Tillverkas av:

**Calpro AS**

Arnstein Arnebergs vei 30

N-1366 Lysaker, Norway

Tel: +47 67 43 01 34

mail@calpro.no

www.calpro.no

### Tillverkas i EU för

Vid frågor: Kontakta mail@calpro.no

## SNABBGUIDE

### CalproLab™ ELISA (ALP) för analys av kalprotektin i fekalier

Se avsnitten 7–9 i bipacksedeln för en fullständig beskrivning av de praktiska stegen

#### Extraktion

- Gör extraktionen enligt någon av de metoder som beskrivs i avsnitt 7.1.1–3

#### ELISA (manuell metod)

- Späd extrakten från avföringsproverna 1:100 i provspädningsbuffert
- Tillsätt 100 µl standarder, kontroller och prover till ELISA-plattan
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40±5 min
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µl tvättlösning
- Tillsätt 100 µl ALP-enzymkonjugat till varje brunn
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40±5 min
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µl tvättlösning
- Tillsätt 100 µl pNPP-enzymsubstratlösning till varje brunn
- Inkubera täckt i 20–30 min
- Valfritt:* tillsätt 100 µl 1M NaOH till varje brunn
- Skaka plattan i 2-3 sekund och avläs OD-värdena vid 405 nm med en ELISA-läsare
- Beräkna resultaten (ng/ml) med användning av en kurvanpassning med 4 parametrar
- mg/kg i fekalier = ng/ml × 5

Om du har frågor, kontakta [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)