



CALPROTECTIN

ELISA

EK-CAL 96 tests

Revision date: 2012-01-20

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Calprotectin ELISA kit is designed for the extraction and quantitative determination of human Calprotectin (MRP8/14; S100A8/S100A9) in stool samples (1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

After a short extraction procedure using one volume of faeces and 49 volumes of Extraction Buffer, the test allows for the selective measurement of Calprotectin-antigen by sandwich ELISA. A monoclonal capture antibody (mAb) highly specific to the Calprotectin heterodimeric and polymeric complexes (4-5), respectively, is coated onto the microtiter plate. Calibrators, controls and patients extracts are incubated at room temperature for 30 minutes. After a washing step a detection antibody (Ab) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) detects the calprotectin molecules bound to the monoclonal antibody coated onto the plate. After incubation and a further washing step, tetramethylbenzidine (TMB) will be added (blue color formation) followed by a stopping reaction (change to yellow color). The absorption is measured at 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Extraction Buffer	3 bottles 125 ml	B-CAL-EX	Ready to use
Microtiter Plate precoated with anti-Calprotectin mAb	12 x 8 wells	B-CAL-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-CAL-WB	Dilute with 900 ml of deionized H ₂ O
Incubation Buffer with preservatives	2 bottles 125 ml	B-CAL-IB	Ready to use
Calibrators A to E ¹⁾²⁾ Calprotectin in a buffer matrix with preservatives	5 vials 1 ml	B-CAL-CASET	Ready to use
Control Low / High ³⁾ human serum with preservatives	2 vials 1 ml	B-CAL-CONSET	Ready to use
Enzyme Label Anti-Calprotectin Ab conjugated to HRP	1 vial 12 ml	B-CAL-EL	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial 12 ml	B-TMB12	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 12 ml	B-ST512	Ready to use Corrosive agent

Table 1

¹⁾ The actual Calprotectin concentration of the standards A to E are 4, 12, 40, 120 and 240 ng/ml, respectively. During extraction a 1:50 sample dilution occurs followed by an additional 1:50 dilution of the extracts for the measurement in the ELISA. To take these dilution steps into account for the final calculations the calibrators A to E the following concentrations have to be used for the lower range ELISA procedure (refer to page 4): **10, 30, 100, 300 and 600 µg/g Calprotectin**.

²⁾ If you choose the extended range ELISA procedure (refer to page 5) the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: **30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g Calprotectin**

³⁾ The controls contain lot specific amounts of native human Calprotectin. Refer to the additional QC data sheet for actual concentrations.

REAGENTS SUPPLIED UPON REQUEST

Fecal Extraction Devices

Smart-Prep	50 tubes, spatulas, and base caps	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip	B-CAL-SOFI
	1.3 ml, ready to use	

Table 2

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Extraction Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store until expiration date at 2-8°C.
Diluted Wash Buffer	Store for up to 6 months at 2-8°C.
Incubation Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Calibrators	
Controls	
Enzyme Label	
TMB-Substrate	
Stop Solution	

Table 3

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Microtiter Strips, Calibrators and Controls of this kit contain components of human origin. Each serum donor unit used in the preparation of the kit components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV surface antigen, so as for HCV and HIV1/2 antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practice using appropriate precautions.

Stop Solution: The Stop Solution (B-ST5) contains sulfuric acid. The reagent is irritating to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Extraction Procedure

- 10 µl disposable inoculation loops (Sarstedt: 86.1562.010)
- 15 ml polypropylene tubes with screw caps (Sarstedt: 62.554.502) required for standard extraction procedure; extraction devices (see above).
- Laminar flow work station
- Multi tube vortex mixer
- Precision balance (10-150 mg)
- Micro centrifuge (≥3000 g)

ELISA Procedure

- 10, 100 and 1000 µl precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder to dilute the Wash Buffer.

- Microtiter plate washer (see Procedural Notes) or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator (see Procedural Notes).
- Blotting paper.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

50 to 100 mg of native stool sample are needed for the extraction procedure.

Collect stool samples into plain tubes and store them refrigerated at 2-8°C for up to 6 days.

Freezing of samples may result in slightly increased Calprotectin concentrations due to Neutrophils present in the sample. Therefore, it is of advantage for longer storage, to keep the extracts at -20°C. The extracts are stable for at least 4 months.

Important: The sample must be collected without any chemical or biological additions in the collection device.

PROCEDURAL NOTES

- **Residues in the microtiter plate wells** result from the production process. They are removed in the washing step (Assay procedure step 3) and do not affect the results.

Extraction:

- To receive quantitative results it is important to homogenate the entire weighted stool sample in the extraction buffer. Avoid contamination at the top of the tube - insoluble (undigested) components can still be in the tube after extraction.
- The short centrifugation step of 5 minutes during the extraction can cause a turbid solution. Turbidity can be avoided by longer centrifugation but it shows no influence on the quantitative determination in the ELISA.

ELISA Procedure:

- In the ELISA procedure the **washing steps are essential** to guarantee reproducible results. A **minimal incubation time** of the Wash Buffer in the wells **of at least 20 seconds** must be ensured each time.
- When using **automated washer**, BÜHLMANN strongly recommends to use a "plate mode" i.e. each process step (dispense/aspiration) is performed on all of the strips sequentially, before processing to the next process step. Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The indicated no. of **washing cycles is mandatory** to ensure reproducible results.
- To ensure a complete antigen/antibody interaction, the **incubation time in step 5** must be at least 30 minutes. Moderately longer incubation time (up to 5 minutes) has no influence to the final outcome.
- **Plate rotator** (shaker) must at 400 - 600 rpm (<10 Hz). Higher rotation frequency may cause poor dilution linearity at values between 300/900 and 600/1800 µg/g. Orbital rotation instead of reciprocal shaking should be used.
- The Enzyme Label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- It is recommended to assay each control and specimen in **duplicate** each time a test is performed. Since conditions vary from assay to assay, a new standard curve must be generated each time a new assay is performed. Vertical alignment is recommended.
- If the initial concentration of an unknown sample reads higher than the top Calibrator (Calibrator E), the sample

must be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting dilution factor must be accounted for the calculation of results.

ASSAY PROCEDURE

Extraction

Standard extraction procedure (refer to page 31)

1. Label and weigh (tare) the empty polypropylene tube together with the inoculation loop.
2. Take out 50 to 100 mg of the stool sample by means of the inoculation loop and place it into the pre-weighted tube.
3. Estimate the net amount of sample, break off the inoculation loop and leave the lower part of the loop in the tube.
4. Add Extraction Buffer (49 times the weight volume) to the tube and close the tube:

Weight [mg] Stool	Volume [ml] Extraction Buffer
50	2.5
55	2.7
60	2.9
65	3.2
70	3.4
75	3.7
80	3.9
85	4.2
90	4.4
95	4.7
100	4.9

5. Homogenize the sample on a multi tube vortexer by vigorous shaking (at highest speed) for 30 minutes.
6. Transfer the homogenate into a 2 ml Eppendorf tube and centrifuge in a microcentrifuge for 5 minutes at 3'000 x g.
7. Take the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the ELISA procedure or store the extracts at ≤-20°C for at least 4 months.

Extraction procedures using fecal extraction devices:

The extraction procedure is described and illustrated in the instruction for use delivered with the respective extraction device.

1. Fecal Extraction Device Roche (Code 10745804 322) or BÜHLMANN **Smart-Prep** (Code: B-CAL-RD): The extraction time (vortexing) can be reduced to 1 minute.
2. **ScheBo® Quick-Prep™** (Code B-CAL-SOFI): The extraction tubes are prefilled with extraction buffer. The extraction time is about 10 minutes (vortexing).

After extraction, centrifuge the tubes for 5 minutes at 3'000 x g. Alternatively, transfer the homogenate into a 2 ml Eppendorf tube and centrifuge it in a microcentrifuge for 5 minutes at 3'000 x g.

Decant the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the ELISA procedure or store the extracts at ≤-20°C for at least 4 months.

The respective extraction procedures are published on the website:
<http://www.buhmannlabs.ch/core/inflammation/calprotectin/>

ELISA PROCEDURES

The assay can be performed according to the following procedures – lower or extended range ELISA procedure. Which procedure is to be chosen depends on the expected Calprotectin concentration of the samples. For samples up to 600 µg/g choose the lower range procedure using a sample dilution of 1:50 (working range 10 – 600 µg/g) (refer to page 4, 5). If the samples tend to exceed 600 µg/g choose the extended range procedure using a sample dilution of 1:150 (working range 30 – 1800 µg/g) (refer to page 5).

LOWER RANGE ELISA PROCEDURE

WORKING RANGE 10 – 600 µg/g

Allow the reagents to equilibrate to 18-28°C prior to use

1. Dilute the stool extracts 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 20 µl extract and 980 µl incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28°C prior to proceeding to step 4c.
 2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and diluted samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.
 3. Wash the coated wells twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.
- Important:** For every of the three wash steps a minimal **incubation time of at least 20 seconds of the Wash Buffer** in the wells must be ensured (see Procedural Notes – ELISA Procedure, page 3).
- 4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer in duplicate into wells A1+A2 (Blank)
Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells B1+B2
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2.
etc.
 - 4b. Pipet 100 µl of the Low and High Controls in duplicate into wells G1+G2 and H1+H2, respectively.
 - 4c. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
 5. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 + 5 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C (see Procedural Notes – ELISA Procedure, page 3).
 6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well (see procedural notes, page 3). Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.
 7. Pipet 100 µl of Enzyme Label to all wells.
 8. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 ± 5 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C.
 9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and **wash five times** using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the TMB Substrate Solution to equilibrate to 18-28°C.

10. Pipet 100 µl of the TMB Substrate Solution to all wells.

11. Cover the plate with a plate sealer, protect the plate from direct light and incubate for 15 ± 2 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C.

12. Pipet 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 minutes.

13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS

WORKING RANGE 10 – 600 µg/g

Standard Curve: Record the absorbance at 450 nm for each calibrator and blank well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record averages (= corrected average absorbance). Plot the absorbance (vertical axis) versus the Calprotectin concentration of the calibrators (horizontal axis) using a semi logarithmic lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter logistic.

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (=corrected average absorbance). Locate the corrected absorbance value of the sample on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the Calprotectin concentration from the horizontal axis. If you choose the lower range ELISA procedure, the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: **10, 30, 100, 300 and 600 µg/g Calprotectin**.

Additional dilution factors have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to Table 16 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

WORKING RANGE: 10 – 600 µg/g

Intra-Assay Precision: 4.7 %. The intra-assay precision was calculated from 20 pairs of values from 3 extracted stool samples assayed in a single run according to the assay procedure. The values are presented in Table 17.

Inter-Assay Precision: <15 %. The inter-assay precision of the ELISA was calculated from 5 extracted stool samples. The aliquots were tested according to the assay procedure in 10 different runs by three technicians using 2 kit lots in two different labs. The values are presented in Table 18.

Analytical Sensitivity: <10 µg/g. Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimal detectable dose of Calprotectin was calculated to be clearly below Calibrator A (10 µg/g) by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the standard curve obtained in a new run.

Functional Sensitivity: <10 µg/g. Ten stool samples with values between 5.2 and 1254 µg/g Calprotectin were assayed 20 times in duplicates in one assay. The %CV and the mean values were calculated for each sample. The functional sensitivity was observed at 15 % CV. The resulting precision profile (Figure 2) allows the precise measurement within the whole standard range from 10 to 600 µg/g.

Dilution Linearity: 103 %. Seven stool samples with elevated Calprotectin values were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Incubation

Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The results are presented in Table 19.

Spiking Recovery: 100 %. Two extracted stool samples were spiked with different amounts of diluted, Calprotectin containing human serum. The samples were measured before and after spiking according the assay procedure. The results are presented in Table 20.

Crossreactivity: <0.1 %. Incubation Buffer spiked with different amounts of recombinant MRP8 and MRP14 were measured according to the assay procedure. The values are presented in Table 25

EXTENDED RANGE ELISA PROCEDURE

Working Range 30 – 1800 µg/g

Allow the reagents to equilibrate to 18-28°C prior to use

The working range can be extended by a factor of 3, if you dilute the samples 1:150 instead of 1:50. This procedure is recommended, if high Calprotectin concentrations are to be expected. Precision and linearity of the assay allow for this extension of the kit range.

1. Dilute the stool extracts 1:150 with Incubation Buffer (e.g. 20 µl extract and 2980 µl incubation buffer) and mix well. **NB: Only dilute stool extracts. Standards and controls are ready to use.** Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28°C prior to proceeding to step 4c.
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and diluted samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.
3. Wash the coated wells twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: For every of the three wash steps a minimal **incubation time of at least 20 seconds of the Wash Buffer** in the wells must be ensured (see Procedural Notes – ELISA Procedure).

4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer in duplicate into wells A1+A2 (Blank)

Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells B1+B2

Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2. etc.

4b. Pipet 100 µl of the Low and High Controls in duplicate into wells G1+G2 and H1+H2, respectively.

4c. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.

5. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 + 5 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C (see Procedural Notes – ELISA Procedure, page 3).

6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well (see procedural notes). Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

7. Pipet 100 µl of Enzyme Label to all wells.

8. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 ± 5 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C.

9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and **wash five times** using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the TMB Substrate Solution to equilibrate to 18-28°C.

10. Pipet 100 µl of the TMB Substrate Solution to all wells.

11. Cover the plate with a plate sealer, protect the plate from direct light and incubate for 15 ± 2 minutes on a plate rotator set at 400-600 rpm at 18-28°C.

12. Pipet 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13. within 30 minutes.

13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS

WORKING RANGE 30 – 1800 µg/g

Standard Curve: Record the absorbance at 450 nm for each calibrator and blank well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record averages (= corrected average absorbance). Plot the absorbance (vertical axis) versus the Calprotectin concentration of the calibrators (horizontal axis) using a semi logarithmic lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter logistic.

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (=corrected average absorbance). Locate the corrected absorbance value of the sample on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the Calprotectin concentration from the horizontal axis. If you choose the extended range ELISA procedure, the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g Calprotectin.

Refer to Table 21 and Figure 3 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

WORKING RANGE: 30 – 1800 µg/g

Intra-Assay Precision: 4.0 %. The intra-assay precision (mean) was calculated from the results of 20 duplicates from 3 extracted stool samples assayed in a single run according to the assay procedure. The values are presented in Table 22.

Inter-Assay Precision: <15 %. The inter-assay precision of the ELISA was calculated from 5 extracted stool samples. The aliquots were tested according to the assay procedure in 10 different runs by three technicians using 2 kit lots in two different labs. The values are presented in Table 23.

Functional Sensitivity: <30 µg/g. 18 stool samples with values between 10.8 and 2080 µg/g Calprotectin were measured 20 times in one assay. The % CV and the mean values were calculated for each sample. The functional sensitivity was observed at 15 % CV. The resulting precision profile allows the precise measurement within the whole standard range from 30 to 1800 µg/g. The results are presented in Figure 4.

Dilution Linearity: 102 %. Five stool samples with elevated Calprotectin concentrations were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The results are presented in Table 24.

EXPECTED VALUES

Estimation of faecal Calprotectin is a reliable and easy way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases.

In a clinical study 401 symptomatic patients scheduled for colonoscopy were investigated (publication in preparation). Endoscopy examination showed 273 patients with

functional diseases whereas 128 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulcers, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases).

ROC curve analysis (AUC: 0.935) resulted in an optimal clinical cut-off at 50 µg/g. Applying this cut-off, a clinical sensitivity and specificity of 84.4% and 94.5%, respectively can be reached in the differentiation between organic and functional diseases (see Table 26).

Faecal Calprotectin levels from adults and children are comparable, whereas levels of newborns can be significantly increased (8).

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Normal values below 50 µg/g:

Calprotectin values <50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patients with low Calprotectin levels are likely not to be in need of invasive procedures to determine the inflammation cause (12).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:

Calprotectin values between 50 and 200 µg/g can represent mild organic disease such as inflammation caused by NSAIDs, mild diverticulitis and IBD in remission phase. The low inflammatory response shown within this range may suggest repeating the measurement and performing further investigations.

Elevated values above 200 µg/g:

Calprotectin values > 200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative and curative procedures by specialists are suggested.

The cut-off level suggested for adults (50 µg/g) can also be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (9).

QUALITY CONTROL

Thorough understanding of this instruction is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

Since there is no control serum for Calprotectin commercially available, we recommend using a pool of positive stool extractions for internal quality control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional QC data sheet.

If the precision of the assay does not meet the established limits and repetition has excluded errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

LIMITATIONS

The reagents supplied with this kit are optimized to measure human Calprotectin in extracted stool samples.

Fecal Calprotectin values should be used supplementary for establishing a diagnosis.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Calprotectin ELISA Kit wird eingesetzt für die quantitative Bestimmung von humanem Calprotectin (MRP8/14; S100A8/S100A9) aus extrahierten Stuhlproben (1-3).

PRINZIP DER METHODE

Nach einem kurzen Extraktionsschritt mit einem Volumenanteil Stuhlprobe und 49 Volumenanteilen Extraktionspuffer wird Calprotectin selektiv mittels Sandwich ELISA bestimmt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit einem monoklonalen Fangantikörper (mAk) beschichtet, welcher gegenüber heterodimerem und polymerem Calprotectin hoch spezifisch ist (4-5). Das Calprotectin in den Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben bindet während der Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur an den Fangantikörper. Nach einem Waschschrift wird das am mAk gebundene Calprotectin durch einen mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugierten Nachweisantikörper (Ak) detektiert. Nach der Inkubation und einem weiteren Waschschrift, wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzym-Substratreaktion führt zu einem blaugefärbten Produkt, sie wird durch Zugabe der Stopp-Lösung gestoppt. Dabei findet gleichzeitig ein Farbumschlag nach Gelb statt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist direkt proportional zur Calprotectinkonzentration der Probe.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Extraktions-Puffer	3 Flaschen à 125 ml	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit anti-Calprotectin mAk	8 x 12 Kavitäten	B-CAL-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat 10x Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-CAL-WB	mit 900 ml deionisiertem H ₂ O verdünnen
Inkubationspuffer Konservierungsstoffe	2 Flaschen 125 ml	B-CAL-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren A-E¹⁾²⁾ Calprotectin in Protein-haltigem Puffer; Konservierungsstoffe	5 Röhrchen 1 ml	B-CAL-CASET	Gebrauchsfertig
Kontrolle tief / hoch³⁾ Humanserum mit Konservierungsstoffen	2 Röhrchen 1 ml	B-CAL-CONSET	Gebrauchsfertig
Enzym-Marker anti-Calprotectin Ak konjugiert mit HRP	1 Flasche. 12 ml	B-CAL-EL	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat-Lösung Citrat-gepufferte TMB Lösung	1 Flasche. 12 ml	B-TMB12	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H ₂ SO ₄	1 Flasche. 12 ml	B-ST512	gebrauchsfertig korrosiv

Table 4

¹⁾ Die tatsächliche Konzentrationen der Kalibratoren A-E betragen 4, 12, 40, 120 und 240 ng/ml Calprotectin. Durch die Extraktion entsteht eine Probenverdünnung von 1:50; der Probenextrakt wird 1:50 verdünnt. Dadurch resultiert eine Gesamtverdünnung von 1:2500. Beide Verdünnungsschritte wurden bei den Standardkonzentrationen bereits berücksichtigt und werden für die „Lower Range“ ELISA Variante (siehe Seite 9, 9) folgendermassen angegeben: **10, 30, 100, 300 und 600 µg/g** Calprotectin.

²⁾ Hinweise zur Durchführung des erweiterten Messbereichsverfahrens finden Sie auf Seite 10, 10). Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante verwenden, geben Sie die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das entsprechende ELISA Auswerteprotokoll ein: **30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g** Calprotectin.

³⁾ Die Kontrollen enthalten Lot-abhängige Konzentrationen von nativem, humanem Calprotectin. Die genauen Konzentrationen werden auf dem QC Datenblatt angegeben.

REAGENZIEN GELIEFERT AUF BESTELLUNG

Extraktionsbesteck für Stuhlproben

Smart-Prep	50 Röhrchen, Spatel und Böden	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze	B-CAL-SOFI
	1.3 ml, gbrauchsfertig	

Table 5

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum, angegeben auf der Packungsetikette.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Extraktions-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Mikrotiterplatte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Trockenmittel versetzte Packung zurückbringen. Packung gut verschliessen. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Waschpuffer	Bei 2-8°C bis 6 Monate nach der Verdünnung lagern.
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Enzym-Marker	
TMB-Substrat	
Stopp-Lösung	

Table 6

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Mikrotiterplatte, Kalibratoren und Kontrollen dieses Tests enthalten Komponenten, die aus Humanserum gewonnen werden. Jedes einzelne verwendete Spenderserum wurde durch FDA-genehmigte Methoden auf HbsAg (Hepatitis surface Antigen), sowie auf HCV und HIV1/2 Antikörper getestet und als negativ freigegeben. Trotz hoher Sensitivität dieser Methoden kann nicht garantiert werden, dass die Seren negativ sind. *Aus diesem Grunde müssen diese Kitkomponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte menschlichen Ursprungs müssen mit größter Vorsicht und nach den GLP Vorgaben verarbeitet werden. **Stopp-Lösung;** Die Stopp-Lösung (B-ST5) enthält Schwefelsäure (H₂SO₄). Das Reagenz reizt die Augen, die Haut und die Schleimhäute. Berührung mit den Augen, der Haut und der Bekleidung vermeiden. Geeignete Schutzkleider, Handschuhe und Brillen tragen. Bei Augen- oder Hautkontakt mit einem dieser Reagenzien, sofort mit viel Wasser spülen.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Extraktion

- 10 µl Einweg Impfschlingen (Sarstedt #86.1562.010)
- 15 ml Polypropylen Einwegröhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt #62.554.502) für die Standard-extraktion
- Laminar Flow Arbeitsplatz
- „Multi Tube“ Vortex Mixer
- Präzisionswaage (10-150 mg)
- Mikrozentrifuge

ELISA

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 10, 100 und 1000 µl.
- Polystyrol oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Durchführung von Probenverdünnungen.
- 1000 ml Messkolben zur Verdünnung des Waschpuffer Konzentrats.
- Mikrotiterplattenwaschvollautomat oder Spritzflasche für Waschpuffer (siehe Technische Hinweise).
- Mikrotiterplattenschüttler (siehe Technische Hinweise).
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Für die Extraktion werden 50 bis 100 mg native Stuhlprobe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden und kann gekühlt bei 2-8°C bis zu 6 Tagen gelagert werden.

Neutrophile Zellen in der Stuhlprobe können beim Einfrieren der Proben Calprotectin freisetzen. Aus diesem Grunde kann die Bestimmung aus gefrorenen Proben im Vergleich zu frischen Proben leicht höhere Werte ergeben. Deshalb wird empfohlen, für eine längere Lagerung die Extrakte bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Tiefgefrorene Extrakte sind für mindestens 4 Monate stabil.

Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit chemischen oder biologischen Zusätzen versetzt werden.

TECHNISCHE HINWEISE

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es **Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten** haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

Extraktion

- Um die Extraktion quantitativ durchzuführen, ist es wichtig, dass die eingewogene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird. Kontaminationen am oberen Rand des Extraktionsröhrchens sollten vermieden werden – unlösliche (unverdaute) Bestandteile können auch nach der Extraktion vorhanden sein.
- Die kurze Zentrifugation von 5 Minuten nach der Extraktion kann zu einer Trübung des Überstandes führen. Durch eine längere Zentrifugation kann diese Trübung vermieden werden. Sie hat jedoch keinen Einfluß auf die ELISA Ergebnisse.

ELISA

- Die korrekte Durchführung der in der Arbeitsvorschrift beschriebenen **Waschschritte** ist essentiell, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers** in der Kavität **von mindestens 20 Sekunden** muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.
- Wird ein **Waschautomat** eingesetzt, muss der „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor der nächste Schritt (Absaugen) gestartet wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.
- Die angegebene Anzahl von **Waschschritten muss eingehalten** werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig ablaufen kann, muss die **Inkubationszeit in Schritt 5** mindestens 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkuba-

tionszeiten (bis zu 5 Minuten) zeigen dagegen keinen Einfluss auf das Endresultat.

- **Der Mikrotiterplattenschüttler** muss zwischen 400 und 600 rpm (<10 Hz) eingestellt sein. Eine höhere Rotationsgeschwindigkeit kann zu einer schlechteren Verdünnungslinearität bei Werten zwischen 300/900 und 600/1800 µg/g führen. Eine Rotationsbewegung sollte einer Horizontalbewegung vorgezogen werden.
- Die als Enzymmarker verwendete Peroxidase (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische chlorierte Kohlenwasserstoffe, die im Wasser vorkommen können. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser von hoher Qualität verwendet werden.
- Es wird empfohlen, jede Kontrolle und jede Probe in Doppelbestimmung zu testen. Die Standardkurve muss bei jedem Testansatz bestimmt werden. „Vertikale Anordnung“ wird empfohlen.
- Falls die Konzentration einer Probe grösser als diejenige des höchsten Kalibrators (E) ist, muss diese Probe mit Inkubationspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Der zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Konzentrationsberechnung dieser Probe berücksichtigt werden

ARBEITSANLEITUNG

Standardextraktionsanleitung (siehe auch Seite 31)

1. Die leeren Polypropylenröhrchen beschriften und zusammen mit der Einweg-Impfschlinge austarieren.
2. Mit Hilfe der Impfschlinge 50-100 mg Stuhlprobe entnehmen und in das vorgewogene Röhrchen geben.
3. Das Nettogewicht der entnommenen Probe bestimmen, die Impfschlinge abbrechen und den unteren Teil davon im Röhrchen belassen.
4. Extraktions-Puffer (49faches Stuhlgewicht) ins Röhrchen geben und verschliessen.

Gewicht [mg] der Stuhlprobe	Volumen [ml] Extraktions-Puffer
50	2.5
55	2.7
60	2.9
65	3.2
70	3.4
75	3.7
80	3.9
85	4.2
90	4.4
95	4.7
100	4.9

5. Die Probe in einem Multi-Tube Vortex Mixer durch starkes Schütteln (höchste Geschwindigkeit) 30 Minuten extrahieren.
6. Das Homogenat in ein 2 ml Eppendorf Röhrchen überführen und für 5 min bei $3'000 \times g$ in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
7. Den Überstand in ein frisches, angeschriebenes Röhrchen geben und den ELISA durchführen oder den Extrakt bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ bis zu 4 Monate lagern.

Extraktion unter Verwendung Stuhlextraktionsbestecken (siehe auch Seite 31)

Die Extraktion ist beschrieben und illustriert in den Anleitungen, die den Extraktionsbestecken beiliegen.

1. Bei Verwendung des Fecal Extraktionsbesteckes (Code 10745804322) oder des BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD) kann die Extraktionszeit (Vortexen) auf 1 Minute reduziert werden.
2. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SOFI): Die Extraktionsröhrchen sind vorgefüllt mit Extraktionspuffer. Die Extraktionszeit (Vortexen) beträgt 10 Minuten.

Nach der Extraktion werden die Röhrchen 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Alternativ wird das Homogenat in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 3000 x g in einer Mikrofuge zentrifugiert.

Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen überführen und mit dem ELISA fortfahren oder die Extrakte bei -20°C einfrieren. Haltbarkeit: Mindestens 4 Monate.

Die Extraktionsvorschriften sind auf der Website abrufbar unter <http://www.buhlmannlabs.ch/core/inflammation/calprotectin/>

ELISA DURCHFÜHRUNG

Der Test kann entweder nach der Anleitung für den unteren Konzentrationsbereich „Lower Range“ ELISA Variante oder der Anleitung für den erweiterten Messbereich „Extended Range“ ELISA Variante durchgeführt werden. Welche Version Sie wählen sollten, hängt von der erwarteten Calprotectin Konzentration der Proben ab. Für Proben bis zu 600 µg/g sollte die Anleitung mit einer Probenverdünnung von 1:50 (Messbereich 10 – 600 µg/g) (siehe Seite 9, 10) verwendet werden. Wenn die Konzentration der Proben jedoch häufig oberhalb von 600 µg/g liegt, raten wir zu dem erweiterten Messbereichsverfahren mit einer Probenverdünnung von 1:150 (Messbereich 30 – 1800 µg/g) (siehe Seite 10).

ELISA ANLEITUNG – MESSBEREICH 10 – 600 µg/g Vor der Verwendung der Reagenzien müssen diese eine Temperatur von 18-28°C aufweisen.

1. Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 20 µl Extrakt + 980 µl Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und, vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28°C stehen lassen.
2. Eine Mikrotiterplatte mit ausreichenden Streifen für die Bestimmung von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben bestücken. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und **unverzüglich** mit Trockenmittel einpacken und gekühlt lagern.
3. Kavitäten zweimal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers in der Kavität von 20 Sekunden** muss bei allen drei Waschschrritten eingehalten werden (siehe technische Hinweise – ELISA, Seite 8).

- 4a. Je 100 µl Inkubationspuffer in die Kavitäten A1 und A2 pipettieren (Blank).
Je 100 µl Kalibrator A in die Kavitäten B1 und B2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator B in die Kavitäten C1 und C2 pipettieren etc.
- 4b. Je 100 µl Kontrolle Tief und Hoch in die Kavitäten G1 und G2, sowie H1 und H2 pipettieren.
- 4c. Je 100 µl der verdünnten Proben in Doppelbestimmung in die nächsten Kavitäten pipettieren.

5. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm 30 + 5 Minuten bei 18-28°C inkubieren (siehe technische Hinweise – ELISA, Seite 8).
6. Abdeckfolie entfernen, die Kavitäten entleeren und 3x mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen (siehe Technische Hinweise – ELISA, Seite 8). Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzym-Marker zu allen Kavitäten zugeben.
8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm 30 ± 5 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen, die Kavitäten entleeren und **fünfmal** mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: TMB-Substratlösung vor dem Gebrauch auf 18-28°C erwärmen.

10. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiterplatte zudecken und 15 ± 2 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und vorhandene Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen. Innerhalb der nächsten 30 Minuten bei 450 nm messen.
13. Optische Dichte in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

MESSBEREICH 10 – 600 µg/g

Eichkurve: Optische Dichte aller Kavitäten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte den Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnen und den Mittelwert des Blankes von demjenigen der Kalibratoren subtrahieren. Korrigierte Absorptionsmittelwerte (Y-Achse) gegen die Calprotectin Konzentration der Kalibratoren (x-Achse) auf semi-logarithmischen (lin/log) Papier auftragen. Optimale Eichkurve (best fitting curve) zeichnen oder mit einem vier Parameter Algorithmus (4PL) auswerten.

Proben und Kontrollen: Optische Dichte wird bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte den Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnen und den Mittelwert des Blankes von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahieren. Die Calprotectin Konzentration der Proben und Kontrollen aus der Eichkurve ablesen, indem der Netto-Absorptionsmittelwert auf der Eichkurve aufgetragen wird und die entsprechende Calprotectin Konzentration auf der x-Achse bestimmt wird.

Wenn Sie die „Lower Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das ELISA Protokoll eingegeben werden: **10, 30, 100, 300 und 600 µg Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren müssen mit den Ergebnissen multipliziert werden, um die Endergebnisse zu erhalten.**

In Table 16 und Figure 1 sind Beispiele für Ergebnisse und Standardkurve angegeben. *Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.*

LEISTUNGSMERKMALE

ELISA ANLEITUNG - UNTERER MESSBEREICH 10 – 600 µg/g

Intra-Assay Precision: 4.7 %. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von je

drei extrahierten Stuhlproben im gleichen Ansatz welcher entsprechend der Arbeitsanleitung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Table 17 dargestellt.

Inter-Assay Precision: <15 %. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Messung von 5 extrahierten Stuhlproben. Die Aliquots wurden getestet entsprechend der Testanleitung in 10 verschiedenen Läufen durchgeführt von drei Laboranten unter Verwendung von 2 Kit Lots in zwei Labors. Die Ergebnisse sind in Table 18 dargestellt.

Analytische Sensitivität: <10 µg/g. Zwanzig Doppelmessungen mit Inkubations-Puffer wurden in einem Testansatz getestet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte ermittelt. Die kleinste Nachweisbare Menge wurde berechnet durch Interpolation vom Mittelwert plus zwei Standardabweichungen auf der erhaltenen Eichkurve und liegt klar unter dem Kalibrator A (10 µg/g).

Funktionelle Sensitivität: <10 µg/g. Zehn verschiedene Stuhlproben mit Werten zwischen 5.2 und 1254 µg/g Calprotectin wurden gleich wie in der Intra-Assay Präzision in Doppelansätzen 20-fach gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten wurden für jede Probe berechnet. Das daraus entstandene Präzisionsprofil in Figure 2 zeigt, dass innerhalb des gesamten Standardbereichs (10-600 µg/g) ausreichend präzise gemessen werden kann.

Verdünnungslinearität: 103 %. Sieben Stuhlproben mit erhöhten Calprotectin Konzentrationen wurde gemäss der Arbeitsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Inkubationspuffer verdünnt, und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Werte sind in Table 19 dargestellt.

Wiederfindung: 100 %. Zwei extrahierte Stuhlproben wurden mit verdünntem Humanserum mit unterschiedlichen Konzentrationen an nativem Calprotectin versetzt. Die Proben wurden vor und nach Zugabe des verdünnten Serums entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 20 angegeben.

Kreuzreaktivität: <0.1%. Inkubationspuffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem MRP8 oder MRP14 versetzt und entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Table 25.

LEISTUNGSMERKMALE

ELISA ANLEITUNG - ERWEITERTER MESSBEREICH

30 – 1800 µg/g

Lassen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur von 18-28°C äquilibrieren.

Der Messbereich kann um einen Faktor von 3 erweitert werden, wenn die Proben statt 1:50 1:150 verdünnt werden. Diese Testversion wird empfohlen, wenn Calprotectinkonzentrationen oberhalb von 600 µg/g erwartet werden. Die Präzision und Sensitivität des Assays lassen dieses Verfahren zu.

1. Verdünnen Sie die Stuhlproben 1:150 mit Inkubationspuffer (z.B. 20 µl Extrakt und 2980 µl Inkubationspuffer) und mischen Sie gut. **Achtung: Verdünnen Sie nur die Stuhlproben, Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig.** Lassen Sie die Proben bei 18-28°C mindestens 5 Minuten stehen, bevor Sie mit Schritt 4c fortfahren.
2. Eine Mikrotiterplatte mit ausreichenden Streifen für die Bestimmung von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben bestücken. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und **unverzüglich** mit Trockenmittel einpacken und gekühlt lagern.

3. Kavitäten zweimal mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: Eine minimale Inkubationszeit des

Waschpuffers in der Kavität von 20 Sekunden muss bei allen drei Waschschrritten eingehalten werden (siehe technische Hinweise - ELISA).

- 4a. Je 100 µl Inkubationspuffer in die Kavitäten A1 und A2 pipettieren (Blank).
Je 100 µl Kalibrator A in die Kavitäten B1 und B2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator B in die Kavitäten C1 und C2 pipettieren etc.
- 4b. Je 100 µl Kontrolle Tief und Hoch in die Kavitäten G1 und G2, sowie H1 und H2 pipettieren.
- 4c. Je 100 µl der verdünnten Proben in Doppelbestimmung in die nächsten Kavitäten pipettieren.
5. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm mindestens 30 + 5 Minuten bei 18-28°C inkubieren (siehe technische Hinweise – ELISA, Seite 8).
6. Abdeckfolie entfernen, die Kavitäten entleeren und 3x mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen (**siehe Technische Hinweise – ELISA**). Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzym-Marker zu allen Kavitäten zugeben.
8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm 30 ± 5 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen, die Kavitäten entleeren und **fünfmal** mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: TMB-Substratlösung vor dem Gebrauch auf 18-28°C erwärmen.

10. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiterplatte zudecken und 15 ± 2 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und vorhandene Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen. Innerhalb der nächsten 30 Minuten bei 450 nm messen.
13. Optische Dichte in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

MESSBEREICH 30 – 1800 µg/g

Eichkurve: Optische Dichte aller Kavitäten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert. Korrigierte Absorptionsmittelwerte (Vertikalachse) gegen die Calprotectin Konzentration der Kalibratoren (x-Achse) auf einem semi-logarithmischen (lin/log) Papier auftragen. Optimale Eichkurve (best fitting curve) zeichnen oder mit einem vier Parameter Algorithmus (4PL) automatisch auswerten.

Proben und Kontrollen: Optische Dichte wird bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der Netto-Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blankes von dem der Proben und Kontrollen subtrahiert. Die Calprotectin Konzentration der

Proben und Kontrollen aus der Eichkurve ablesen, indem der Netto-Absorptionsmittelwert auf der Eichkurve aufgetragen wird und die entsprechende Calprotectin Konzentration auf der x-Achse bestimmt wird.

Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante benutzen, müssen Sie die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das ELISA Protokoll eingeben: **30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g Calprotectin.**

In Table 21 und Figure 3 sind Beispiele für Ergebnisse und Standardkurve angegeben. *Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.*

LEISTUNGSMERKMALE

MESSBEREICH: 30 – 1800 µg/g

Intra-Assay Präzision: 4.0 %. Die Intra-Assay Präzision wurde entsprechend der Arbeitsanleitung bestimmt als Mittelwert von 20 Wertepaaren von 3 extrahierten Stuhlproben in einem Lauf. Die Ergebnisse sind in Table 22 dargestellt.

Inter-Assay Präzision: <15 %. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Messung von 5 extrahierten Stuhlproben. Die Aliquots wurden getestet entsprechend der Testanleitung in 10 verschiedenen Läufen durchgeführt von drei Laboranten unter Verwendung von 2 Kit Lots in zwei Labors. Die Ergebnisse sind in Table 23 dargestellt.

Funktional Sensitivität: <30 µg/g. Achtzehn Stuhlproben mit Werten zwischen 10.8 and 2080 µg/g Calprotectin wurden 20mal in einem Assay bestimmt. Der % CV und der Mittelwert wurde für jede Probe bestimmt. Als funktionelle Sensitivität die Calprotectinkonzentration bei 15% CV definiert. Das Präzisionsprofil erlaubt präzise Messungen über den gesamten Standardbereich von 30 bis 1800 µg/g. ie Ergebnisse sind in Figure 4 dargestellt.

Verdünnungslinearität: 102 %. Fünf Stuhlproben mit erhöhten Calprotectin Konzentrationen wurden gemäss der Arbeitsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Inkubationspuffer verdünnt, und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. The erwarteten Werte wurden gemäss der beobachteten Werte der 1. Verdünnung berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Table 24 dargestellt.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Bestimmung von Calprotectin aus Stuhlproben ist eine verlässliche und einfache Art organische von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen zu unterscheiden.

In einer klinischen Studie wurde von 401 Patienten, bei denen zuvor eine endoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, Calprotectin im Stuhl untersucht. Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 273 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 128 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen).

Die ROC Analyse (AUC: 0.935) ergab einen optimalen klinischen Cut off von 50 µg/g Calprotectin. Bei Anwendung dieses Grenzwertes kann eine klinische Spezifität von 84.4% und eine Sensitivität von 94.5% erreicht werden (Publikation in Vorbereitung). (siehe Table 26).

Calprotectin Werte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (8).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Normalwerte unter 50 µg/g:

Calprotectin Werte <50 µg/g schliessen eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes weitgehend aus. Bei niedrigen Calprotectinwerten bedarf es in der Regel keiner

invasiven Untersuchungen, um die Ursache der Erkrankung zu bestimmen (12).

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 µg/g:

Calprotectin Werte zwischen 50 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Da eine geringe Entzündungsaktivität vorhanden ist, empfehlen sich eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectin Werte > 200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch Gastroenterologen und therapeutische Massnahmen werden empfohlen.

Der für Erwachsene empfohlene Cut-off Wert von 50 µg/g kann auch für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden, unabhängig von deren Geschlecht (9).

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Arbeitsanleitung ist für den erfolgreichen Einsatz des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung von GLP (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für Calprotectin gibt, wird empfohlen, einen Pool von positiven Stuhlextrakten als interne Qualitätskontrolle mitzuführen.

Alle Kontrollen müssen im angegebenen Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem Kit beiliegenden QC Datenblatt angegeben.

Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Punkte zu überprüfen: i) Pipetten, Thermometer und Uhren/Laborwecker, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Reagenzien, die mit diesem Kit geliefert werden sind für die Messung von humanem Calprotectin in extrahierten Stuhlproben optimiert.
- Calprotectin Werte aus Stuhlproben sollen als zusätzliche Information für den behandelnden Arzt dienen, um eine Diagnose erstellen zu können.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse Calprotectine ELISA des Laboratoires BÜHLMANN a été conçue pour l'extraction et la détermination quantitative de calprotectine (MRP8/14; S100A8/S100A9) humaine dans les échantillons de selles (1-3).

PRINCIPE DU DOSAGE

Après une extraction rapide avec un volume de selles et 49 volumes de tampon d'extraction, ce dosage permet la mesure sélective de l'antigène calprotectine au moyen d'un ELISA de type „sandwich“. Les puits de la microplaque sont recouverts d'un anticorps monoclonal de capture (Acm), anticorps hautement spécifique aux complexes hétérodimériques et polymériques de calprotectine (4-5). Les calibrateurs, les contrôles et les extraits de selles sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Après une étape de lavage, le second anticorps (Ac) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) se fixe à la molécule de calprotectine liée à l'Acm. Après une incubation et un lavage, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. La réaction enzymatique permet d'obtenir une coloration bleue. Elle est stoppée par l'ajout d'une solution acide (H₂SO₄). La couleur bleue vire au jaune. La mesure de l'absorbance à 450 nm est directement proportionnelle à la concentration de calprotectine.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Tampon d'extraction	3 flacons de 125 ml	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Microplaque Coatée avec un Acm anti-Calprotectine	8 x 12 puits	B-CAL-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de lavage concentré 10x Avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B- CAL -WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation Avec conservateurs	2 flacons de 125 ml	B- CAL -IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A-E^{1) 2)} Calprotectine dans un tampon protéique avec conservateurs	5 flacons de 1 ml	B-CAL-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé³⁾ Sérum humain avec conservateurs	2 flacons de 1 ml	B-CAL-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-Calprotectine conjugué à la HRP	1 flacon de 12 ml	B- CAL -EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB Solution de TMB dans un tampon citrate	1 flacon de 12 ml	B-TMB12	Prêt à l'emploi
Solution stop 0.25 M H ₂ SO ₄	1 flacon de 12 ml	B-ST512	Prêt à l'emploi corrosif

Table 7

¹⁾ Les concentrations effectives des calibrateurs A à E sont respectivement de 4, 12, 40, 120 et 240 ng/ml de Calprotectine. Durant l'extraction, une dilution de 1:50 de l'échantillon est effectuée, suivie d'une seconde dilution de 1:50 de l'extrait au cours de l'ELISA. A fin de tenir compte de ces deux étapes de dilution dans les calculs de concentration finale les calibrateurs, pour la procédure domaine de valeurs basses (voir page 15) utilisez les concentrations de calibrateurs A à E suivantes : **10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de Calprotectine.**

²⁾ Pour la procédure ELISA étendue (voir page 16) utilisez les concentrations de calibrateurs A à E suivantes dans le mode opératoire du lecteur de microplaques correspondant : **30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de Calprotectine.**

³⁾ Les concentrations en Calprotectine humaine native des contrôles varient en fonction des lots. Veuillez vous référer à la fiche additionnelle de QC pour les concentrations effectives.

REACTIFS FOURNI SELONS LA DEMANDE

Tubes d'extraction de selles

Smart-Prep	50 tubes, spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubes consistant en tube, cône & embout du doseur	B-CAL-SOFI
	1.3 ml, prête à l'emploi	

Table 8

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts/ non entamés	
Stables à 2-8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts/ reconstitués	
Tampon d'extraction	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Tampon de lavage	Stable à 2-8°C durant 6 mois après dilution
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption
Calibrateurs	
Contrôles	
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	
Solution stop	

Table 9

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Les barrettes de la microplaque, les calibrateurs et les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VHC anti-VIH1/2. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA. *En conséquence, tous les échantillons ainsi que les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux.* Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (GLP) en respectant les précautions d'usage.

Solution stop: La solution stop (B-ST5) contient de l'acide sulfurique. Cette substance irrite les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Procédure d'extraction

- Anses d'inoculation jetables de 10 µl (Sarstedt: # 86.1562.010)
- Tubes de 15 ml en polypropylène avec bouchons à visser (Sarstedt: #62.554.502) pour la procédure d'extraction standard ou tubes d'extraction (voir ci-dessous).
- Station de travail sous flux laminaire
- Mixer vortex Multi- tubes
- Balance de précision (10-150 mg)
- Micro centrifugeuse

Procédure de l' ELISA

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 10 µl, 100 et 1000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Eprouvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage (voir Remarques Techniques).
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques (voir Remarques Techniques).
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La mise en oeuvre de la procédure nécessite 50 à 100 mg d'échantillon natif de selles pour chaque extraction.

Le prélèvement de selles se fait dans des tubes ordinaires. Elles se conservent au réfrigérateur à 2-8°C jusqu'à 6 jours et au congélateur à -20°C jusqu'à 6 mois.

La congélation des échantillons peut entraîner une légère augmentation des valeurs de la Calprotectine due à la présence des Neutrophiles dans l'échantillon. En conséquence, pour une conservation plus longue, il est recommandé de garder les extraits à -20°C. Les extraits sont stables pendant au moins 4 mois.

Important: Les échantillons doivent être prélevés sans additifs.

REMARQUES TECHNIQUES

- **Les puits de la microplaque** peuvent être recouverts de **résidus** formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.

Extraction:

- Dans le but d'obtenir des résultats quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'intégralité des selles pesées dans le tampon d'extraction. Il convient également d'éviter de contaminer le bouchon du tube. Les substances non dissoutes (non digérées) peuvent persister dans les tubes après l'extraction.
- Une certaine turbidité de la solution peut être constatée à l'issue de la courte étape de centrifugation de 5 minutes (extraction). Elle peut être évitée en prolongeant le temps de centrifugation mais n'a cependant aucune influence sur les résultats quantitatifs de l'ELISA.

Procédure de l' ELISA

- **Le lavage** est un point important de l'ELISA. Pour garantir la reproductibilité des résultats il est nécessaire que le tampon de lavage **incube à chaque fois un minimum de 20 secondes** dans les puits de la plaque.
- Bühlmann recommande, lors de l'utilisation d'un **laveur de plaque automatique**, le choix du mode "Plaque" avec lequel chaque étape (remplissage/aspiration) est effectuée sur toute la plaque avant de passer à l'étape suivante. De cette façon le temps d'incubation minimum est garanti.
- **Il est obligatoire de respecter le nombre de cycle de lavage** pour l'obtention de résultats fiables.
- Le temps d'incubation de l'étape 5 ne doit pas être inférieur à 30 minutes pour assurer l'interaction complète entre l'antigène et l'anticorps. Des temps d'incubation un peu plus longs (jusqu' à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- **L'agitateur de plaque** doit être réglé entre 400-600 rpm (<10 Hz). Une fréquence de rotation supérieure peut avoir

pour conséquence une faible linéarité de dilution pour les valeurs comprises entre 300/900 et 600/1800 µg/g. Le mode orbital est préférable au mode réciproque.

- L'enzyme (HRP) utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est hautement sensible à l'azote de sodium, au thimérolal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de bonne qualité.
- Il est recommandé de mesurer chaque contrôle et chaque échantillon **en double** à chaque fois qu'un dosage est effectué. Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que celui du calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte pour le calcul de la concentration effective. Les cycles de congélation/décongélation répétés des échantillons et des réactifs doivent être évités.

PROCEDURE

Procédure d'extraction standard (voir page 31)

1. Marquer et peser les tubes en polypropylène avec l'anse jetable.
2. Prélever 50 à 100 mg d'échantillon de selles décongelées au moyen de l'anse d'inoculation et transférer l'anse dans le tube pré-pesé.
3. Déterminer la quantité nette d'échantillon, casser l'anse et laisser sa partie inférieure dans le tube.
4. Ajouter le tampon d'extraction (49 fois le volume pesé) dans le tube et le fermer.

Pesée des selles [mg]	Volume [ml] de tampon d'extraction
50	2.5
55	2.7
60	2.9
65	3.2
70	3.4
75	3.7
80	3.9
85	4.2
90	4.4
95	4.7
100	4.9

5. Homogénéiser l'échantillon au moyen du vortex Multi-tubes en agitant vigoureusement (à vitesse maximale) durant 30 minutes. Si on utilise le tube d'extraction de selles Roche, l'extraction peut être réduite à 1 minute.
6. Transférer l'homogénat obtenu dans un tube Eppendorf de 2 ml puis centrifuger dans une micro centrifugeuse durant 5 minutes à 3000 x g.
7. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA ou conserver les extraits à une température ≤-20°C pendant au moins 4 mois.

Procédure d'extraction à l'aide des tubes d'extraction de selle (voir page 31).

L'extraction est décrite et illustrée dans le manuel d'utilisation fourni avec les tubes d'extraction respectif.

1. Tubes d'extraction de selles Roche (Code 10745804 322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD): la durée de l'extraction (vortexage) peut être réduite à 1 minute.
2. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SOFI): les tubes d'extraction sont préremplis avec le tampon d'extraction. L'extraction (vortexage) dure environ 10 minutes.

Après extraction centrifuger les tubes 5 minutes à 3000 x g. L'extrait peut aussi être transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml et centrifugé à l'aide d'une micro-centrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g.

Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA ou conserver les extraits à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 4 mois.

Vous trouverez les brochures respectives sur notre site web à l'adresse suivante:

<http://www.buhlmannlabs.ch/core/inflammation/calprotectin/>

PROCEDURES ELISA

Le dosage peut être mis en œuvre selon les procédures ELISA standard ou étendue. Le choix dépend de la concentration en Calprotectine des échantillons. Pour les échantillons dont la concentration ne dépasse pas 600 $\mu\text{g/g}$, suivez la procédure en diluant l'échantillon à 1:50 (entre 10 et 600 $\mu\text{g/g}$). Voir page 14.

Si la concentration des échantillons tend à dépasser 600 $\mu\text{g/g}$, suivez la procédure étendue en diluant l'échantillon à 1:150 (entre 30 et 1800 $\mu\text{g/g}$). Voir page 15.

PROCEDURE DOMAINE DE VALEURS BASSES

Plage de mesure - 10 - 600 $\mu\text{g/g}$

Veillez à ce que les réactifs atteignent la température ambiante de 18-28°C avant de les utiliser

1. Diluer les extraits de selles au 1:50^{ème} avec du tampon d'incubation (ex : 20 μl d'extrait dans 980 μl de tampon d'incubation) puis bien mélanger. Laisser reposer les échantillons dilués à température ambiante (18-28°C) au moins 5 minutes avant de passer à l'étape 4c (pipetage).
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du support et les placer **immédiatement** au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.
3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 μl de tampon de lavage. Vider les puits et taper énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: le tampon de lavage doit incuber un minimum de 20 secondes dans les puits et ceci pour chacune des trois étapes de lavage (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA)

- 4a. Distribuer 100 μl de tampon d'incubation en double dans les puits A1+A2 (blanc).

Distribuer 100 μl de calibrateur A en double dans les puits B1+B2.

Distribuer 100 μl de calibrateur B en double dans les puits C1+C2 etc.

- 4b. Distribuer 100 μl de contrôles bas et élevé en double dans les puits G1+G2 et H1+H2.

- 4c. Distribuer 100 μl de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.

5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incuber à 18-28°C pendant 30 + 5 minutes sur un agitateur de microplaque réglé à 400-600 rpm (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA, page 13)
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chaque puits trois fois, avec au moins 300 μl de tampon de lavage (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA). Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Ajouter 100 μl de marqueur enzymatique dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber à 18-28°C durant 30± 5 minutes sur un agitateur de microplaques réglé à 400-600 rpm.
9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver les puits **cinq fois** avec au moins 300 μl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: laisser le substrat TMB atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 μl de substrat TMB dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber sur l'agitateur à 400-600 rpm pendant 15± 2 minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 μl de solution stop acide dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 au cours des 30 minutes suivantes.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

RESULTATS

PLAGE DE MESURE - 10 - 600 $\mu\text{g/g}$

Courbe d'étalonnage : mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque puits contenant calibrateurs et blanc. Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs et noter les valeurs calculées d'absorption moyenne corrigée. Reporter l'absorbance (axe vertical) contre la concentration de Calprotectine des calibrateurs (axe horizontal) sur du papier millimétré semi-logarithmique (lin/log). Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à quatre paramètres.

Echantillons et contrôles : mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon et de chaque contrôle. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorptions moyennes nette. Reporter la valeur d'absorbance nette de l'échantillon sur l'axe vertical de la courbe d'étalonnage. Reporter l'absorbance nette de l'échantillon sur la courbe d'étalonnage et lire la concentration de Calprotectine correspondante sur l'axe horizontal. Si vous optez pour la procédure domaine de valeurs basses, utilisez les concentrations de calibrateurs suivantes dans le mode du lecteur de microplaques correspondant : **10, 30, 100, 300, 600 $\mu\text{g/g}$. Les résultats doivent être multipliés par le ou les éventuels facteurs de dilution supplémentaires pour obtenir les résultats finaux.**

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans le Table 16 (résultats) et la Figure 1 (courbe d'étalonnage). *Ces résultats et cette courbe d'étalonnage*

ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau jeu d'échantillons à doser.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

PLAGE DE MESURE - 10 - 600 µg/g

Précision Intra-Essai: 4.7%. Elle est obtenue à partir des résultats de 20 paires de valeurs de 3 d'échantillons de selles extraits, au cours d'un même essai. Les données sont répertoriées dans la Table 17.

Inter-Essai: <15 %. La précision entre dosages moyenne de l'ELISA est calculée sur 5 échantillons extraits de selles. Les prélèvements sont testés selon la procédure de dosage dans 10 analyses distinctes, par trois techniciens, en utilisant deux lots de kit dans deux laboratoires différents. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 18.

Sensibilité Analytique: <10 µg/g. 20 doubles de tampon d'incubation furent analysés au cours d'un même essai. La valeur moyenne et la déviation standard furent calculées pour les valeurs d'absorbance obtenues. La plus petite concentration détectable de Calprotectine fut définie clairement définie inférieure au Calibrateur A (10 µg/g) en ajoutant 2 déviations standard à l'absorbance moyenne et en reportant la valeur obtenue sur la courbe d'étalonnage générée lors d'un nouvel essai.

Sensibilité fonctionnelle : <10 µg/g. 10 échantillons différents de selles présentant des concentrations de Calprotectine comprises entre 5.2 et 1254 µg/g furent analysés 20 fois en double en intra-essai. Le % de CV et les valeurs moyennes furent calculées pour chaque échantillon. La sensibilité fonctionnelle observée est de l'ordre de 15 % de CV. Le profil de précision résultant (Figure 1) permet une mesure précise dans la gamme standard entière de 10 à 600 µg/g.

Linéarité de la dilution : 103 %. 7 échantillons de selles présentant des valeurs de Calprotectine élevés furent extraits selon la procédure usuelle. Les extraits furent dilués avec du tampon d'incubation puis analysés selon le protocole standard. Les valeurs attendues furent calculées à partir des résultats obtenus lors de la première dilution. Elles sont présentées dans la Table 19.

Test de récupération : 100 %. 2 échantillons de selles extraits furent additionnés de différentes concentrations de Calprotectine diluée native contenant du sérum humain. Les échantillons furent analysés selon la procédure standard avant, puis après l'addition de Calprotectine. Les données obtenues sont présentées dans la Table 20.

Réactions croisées : <0.1 %. Le tampon d'incubation fut additionné respectivement de différentes concentrations des 2 monomères recombinant MRP8 et MRP14 puis analysé selon la procédure standard. Les données obtenues sont présentées dans la Table 25.

procédure Elisa étendue

PLAGE DE MESURE 30 - 1800 µg/g

Laissez les réactifs s'équilibrer à 18-28 °C avant utilisation.

La plage de mesure est multipliée par un facteur 3 si vous diluez les échantillons à 1:150 au lieu de 1:50. Cette procédure est recommandée lorsque des concentrations élevées en Calprotectine sont attendues. L'extension de plage de mesure du kit est possible grâce à la précision et à la linéarité de ce dosage.

1. Diluez les extraits de selles à 1:150 dans le tampon d'incubation, en utilisant par exemple 20 µL d'extrait

pour 2980 µL de tampon d'incubation. Mélangez vigoureusement. **Remarque : seuls les extraits de selles doivent être dilués. Les étalons et les contrôles doivent être utilisés tels quels.** Laissez les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du support et les placer **immédiatement** au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.
3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et taper énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: le tampon de lavage doit incuber un minimum de 20 secondes dans les puits et ceci pour chacune des trois étapes de lavage (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA)

4a. Distribuer 100 µl de tampon d'incubation en double dans les puits A1+A2 (blanc).

Distribuer 100 µl de calibrateur A en double dans les puits B1+B2.

Distribuer 100 µl de calibrateur B en double dans les puits C1+C2 etc.

4b. Distribuer 100 µl de contrôles bas et élevé en double dans les puits G1+G2 et H1+H2.

4c. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.

5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incuber à 18-28°C pendant 30 + 5 minutes sur un agitateur de microplaque réglé à 400-600 rpm (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA)

6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chaque puits trois fois, avec au moins 300 µl de tampon de lavage (se référer aux remarques techniques, procédure de l'ELISA). Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

7. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique dans tous les puits.

8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber à 18-28°C durant 30± 5 minutes sur un agitateur de microplaques réglé à 400-600 rpm.

9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver les puits **cinq fois** avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: laisser le substrat TMB atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.

11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber sur l'agitateur à 400-600 rpm pendant 15±2 minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.

12. Ajouter 100 µl de solution stop acide dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 au cours des 30 minutes suivantes.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

RESULTATS

PLAGE DE MESURES 30 - 1800 µg/g

Courbe d'étalonnage : mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque puits contenant calibrateurs et blanc. Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs et noter les valeurs calculées d'absorption moyenne corrigée. Reporter l'absorbance (axe vertical) contre la concentration de Calprotectine des calibrateurs (axe horizontal) sur du papier millimétré semi-logarithmique (lin/log). Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression à quatre paramètres.

Échantillons et contrôles : enregistrez l'absorbance à 450 nm de chaque puits d'échantillon et de témoin. Faites la moyenne de chaque couple de résultats. Soustrayez la moyenne des puits de blanc. Notez les moyennes obtenues, qui correspondent à l'absorbance moyenne corrigée. Repérez la valeur d'absorbance corrigée de l'échantillon sur l'axe vertical. Tracez une droite horizontale coupant la courbe d'étalonnage. Lisez la concentration en Calprotectine sur l'axe horizontal. Si vous optez pour la procédure plage de mesure étendue utilisez les concentrations de calibrateurs suivantes dans le mode du lecteur de microplaques correspondant : **30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g**.

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans la Table 21 (résultats) et la Figure 3 (courbe d'étalonnage). *Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau jeu d'échantillons à doser.*

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

PLAGE DE MESURE : 30 - 1800 µg/g

Précision intra-essai : 4,0 %. La précision intra-dosage moyenne est calculée à partir des résultats de 20 couples de valeur provenant de trois échantillons extraits de selles dosés au cours d'une analyse unique, selon la procédure de dosage. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 22.

Précision inter-essai : < 15 %. La précision entre dosages moyenne de l'ELISA est calculée sur 5 échantillons extraits de selles. Les prélèvements sont testés selon la procédure de dosage dans 10 analyses distinctes, par trois techniciens, en utilisant deux lots de kit dans deux laboratoires différents. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 23.

Sensibilité fonctionnelle : < 30 µg/g. 18 échantillons de selles de concentrations en Calprotectine comprises entre 10.8 et 2080 µg/g sont analysés 20 fois en double au cours d'un dosage unique. Le CV en % et la moyenne sont calculés pour chaque échantillon. La sensibilité fonctionnelle est calculée comme étant la concentration de Calprotectine à un CV de 15 %. Le profil de précision obtenu démontre que les mesures sont précises dans toute la plage d'étalonnage entre 30 et 1800 µg/g. Les résultats sont représentés sur la Figure 4.

Linéarité de la dilution : 102 %. Cinq échantillons de selles de concentration en Calprotectine supérieure à la normale sont prélevés selon la procédure de dosage. Les extraits sont dilués dans le tampon d'incubation avant d'être dosés selon la procédure de dosage. Les valeurs attendues sont calculées à partir de la valeur observée déterminée à la première dilution. Les résultats sont répertoriés dans la Table 24.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La méthode d'estimation de Calprotectine dans les selles est fiable et facile à utiliser pour différencier les maladies

gastro-intestinales organiques des maladies gastro-intestinales fonctionnelles.

Dans une étude clinique, 401 patients symptomatiques consécutifs, programmés pour une coloscopie, ont été examinés (publication en préparation). L'examen endoscopique a montré que 273 patients présentent des maladies fonctionnelles alors que 128 patients présentent des maladies organiques diverses (colites, de Crohn, ulcères, diverticules, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses).

L'analyse de la courbe ROC (AUC: 0.935) montre une valeur seuil clinique optimale à 50 µg/g. En appliquant cette valeur seuil, une sensibilité clinique et une spécificité, respectivement, de 84.4% et 94.5%, ont été atteintes dans la différenciation des maladies organiques et fonctionnelles (voir Table 26).

La concentration de Calprotectine dans les selles est comparable chez les adultes et les enfants, tandis qu'elle peut augmenter de façon significative chez les nouveaux-nés (8).

Ces données confortent les recommandations suivantes pour l'interprétation des résultats :

Valeurs normales inférieures à 50 µg/g :

Des valeurs de Calprotectine <50 µg/g excluent une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les patients ayant une faible concentration de Calprotectine fécale ne nécessitent donc pas d'intervention invasive pour déterminer la cause de l'inflammation (12).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g :

Des valeurs de Calprotectine entre 50 et 200 µg/g peuvent avoir pour origine une maladie organique telle qu'une inflammation causée par les AINS, une diverticulite non sévère ou un syndrome de l'intestin irritable en phase de rémission. En présence d'une inflammation de faible intensité il est recommandé de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200 µg/g :

Les valeurs de Calprotectine >200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires et de mettre en place un traitement curatif sous le suivi de médecins spécialistes.

La valeur seuil proposée pour les adultes (50 µg/g) peut également être utilisée comme référence chez les enfants âgés de 4 à 17 ans, quel que soit le sexe (9).

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas d'extraction Calprotectine de référence commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool des extractions positifs et négatifs comme référence interne et contrôle qualité.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres

suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

ITALIANO

USO

Il Kit BÜHLMANN Calprotectina ELISA è inteso per l'estrazione e la determinazione quantitativa della Calprotectina umana (MRP8/14; S100A8/S100A9) nei campioni di feci (1-3).

LIMITATIONS

- Les réactifs fournis dans ce coffret sont optimisés pour le dosage de Calprotectine dans les échantillons de selles.
- Les valeurs de Calprotectine des selles doivent être considérées comme des indications supplémentaires et permettre au médecin de poser un diagnostic.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Dopo una rapida procedura di estrazione in cui si utilizzano una parte di feci e 49 parti di tampone di estrazione, il test consente la misurazione selettiva dell'antigene Calprotectina attraverso un saggio sandwich ELISA. Un anticorpo monoclonale a cattura (mAb) altamente specifico rispettivamente per i complessi eterodimerici e dimerici di Calprotectina. (4-5), è coattato alla micropiastra. Incubare calibratori, controlli e estratti del paziente per 30 min a temperatura ambiente. Dopo un passaggio di lavaggio un secondo anticorpo (Ab) coniugato con ossidasi di rafano (HRP) rileva le molecole di Calprotectina legate all'anticorpo monoclonale coattato alla piastra. Dopo incubazione ed ulteriore lavaggio, viene aggiunto il substrato TMB (tetrametilbenzidina). Durante l'incubazione i pozzetti si colorano in blu e in seguito all'aggiunta di soluzione stoppante acida, il colore cambia in giallo e l'assorbanza viene misurata a 450 nm.

REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone per estrazione	3 flaconi 125 ml	B-CAL-EX	Pronto all'uso
Micropiastra Precoattata con anti-calprotectina mAb	Pozzetti da 12 x 8	B-CAL-MP	Pronto all'uso
Foglio Sigillante per la piastra	3 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-CAL-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di Incubazione Con conservanti	2 flaconi 125 ml	B-CAL-IB	Pronto all'uso
Calibratori dalla A-E¹⁾² Calprotectina in una matrice tampone con conservanti	5 flaconi 1 ml	B-CAL-CASET	Pronto all'uso
Controllo Basso / Alto³⁾ Matrice di siero umano con conservanti	2 flaconi 1 ml	B-CAL-CONSET	Pronto all'uso
Marcatore Enzimatico Anti-Calprotectina Ab coniugato con HRP	1 flacone 12 ml	B-CAL-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB- TMB in un tampone citrato	1 flacone 12 ml	B-TMB12	Pronto all'uso
Soluzione Stoppante Acido Solforico 0.25 M	1 flacone 12 ml	B-ST512	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 10

¹⁾ La concentrazione effettiva degli standard da A ad E è rispettivamente di 4, 12, 40, 120, 240 ng/ml di Calprotectina. Durante l'estrazione si verifica una diluizione del campione 1:50 seguita da una diluizione aggiuntiva 1:50 degli estratti per la misurazione nell'ELISA. Per considerare queste diluizioni nel calcolo finale, nella procedura ELISA a basso range (vedi pag. 19) si dovranno usare le concentrazioni: **10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di Calprotectina.**

²⁾ Se invece si utilizza la procedura ELISA range esteso (vedi pag. 20) si dovranno utilizzare le seguenti concentrazioni: **30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g di Calprotectina.**

³⁾ I controlli contengono quantità lotto specifiche di Calprotectina umana. Per le concentrazioni effettive far riferimento al foglio aggiuntivo QC.

REAGENTI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di estrazione di feci

Smart-Prep	50 dispositivi, spatule et camere di raccolta feci	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore	B-CAL-SOFI
	1.3 ml, Pronto all' uso	

Table 11

CONSERVAZIONE E DURATA

Reagenti sigillati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone per estrazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza
Micropiastra	Riporre immediatamente le strip non utilizzate nella busta di alluminio che contiene l'essiccante e risigillarle. Conservarle fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di Lavaggio	Conservare fino a 6 mesi a 2-8°C.
Tampone di Incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Calibratori	
Controlli	
Marcatore Enzimatico	
Substrato-TMB	
Soluzione Stoppante	

Table 12

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Le strip, i Calibratori e i Controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascuna unità di siero utilizzata nella preparazione dei componenti del kit è stata testata da un metodo approvato dall'FDA e trovata negativa per l'Antigene di Superficie dell'HBV, per gli Anticorpi Anti-HCV ed Anti-HIV 1 e 2. Benché questi metodi siano altamente accurati, non esistono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'Epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere infezioni.* Tutti i prodotti contenenti materiali di origine umana, devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle buone pratiche di laboratorio utilizzando idonee precauzioni.

Soluzione Stoppante: la Soluzione Stoppante (B-ST5) contiene acido solforico. Questo reagente è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. Indossare indumenti protettivi, guanti e protezioni per gli occhi. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Procedura di estrazione

- Anse per inoculazione da 10 µl (Sarstedt: # 86.1562.010)
- Provette di polipropilene con tappi a vite da 15 ml (Sarstedt: #62.554.502) necessarie per procedura di estrazione standard o sistemi di estrazione (vedi sopra).
- Cappa a flusso laminare
- Vortex per provette
- Bilancia di Precisione (10-150 mg)
- Microcentrifuga

Procedura del dosaggio ELISA

- Pipette di precisione da 10 µl, 100 µl e 1000 µl con puntali monouso.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene, per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro 1000 ml per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.

- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il Tampone di Lavaggio (cf. Avvertenze Procedurali).
- Rotatore per micropiastra (cf. Avvertenze Procedurali)
- Carta da blotting
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede da 50 a 100 mg di campione di feci per ogni estrazione.

Prelevare il campione di feci in provette o contenitori e conservare refrigerato a 2-8°C fino a 6 giorni.

Il congelamento dei campioni può determinare un incremento delle concentrazioni di Calprotectina dovuto alla presenza dei neutrofili nel campione.

Quindi, per tempi superiori di conservazione, si consiglia di mantenere gli estratti a -20°C. Gli estratti sono stabili a ≤ 20°C per quattro mesi almeno.

Attenzione: Il campione deve essere prelevato senza alcun additivo chimico o biologico presente nel dispositivo di raccolta.

AVVERTENZE PROCEDURALI

- **Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).

Estrazione

Per ottenere risultati quantitativi è importante omogeneizzare l'intero campione di feci pesato, nel tampone di estrazione. Evitare la contaminazione nella parte alta del dispositivo – componenti non solubili (non digerite) possono ancora trovarsi nel dispositivo dopo l'estrazione.

- La breve fase di centrifuga di 5 minuti durante l'estrazione può determinare una soluzione torbida. La torbidità può essere evitata con una centrifugazione più lunga ma sembra non influenzare la determinazione quantitativa nell'ELISA.

Procedura del dosaggio ELISA

- Nella procedura del dosaggio ELISA, **i passaggi del lavaggio** sono essenziali per garantire la riproducibilità dei risultati. **Un tempo minimo di incubazione di almeno 20 secondi** del tampone di lavaggio nei pozzetti, deve essere eseguito in ogni passaggio.
- Usando un lavatore automatico, Bühlmann suggerisce vivamente di usare il "PLATE MODE" ossia erogazione/aspirazione sequenziale su tutte le strip, così che il tempo minimo di incubazione sia garantito.
- **E' importante che il numero di lavaggi consigliato sia rispettato** per assicurare la riproducibilità dei risultati
- Per assicurare la reazione completa tra antigene/ anticorpo, il periodo d'incubazione nel passaggio nr. 5 deve essere di almeno 30 minuti. Un'incubazione più lunga (fino a 5 minuti) non influenza la procedura.
- **L'agitatore per le micropiastre** deve essere regolato ad una velocità tra 400 - 600 rpm (<10 Hz). Una frequenza di rotazione superiore potrebbe causare una scarsa linearità nelle diluizioni per valori tra 300/900 e 600/1800 µg/g. Il movimento circolare dell'agitatore è preferibile a quello latero-laterale.
- L'enzima usato come marcatore è inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarburi aromatici che spesso si trovano nei rifornimenti d'acqua di laboratorio .Di

conseguenza usare solo acqua deionizzata di elevata qualità.

- Si consiglia di dosare ogni controllo e campione **in duplicato** ogni volta che viene eseguito un test. Dal momento che le condizioni variano da saggio a saggio, si deve creare una nuova curva standard ogni volta che viene eseguito un nuovo dosaggio. Si consiglia un allineamento verticale.
- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del Calibratore più alto (Calibratore E), il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone d'Incubazione e dosato ancora secondo procedura. Il fattore di diluizione applicato dovrà essere preso in considerazione per i calcoli finali.

PROCEDURA DI DOSAGGIO

Procedura d'estrazione standard (fare riferimento a pagina.31)

1. Etichettare e pesare (tarare) la provetta di polipropilene vuota insieme all'ansa per inoculazione.
2. Prelevare da 50 a 100 mg del campione di feci mediante l'ansa per inoculazione e metterlo in una provetta prepesata.
3. Calcolare il peso netto del campione, spezzare l'ansa per inoculazione e lasciare la parte bassa dell'ansa nella provetta.
4. Aggiungere il Tampone per Estrazione (49 il volume del peso) alla provetta e chiuderla:

Peso delle Feci [mg]	Volume [ml] del Tampone per Estrazione
50	2.5
55	2.7
60	2.9
65	3.2
70	3.4
75	3.7
80	3.9
85	4.2
90	4.4
95	4.7
100	4.9

5. Omogenizzare il campione in un vortex per provette scuotendo vigorosamente (velocità massima) per 30 minuti. Se si utilizza la provetta d'estrazione per feci Roche o BÜHLMANN l'estrazione si può ridurre a 1 minuto.
6. Trasferire il composto omogeneizzato in una provetta eppendorf da 2 ml e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3'000 x g
7. Trasferire il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire la procedura ELISA o conservare il materiale estratto a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ fino a 4 mesi.

Procedure di estrazione con utilizzo di sistemi di estrazione delle feci (fare riferimento a pagina 31)

La procedura di estrazione è descritta e illustrata nelle istruzioni per l'uso fornite assieme ai rispettivi sistemi di estrazione.

1. Sistema di estrazione delle feci Roche (Codice: 10745804 322) o BÜHLMANN Smart-Prep (Codice: B-CAL-RD): È possibile ridurre il tempo di estrazione (con vortex) a 1 minuto.

2. ScheBo® Quick-Prep™ (Codice: B-CAL-SOFI): Le provette di estrazione sono pre-riempite con tampone di estrazione. Il tempo di estrazione è di circa 10 minuti.

Dopo l'estrazione, centrifugare le provette per 5 minuti a 3000 g. Alternativamente, trasferire l'omogenato in una provetta di Eppendorf da 2 ml e centrifugare in microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g.

Decantare il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire con la procedura ELISA o conservare il materiale estratto a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ per almeno 4 mesi.

Le rispettive brochure sono pubblicate sul sito Web: <http://www.buhlmannlabs.ch/core/inflammation/calprotectin/>

PROCEDURA ELISA

Il dosaggio può essere effettuato con le seguenti procedure: procedura ELISA a basso range o a range esteso. La scelta dell'una o dell'altra procedura dipende dalla concentrazione di Calprotectina attesa dei campioni. Per campioni fino a 600 $\mu\text{g/g}$ scegliere la procedura a basso range e utilizzare una diluizione del campione di 1:50 (range di misurazione 10 – 600 $\mu\text{g/g}$) (fare riferimento a pagina 20).

Se le concentrazioni dei campioni tendono a superare i 600 $\mu\text{g/g}$, scegliere la procedura a range esteso e utilizzare una diluizione del campione di 1:150 (range di misurazione 30 – 1800 $\mu\text{g/g}$) (fare riferimento a pagina 20).

PROCEDURA BASSO RANGE

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 $\mu\text{g/g}$

Prima dell'uso lasciare che i reagenti raggiungano i 18-28°C

1. Diluire l'estrazione di feci 1:50 con il Tampone d'Incubazione (ad esempio 20 μl d'estratto e 980 μl di tampone d'incubazione) e miscelare bene. Lasciare equilibrare i campioni diluiti almeno 5 minuti a 18-28°C prima di procedere al punto 4c.
2. Preparare una piastra con le strip sufficienti per il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Rimuovere le strip in eccesso dal contenitore, eliminare le strip in eccesso e risigillarle immediatamente nella busta di alluminio con l'essiccante. Conservarle refrigerate.
3. Lavare i pozzetti coattati due volte usando almeno 300 μl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

Importante: per i tre passaggi di lavaggio con il tampone di lavaggio, **un tempo di incubazione minimo di 20 secondi deve essere assicurato** (vedi avvertenze procedurali, pagina 18)

- 4a. Dispensare 100 μl di Tampone d'Incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2.

Dispensare 100 μl del Calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2.

Dispensare 100 μl del Calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2 etc.

- 4b. Dispensare 100 μl di Siero di Controllo Basso e Alto in duplicato nei pozzetti G1+G2 e H1+H2

- 4c. Dispensare 100 μl di ogni campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.

5. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm e incubare per 30 + 5 minuti a 18-28°C (vedi avvertenze procedurali – Procedura del dosaggio ELISA, pagina 18).
 6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto (vedi avvertenze procedurali – Procedura del dosaggio ELISA, pagina 18). Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.
 7. Dispensare 100 µl di Marcatore enzimatico in ogni pozzetto.
 8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e posizionarla su un mixer settato a 400-600 rpm ed incubare per 30 ± 5 minuti a 18-28°C.
 9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare **cinque volte** usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.
- Importante:** lasciare che la soluzione di substrato TMB raggiunga 18-28°C.
10. Dispensare 100 µl di Soluzione di Substrato TMB in tutti i pozzetti.
 11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm, proteggendola dalla luce diretta ed incubarla per 15 ± 2 minuti a 18-28°C.
 12. Dispensare 100 µl di Soluzione di Bloccaggio in tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con un puntale. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.
 13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

RISULTATI

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 µg/g

Curva Standard: registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni calibratore e pozzetto bianco. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Tracciare l'assorbanza (asse verticale) vs. la concentrazione di Calprotectina dei calibratori (asse orizzontale) usando carta per grafici semilogaritmica lin/log. Disegnare la curva migliore o calcolare la curva standard usando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e Controlli: registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni campione e pozzetto di controllo. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Individuare il valore d'assorbanza corretto del campione sull'asse verticale, disegnare una linea orizzontale che intersechi la curva standard e leggere la concentrazione Calprotectina sull'asse orizzontale. Utilizzando la procedura ELISA a basso range, si dovrà far riferimento alle seguenti concentrazioni di calibratori: **10, 30, 100, 300 e 600 µg/g** di Calprotectina.

Ulteriori fattori di diluizione devono essere moltiplicati con i risultati per ottenere i risultati finali.

Per dati di riferimento vedere Table 16 e Figure 1 (risultati e curva standard). *Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Deve essere generata una curva standard per ogni set di campioni.*

CARATTERISTICHE DEL TEST

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 µg/g

Precisione Intra-Saggio: 4.7 %. La precisione intra-saggio è stata calcolata sui risultati di 20 duplicati di valori da 3 campioni di estratto fecale, dosati in un'unica seduta secondo la procedura del saggio. I valori sono presentati in Table 17.

Precisione Inter-Saggio: <15 %. La precisione inter-saggio (media) della procedura ELISA è stata calcolata su 5 campioni di estratti fecali. Le aliquote sono state dosate, con la procedura prevista per il dosaggio, in 10 diverse sedute da tre tecnici, utilizzando 2 lotti del kit in due diversi laboratori. I valori sono presentati in Table 18.

Sensibilità Analitica: <10 µg/g. Venti duplicati di Tampone d'Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La media deviazione standard è stata calcolata per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile di Calprotectina è stata calcolata nettamente al disotto del Calibratore A (10 µg/g) aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media e intersecando questo valore con la curva standard ottenuta in una nuova seduta.

Sensibilità Funzionale: <10 µg/g. Dieci diversi campioni di feci con valori tra 5.2 e 1254 µg/g di Calprotectina sono stati misurati 20 volte in duplicato. La % del CV ed i valori medi sono stati calcolati per ciascun campione. La sensibilità funzionale è stata osservata al 15 % del CV. Il profilo di precisione osservato (Figure 2) permette dosaggi accurati entro la gamma standard da 10 a 600 µg/g.

Linearità di Diluizione: 103 %. Sette campioni di feci con valori elevati di Calprotectina sono stati prelevati secondo la procedura del saggio. L'estratto è stato diluito con Tampone d'Incubazione e successivamente dosato secondo il protocollo. I valori attesi sono stati calcolati dai valori osservati con la prima diluizione. I valori sono presentati in Table 19.

Rilevazione da inoculo: 100 %. Due campioni di feci sono inoculati con diverse quantità di siero umano contenente Calprotectina. I campioni sono stati misurati prima e dopo l'aggiunta a secondo la procedura. I valori sono presentati in Table 20.

Cross-reattività: <01 %. I Tamponi d'Incubazione addizionati con diverse quantità di MRP8 e MRP14 ricombinante sono stati dosati secondo la procedura. I valori sono presentati in Table 25.

PROCEDURA ELISA A RANGE ESTESO

RANGE DI MISURAZIONE 30 – 1800 µg/g

Prima dell'uso lasciare che i reagenti raggiungano i 18-28 °C.

Il range di misurazione può essere esteso di un fattore 3 se si diluiscono i campioni 1:150 invece di 1:50. Questa procedura è raccomandata qualora si prevedano concentrazioni elevate di Calprotectina. La precisione e la linearità del saggio consentono questa estensione del range del kit.

1. Diluire gli estratti fecali 1:150 con tampone di incubazione (ad esempio 20 µl di estratto e 2980 µl di tampone di incubazione) e mescolare bene. **N.B.:** diluire solo gli estratti fecali. Gli standard e i controlli sono pronti all'uso. Lasciare stabilizzare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere al passaggio 4c.
2. Preparare una piastra con le strip sufficienti per misurare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Rimuovere le strip in eccesso dal contenitore, eliminare le

strip in eccesso e risigillarle immediatamente nella busta di alluminio con l'essiccante. Conservarle refrigerate.

3. Lavare i pozzetti coattati due volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

Importante: per i tre passaggi di lavaggio con il tampone di lavaggio, **un tempo di incubazione minimo di 20 secondi deve essere assicurato** (vedi avvertenze procedurali)

- 4a. Dispensare 100 µl di Tampone d'Incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2.

Dispensare 100 µl del Calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2.

Dispensare 100 µl del Calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2 etc.

- 4b. Dispensare 100 µl di Siero di Controllo Basso e Alto in duplicato nei pozzetti G1+G2 e H1+H2

- 4c. Dispensare 100 µl di ogni campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.

5. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm e incubare per 30 + 5 minuti a 18-28°C (vedi avvertenze procedurali – Procedura del dosaggio ELISA, pagina 18).

6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto (vedi avvertenze procedurali – Procedura del dosaggio ELISA, pagina 19). Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

7. Dispensare 100 µl di Marcatore enzimatico in ogni pozzetto.

8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e posizionarla su un mixer settato a 400-600 rpm ed incubare per Figure 2 30 ± 5 minuti a 18-28°C.

9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare **cinque volte** usando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

Importante: lasciare che la soluzione di substrato TMB raggiunga 18-28°C.

10. Dispensare 100 µl di Soluzione di Substrato TMB in tutti i pozzetti.

11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, posizionare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm, proteggendola dalla luce diretta ed incubarla per 15 ± 2 minuti a 18-28°C.

12. Dispensare 100 µl di Soluzione di Bloccaggio in tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con un puntale. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.

13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

RISULTATI

RANGE DI MISURAZIONE 30 – 1800 µg/g

Curva Standard: Registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni calibratore e pozzetto bianco. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Tracciare l'assorbanza (asse verticale) vs. la concentrazione di Calprotectina dei calibratori (asse orizzontale) usando carta per grafici

semilogaritmica lin/log. Disegnare la curva migliore o calcolare la curva standard usando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e controlli: Registrare l'assorbanza a 450 nm per ciascun campione e pozzetto di controllo bene. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti dei bianchi e registrare le medie (= assorbanza media corretta). Individuare il valore di assorbanza corretto del campione sull'asse verticale, disegnare una linea orizzontale che intersechi la curva standard e leggere la concentrazione di Calprotectina dall'asse orizzontale.

Se si sceglie la procedura ELISA range esteso, si dovrà far riferimento alle seguenti concentrazioni di calibratori: **30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g** di Calprotectina.

Per dati di riferimento vedere Table 21 e Figure 3 (risultati e curva standard). *Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Deve essere generata una curva standard per ogni set di campioni.*

CARATTERISTICHE DEL TEST

RANGE DI MISURAZIONE: 30 – 1800 µg/g

Precisione Intra-Saggio: 4,0 %. La precisione intra-saggio (media) è stata calcolata a partire dai risultati di 20 duplicati da 3 campioni di estratti fecali dosati in una singola seduta secondo la procedura del saggio. I valori sono presentati in Table 22.

Precisione Inter-Saggio: <15 %. La precisione inter-saggio (media) della procedura ELISA è stata calcolata da 5 campioni di estratti fecali. Le aliquote sono state dosate con la procedura prevista per il dosaggio in 10 diverse sedute da tre tecnici, utilizzando 2 lotti del kit in due diversi laboratori. I valori sono presentati in Table 23.

Sensibilità funzionale: <30 µg/g. 18 campioni di feci con valori di Calprotectina compresi tra 10.8 e 2080 µg/g sono stati analizzati 20 volte in duplicato in un'unica seduta. Per ciascun campione sono stati calcolati il CV in % e i valori medi. La sensibilità funzionale è stata calcolata al 15 % di CV. Il profilo di precisione osservato consente determinazioni precise entro l'intero range standard da 30 a 1800 µg/g. I risultati sono riportati in Figure 4.

Linearità di diluizione: 102 %. Cinque campioni di feci con concentrazioni elevate di Calprotectina sono stati estratti con la procedura prevista per il saggio. Gli estratti sono stati diluiti con tampone di incubazione e successivamente dosati con la procedura prevista per il saggio. I valori attesi sono stati calcolati a partire dal valore osservato rilevato con la prima diluizione. I valori sono presentati in Table 24.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La valutazione della Calprotectina nelle feci è un metodo facile e attendibile, per distinguere tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche.

In uno studio clinico condotto su 401 pazienti sintomatici, la Calprotectina è stata determinata prima di eseguire una colonoscopia (pubblicazione in preparazione). L'esame endoscopico ha mostrato 273 pazienti con malattie gastrointestinali funzionali, mentre 128 pazienti con varie malattie organiche (colite, Crohn's, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, cancro o malattie infettive).

Analisi di curve ROC (AUC 0.935) mostrano un cut-off clinico ottimale ad un valore di 50 µg/g. Applicando questo valore (cut-off), viene raggiunta una sensibilità di 84.4% e specificità clinica di 94.5%. Ciò rende possibile la differenziazione tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche (cf. Table 26).

La concentrazione di Calprotectina nelle feci è comparabile in adulti e bambini, mentre nei neonati può essere significativamente più elevata (8).

Questi dati supportano le seguenti raccomandazioni per l'interpretazioni dei risultati:

Valori normali sotto i 50 µg/g:

I valori di Calprotectina <50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Ai pazienti con campioni con bassi livelli probabilmente non sono necessarie ulteriori procedure invasive per determinare le cause dell'infiammazione (12).

Valori elevati compresi tra i 50 e i 200 µg/g:

I valori di Calprotectina compresi tra i 50 e i 200 µg/g possono rappresentare una debole malattia organica come una infiammazione causata da NSAID, una debole diverticolite e una IBD in fase di remissione. La bassa risposta infiammatoria mostrata in questo range può suggerire di ripetere la misurazione e di effettuare ulteriori investigazioni.

Valori elevate sopra i 200 µg/g:

I valori di Calprotectina > 200 µg/g sono indicativi di una attiva malattia organica con infiammazione nel tratto gastrointestinale. Sono suggerite appropriate ulteriori procedure investigative e curative eseguite da specialisti.

Il cut-off suggerito per gli adulti (50 µg/g) può essere anche usato per i bambini con età compresa tra i 4 e i 17 anni senza differenziazione di sesso (9).

CONTROLLO DI QUALITÀ'

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'utilizzo di precise tecniche di laboratorio (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Dal momento che non esiste un estratto di controllo per Calprotectina in commercio, si consiglia l'uso di un pool di estratti positivi per il controllo di qualità interno.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori di controllo deve rientrare entro determinati limiti di accettabilità del laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e riportati sul Foglio Dati di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e timer ii) settaggio del lettore ELISA, iii) date di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione e di incubazione v) la Soluzione di Substrato TMB deve essere incolore, vi) purezza dell'acqua.

LIMITI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per dosare Calprotectina umana in campioni fecali estratti.
- I valori della Calprotectina nelle feci devono essere utilizzati come dati supplementari utili al medico per formulare una diagnosi.

USO PREVISTO

El kit Calprotectin ELISA de BÜHLMANN está pensado para la extracción y la determinación cuantitativa de la Calprotectina humana (MRP8/14; S100A8/S100A9) en muestras de deposiciones (1-3).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

Después de un procedimiento corto de extracción con un volumen de heces y 49 volúmenes de tampón de extracción, la prueba permite la medición selectiva del antígeno Calprotectina mediante un ELISA intercalado. Un anticuerpo de captura monoclonal (AcMo) altamente específico a los complejos heterodiméricos y poliméricos de Calprotectina (4-5) recubre la Microplaca. Calibradores, controles y los extractos de los pacientes se incuban en la temperatura ambiente por 30 minutos. Después de un paso de lavación un segundo anticuerpo (Ac) de detección conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) detecta las moléculas de Calprotectina unidas al anticuerpo monoclonal que recubre la placa después de un paso de lavado. Tras la incubación y un nuevo paso de lavado se añade tetrametilbenzidina (TMB) (formación de color azul) seguido de una reacción de parada (cambio a color amarillo). La absorción se mide a 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Tampón de extracción	3 botellas 125 ml	B-CAL-EX	Listo para usar
Microplaca recubierta con AcMo anti-Calprotectina	12 x 8 pocillos	B- CAL -MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) concentrado con conserv.	1 botella 100 ml	B- CAL -WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	2 botellas 125 ml	B- CAL -IB	Listo para usar
Calibradores A a E¹⁾²⁾ Calprotectina en una matriz de tampón con conserv.	4 viales 1 ml	B-CAL-CASET	Listo para usar
Control bajo/alto³⁾ Matriz de suero humano con conservantes	2 viales 1 ml	B-CAL-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático Ac anti-Calprotectina conjugado con HRP	1 vial 12 ml	B- CAL -EL	Listo para usar
Substrato de TMB TMB en tampón citrato	1 vial 12 ml	B-TMB12	Listo para usar
Solución de parada Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 12 ml	B- STS12	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 13

¹⁾ Las concentraciones efectivas de los estándares A a E son 4, 12, 40, 120, 240 ng/ml de Calprotectina, respectivamente. Durante la extracción se produce una dilución 1:50 de la muestra, seguida por una dilución adicional 1:50 de los extractos para la medición en el ELISA. Para tener en cuenta esos pasos de dilución para los cálculos finales, los calibradores A a E están como sigue para el procedimiento ELISA de rango bajo (véanse la página 24) : **10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de Calprotectina.**

²⁾ Para el procedimiento ELISA de rango extendido (véanse la página 26) se requiere utilizar las siguientes concentraciones de calibración en el protocolo ELISA respectivo (véanse la página 26) : **30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de Calprotectina.**

³⁾ Los controles contienen cantidades específicas de lote de Calprotectina humana nativa. Ver la hoja de datos de QC adicional para las concentraciones reales.

REACTIVOS SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Tubos d'extracción de heces

Smart-Prep	50 tubos, espátulas y fondos	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción constituyendo di tubo, cono & punta dosificadora	B-CAL-SOFI
	Rellenados con 1.3 ml de tampón de extracción, listo para usar.	

Table 14

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos antes de abrir	
Almacenar a 2-8°C. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón de extracción	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 6 meses a 2-8°C.
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Substrato de TMB	
Solución de parada	

Tabla 15

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las tiras de microtitulación, calibradores y controles de este kit contienen componentes de origen humano. Todas las unidades donadas de suero usadas en la preparación de los componentes del kit han sido analizadas por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

Solución de parada: La solución de parada (B-STTS) contiene ácido sulfúrico. El reactivo puede irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Utilice ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

Procedimiento de extracción

- Asas de inoculación de 10 µl desechables (Sarstedt: # 86.1562.010)
- Tubos de polipropileno de 15 ml con tapa de rosca (Sarstedt: #62.554.502)
- Tubos de polipropileno de 15 ml con tapones de rosca (Sarstedt nº 62.554.502) necesarios para el procedimiento de extracción estándar o los dispositivos de extracción (véase anteriormente).
- Estación de trabajo bajo flujo laminar
- Mezclador vortex multitubo
- Balanza de precisión (10-150 mg)

- Microcentrífuga

Procedimiento de ELISA

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 10 µl, 100 µl y 1000 µl.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado (Véanse Notas del Procedimiento, página 23).
- Agitador de placas de microtitulación (Véanse Notas del Procedimiento).
- Papel secante.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El procedimiento requiere de 50 a 100 mg de muestra de heces nativas para cada extracción.

Recoger la muestra de heces en tubos sencillos y conservarla refrigerada a 2-8°C hasta 6 días.

Durante congelación neutrophiles, cuando presentes en heces pueden causar resultados levemente elevados. Por eso, esta ventajoso guardar los extractos a ≤-20°C para almanecerlos por mas tiempo. Los extractos son estables por lo menos 4 meses

Importante: La muestra debe tomarse sin adición alguna.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

- **Residuos pueden formarse en los pocillos** durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).

Extracción

Para obtener resultados cuantitativos es importante homogenizar toda la muestra de heces pesada en el tampón de extracción. Evitar la contaminación en la parte superior del tubo – tras la extracción puede haber todavía en el tubo componentes insolubles (no digeridos).

- La corta fase de centrifugado de 5 minutos durante la extracción puede provocar una solución turbia. Esa turbiedad puede evitarse mediante un centrifugado más largo, pero no muestra ninguna influencia sobre la determinación cuantitativa en el ELISA.

Procedimiento de ELISA

- En el procedimiento de ELISA **los pasos de lavado** son esenciales para la garantía de resultados reproductivos. Un **rato mínimo de la incubación por lo menos de 20 segundos** del almacenador intermediario de la colada en los pozos se debe asegurar cada vez.
- Usando una **arandela automatizada**, Bühlmann recomienda fuertemente utilizar un "modo supuesto de la placa" ("plate mode") es decir que cada paso de proceso (dispense/aspiration) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso de proceso siguiente. Así, el tiempo mínimo de la incubación está garantizado.
- **Las repeticiones indicadas del lavado son obligatorias** para asegurar resultados reproductivos.
- Asegurar una interacción completa de antígeno/ anticuerpo, **el tiempo de la incubación en el paso 5** no debe ser menos de 30 minutos. Un tiempo moderado más

largo de la incubación (hasta a 5 minutos) no tiene ninguna influencia al resultado final.

- **El Agitador de placas de microtitulación** debe ser ajustado entre 400 y 600 rpm (< 10 Hz). Una frecuencia de rotación más alta puede causar linealidades de dilución pobres en valores entre 300/900 y 600/1800 µg/g. La rotación orbital se debe preferir en vez de sacudir en modo recíproco.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso y clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Se recomienda ensayar cada control y cada muestra **por duplicado** cada vez que se realice una prueba. Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador E), la muestra debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

ROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Procedimiento de extracción estándar (vanse a página.31)

1. Etiquetar y pesar (tarar) el tubo de polipropileno vacío junto con el asa de inoculación.
2. Extraer de 50 a 100 mg de la muestra de heces descongelada mediante el asa de inoculación y colocarlos en el tubo pesado previamente.
3. Calcular la cantidad neta de muestra, romper el asa de inoculación y dejar la parte inferior del asa en el tubo.
4. Añadir tampón de extracción (49 veces el volumen de peso) al tubo y cerrar el tubo:

Peso [mg] de heces	Volumen [ml] de tampón de extracción
50	2,5
55	2,7
60	2,9
65	3,2
70	3,4
75	3,7
80	3,9
85	4,2
90	4,4
95	4,7
100	4,9

5. Homogenizar la muestra en un mezclador vortex multitubo agitándolo con fuerza (velocidad más alta) durante 30 minutos.
6. Trasladar el homogenizado a un tubo eppendorf de 2 ml y centrifugar en microcentrífuga durante 5 minutos a 3'000 x g
7. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado y continuar con el procedimiento ELISA o conservar los extractos a ≤-20°C durante al menos 4 meses.

Procedimientos de extracción utilizando dispositivos de extracción de heces (vanse a página.31)

Procedimientos de extracción utilizando dispositivos de extracción de heces.

El procedimiento de extracción se describe y se ilustra en las instrucciones de uso entregadas con los respectivos dispositivos de extracción.

1. Dispositivo de extracción de heces Roche (código 10745804 322) o BÜHLMANN Smart-Prep (código B-CAL-RD): El tiempo de extracción (vórtex) puede reducirse a 1 minuto.
2. ScheBo® Quick-Prep™ (código B-CAL-SOFI): Los tubos de extracción vienen prellenados con tampón de extracción. El tiempo de extracción es de unos 10 minutos.

Tras la extracción, transfiera el homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 ml y centrifúguelo en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000g.

Decante el sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado y prosiga con el procedimiento ELISA o almacene los extractos a ≤-20 °C durante al menos 4 meses.

Los folletos respectivos están publicados en el sitio web:
<http://www.buhlmannlabs.ch/core/inflammation/calprotectin/>

PROCEDIMIENTOS DE ELISA

El ensayo se puede realizar de acuerdo con los siguientes procedimientos, ELISA de rango bajo o de rango extendido. La elección del tipo de procedimiento depende de la concentración de Calprotectina esperada en las muestras. Para muestras de hasta 600 µg/g se elegirá el procedimiento rango bajo con una dilución de las muestras de 1:50 (intervalo de medición 10 – 600 µg/g) (Véanse la página 24). Si las muestras sobrepasan el nivel de 600 µg/g se debe elegir el procedimiento de rango extendido y usar una dilución de las muestras de 1:150 (intervalo de medición 30 – 1800 µg/g) (Véanse la página 26).

PROCEDIMIENTO ELISA DE RANGO BAJO

INTERVALO DE MÉDICION BAJO 10 – 600 µg/g

Dejar que los reactivos alcancen los 18-28°C antes de su uso

1. Diluir los extractos de heces 1:50 con tampón de incubación (ej. 20 µl de extracto y 980 µl de tampón de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28°C antes del pipeteado de la fase 4c.
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidos. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: para cada de los tres pasos de lavación un rato mínimo de incubación por lo menos de 20 segundos del almacenador intermediario de la colada en los pozos debe ser asegurado (véase las notas procesales - procedimiento de ELISA, página 23).

- 4a. Pipetee 100 µl de tampón de incubación por duplicado en los pocillos A1+A2.

Pipetee 100 µl de calibrador A por duplicado en los pocillos B1+B2.

Pipetee 100 µl de calibrador B por duplicado en los pocillos C1+C2 etc.

4b. Pipetee 100 µl del Control sérico bajo y alto por duplicado en los pocillos G1+G2 y H1+H2.

4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.

5. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 + 5 minutos a 18-28°C (vea las notas procesales - procedimiento de ELISA, página 23).

6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo (vea las notas procesales - procedimiento de ELISA, página 23). Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

7. Pipetee 100 µl de marcador enzimático en todos los pocillos.

8. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28°C.

9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos **cinco veces** utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.

10. Pipetee 100 µl de solución sustrato de TMB en todos los pocillos.

11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ± 2 minutos a 18-28°C.

12. Pipetee 100 µl de solución de parada en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.

13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

INTERVALO DE MÉDICION BAJO 10 – 600 µg/g

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y del blanco. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Represente la absorbancia (eje vertical) frente a la concentración de Calprotectina de los calibradores (eje horizontal) utilizando un papel gráfico logarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de las muestras y de los controles. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Localice el valor de la absorbancia corregida de la muestra en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de Calprotectina en el eje horizontal.

Para el procedimiento ELISA de rango bajo los calibradores A a E están como sigue en el protocolo ELISA respectivo: **10, 30, 100, 300 y 600 µg/g** de Calprotectina.

Otros factores adicionales de dilución tienen que multiplicarse por los valores de los resultados a fin de obtener los valores finales.

Véanse Table 16 y Figure 1 de datos característicos (resultados y curva de calibración). *Estos resultados y la curva de calibración se proveen solamente para propósitos de demostración. La curva de calibración se tiene que confeccionar para cada grupo de muestras a analizar.*

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

INTERVALO DE MÉDICION BAJO 10 – 600 µg/g

Precisión Intraensayo: 4.7 %. La precisión intraensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 3 muestras de heces extraídas ensayadas en un solo ciclo, según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en la Table 17.

Precisión interensayo: <15 %. La precisión (media) interensayo del ELISA se calculó para cinco muestras de extractos de heces. Las alícuotas se analizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo con 10 repeticiones diferentes por tres técnicos laboratoristas usando 2 lotes de kits en dos laboratorios distintos. Los valores se presentan en la Table 18.

Sensibilidad Analítica: <10 µg/g. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en un único ciclo. Se calculó la desviación de estándar y media para los valores de absorbancia. Se calculó que la dosis mínima detectable de Calprotectina era claramente debajo de Calibrador A (10 µg/g) añadiendo dos desviaciones estándar a la absorbancia media y cruzando este valor con la curva estándar obtenida en un nuevo ciclo.

Sensibilidad Funcional: <10 µg/g. 10 distintas muestras de heces, con valores de entre 5.2 y 1254 µg/g de Calprotectina fueron ensayadas 20 veces en duplicados, como un intraensayo. Se calcularon para cada muestra el %CV y los valores medios. Se observó la sensibilidad funcional a 15 %CV. El perfil de precisión (Figure 2) que resulta permite la medida exacta dentro la gama estándar a partir de 10 a 600 µg/g.

Linealidad de la Dilución: 103 %. Se procedió a la extracción de siete muestras de heces con elevados valores de Calprotectina, según el procedimiento del ensayo. Los extractos fueron diluidos con tampón de incubación y posteriormente ensayados de acuerdo con el protocolo. Los valores esperados fueron calculados a partir del valor observado obtenido con la primera dilución. Los valores se presentan en la Table 19.

Recuperación de Spiking: 100 %. Dos muestras de heces extraídas fueron sometidas a *spiking* con distintas cantidades de suero humano nativo diluido que contenía Calprotectina. Las muestras fueron medidas antes y después del *spiking* según el procedimiento de ensayo. Los valores se presentan en la Table 20.

Reactividad cruzada: <0.1 %. Tampón de incubación con distintas cantidades de MRP8 y MRP14 recombinantes fue medido según el procedimiento de ensayo. Los valores se presentan en Table 25.

PROCEDIMIENTO ELISA DE RANGO EXTENDIDO

INTERVALO DE MEDICIÓN 30 – 1800 µg/g

Antes de usar los reactivos deje que se adapten a una temperatura de 18-28°C.

El intervalo de medición se puede extender en un factor de 3 si se diluyen las muestras a 1:150 en lugar de 1:50. Este procedimiento es el recomendado si se esperan concentraciones altas de Calprotectina. La precisión y la linealidad del ensayo hacen posible esta extensión del intervalo de medición del kit de análisis.

Diluir los extractos de heces a 1:150 con buffer de incubación (p. ej. 20 µl de extracto y 2980 µl buffer de incubación) y mezclar bien. **NOTA: Diluir solamente los extractos de heces. Los estándares y los controles están listos para el uso.** Dejar que las muestras se estabilicen durante al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar con el paso 4c.

1. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidos. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
2. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: para cada de los tres pasos de lavación un rato mínimo de incubación por lo menos de 20 segundos del almacenador intermediario de la colada en los pozos debe ser asegurado (véase las notas procesales - procedimiento de ELISA página 24).

4a. Pipetee 100 µl de tampón de incubación por duplicado en los pocillos A1+A2.

Pipetee 100 µl de calibrador A por duplicado en los pocillos B1+B2.

Pipetee 100 µl de calibrador B por duplicado en los pocillos C1+C2 etc.

4b. Pipetee 100 µl del Control sérico bajo y alto por duplicado en los pocillos G1+G2 y H1+H2.

4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.

5. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 + 5 minutos a 18-28°C (vea las notas procesales - procedimiento de ELISA, página 24).
6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo (vea las notas procesales - procedimiento de ELISA). Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
7. Pipetee 100 µl de marcador enzimático en todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28°C.
9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos **cinco veces** utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.

10. Pipetee 100 µl de solución sustrato de TMB en todos los pocillos.
11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ± 2 minutos a 18-28°C.
12. Pipetee 100 µl de solución de parada en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

INTERVALO DE MEDICIÓN 30 – 1800 µg/g

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y del blanco. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Represente la absorbancia (eje vertical) frente a la concentración de Calprotectina de los calibradores (eje horizontal) utilizando un papel gráfico logarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles: Determinar la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de muestra y control. Promediar los valores hechos por duplicado, restar el valor medio de los pocillos blancos y anotar los promedios (=absorbancia promedio corregida). Localizar el valor de la absorbancia corregida de la muestra en el eje vertical, trazar una línea horizontal que corte la curva de calibración y en el punto de intersección leer el valor de la concentración de Calprotectina en el eje horizontal.

Para el procedimiento ELISA de rango extendido requiere usar para los calibradores A a E las siguientes concentraciones en el protocolo ELISA respectivo: **30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g** de Calprotectina. Véanse Table 21 y Figure 3 de datos característicos (resultados y curva de calibración). *Estos resultados y la curva de calibración se proveen solamente para propósitos de demostración. La curva de calibración se tiene que confeccionar para cada grupo de muestras a analizar.*

CARACTERÍSTICAS DE EFICACIA

INTERVALO DE MEDICIÓN: 30 – 1800 µg/g

Precisión intraensayo: 4.0 %. La precisión (media) intraensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 3 muestras de extractos de heces, procesados en un solo análisis de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en la Table 22.

Precisión interensayo: <15 %. La precisión (media) interensayo del ELISA se calculó a partir de 5 muestras de extractos. Las alícuotas se analizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo en 10 repeticiones diferentes por parte de tres técnicos laboratoristas usando 2 lotes de kits en dos laboratorios distintos. Los valores se presentan en la Table 23.

Sensibilidad funcional: <30 µg/g. 18 muestras de heces con valores de Calprotectina entre 10.8 y 2080 µg/g se midieron 20 veces por duplicado en un ensayo. Se calcularon el coeficiente de variabilidad (CV) y los valores medios para cada muestra. La sensibilidad funcional fue calculada en base a la concentración de Calprotectina a 15 % del CV. El perfil de

la precisión resultante permite una medición precisa en todo el rango estándar, o sea de 30 hasta 1800 µg/g. Los resultados se presentan en la Figure 4.

Linealidad de la dilución: 102 %. Cinco muestras de heces con concentraciones elevadas de Calprotectina fueron extraídas de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Los extractos se diluyeron con buffer de incubación y después se analizaron conforme al procedimiento. Los valores esperados se calcularon a partir del valor encontrado en la primera dilución. Los resultados se presentan en la Table 24.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de Calprotectina en heces esta un método confiable, que lo hace posible de distinguir entre enfermedades orgánicas y enfermedades gastrointestinales funcionales.

En un estudio incluyendo 401 pacientes sintomáticos, Calprotectina fue determinada antes de somerlos a una endoscopia (publicación en preparación). Endoscopia confirmó que 273 pacientes sufrieron de enfermedades funcionales mientras que 128 pacientes tenían varias enfermedades orgánicas (colitis, Morbus Crohn, úlceras, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer, o enfermedades infecciosas).

Una análisis de la curva ROC (AUC: 0.935) resulta en un valor limite óptimo a 50 µg/g. Aplicando esto valor limite la sensibilidad y la especificidad clinica del metodo alcanzo 84,4% y 94,5% respectivamente (véanse Table 26). Eso resulta en una excelente discriminación entre enfermedades orgánicas y funcionales. Por lo tanto, las muestras que exceden el valor límite de 50 µg/g se pueden considerar como positivo y los pacientes deben somerirse a investigaciones invasivas como la colonoscopia y otras métodos para confirmar una inflamación organica.

La concentración de Calprotectina en heces esta comparable en niños y adultos. Entonce se pueden utilizar el valor de corte (50 µg/g), recomendado para adultos, tambien para niños a la edad de 4 hasta 17 años (8). Las concentraciones de Calprotectina en recién nacidos estan considerablemente elevadas (9).

Estos datos respaldan la recomendación siguiente de interpretación de los resultados:

Valores normales por debajo de 50 µg/g:

Los valores de calprotectina <50 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. No es probable que las muestras de pacientes con niveles bajos precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (12).

Valores elevados entre 50 y 200 µg/g:

Los valores de calprotectina entre 50 y 200 µg/g pueden ser representativos de un trastorno orgánico leve tal como inflamación originada por AINE, diverticulitis leve o EII en fase de remisión. La baja respuesta inflamatoria mostrada dentro de ese intervalo puede sugerir la repetición de la medida y la realización de investigaciones adicionales.

Valores elevados por encima de 200 µg/g:

Los valores de calprotectina > 200 µg/g son indicativos de un trastorno orgánico activo con inflamación del tracto gastrointestinal. Sugieren llevar a cabo investigaciones adicionales apropiadas y procedimientos curativos por parte de especialistas.

El nivel de corte sugerido para adultos (50 µg/g) se puede utilizar también para niños de entre 4 y 17 años de edad con independencia del sexo (9).

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

Dado que no hay extracción de control para Calprotectina disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de extracción positivo para el control de calidad interno.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir Calprotectina en heces.
- Los valores de Calprotectina en heces deben utilizarse como datos suplementarios disponibles para el médico para establecer un diagnóstico.

Table 16: Example of Results

	Conc. [μ g/g]	Absorb. [OD]	Calc. Conc. [μ g/g]	CV Conc [%]
Blank Avg.		0.096		
Cal A	10	0.073		
Cal A	10	0.066		
Cal A Avg.	10	0.069		7.2
Cal B	30	0.143		
Cal B	30	0.153		
Cal B Avg.	30	0.148		4.8
Cal C	100	0.465		
Cal C	100	0.456		
Cal C Avg.	100	0.460		1.4
Cal D	300	1.121		
Cal D	300	1.135		
Cal D Avg.	300	1.128		0.9
Cal E	600	1.658		
Cal E	600	1.671		
Cal E Avg.	600	1.664		0.6
Ctrl Low		0.201	41	
Ctrl Low		0.189	39	
Ctrl Low Avg.		0.195	40	4.4
Ctrl High		0.598	134	
Ctrl High		0.583	130	
Ctrl High Avg.		0.590	132	1.8

Table 17: Intra-Assay Precision

Sample	Mean [μ g/g]	SD [μ g/g]	CV [%]
low	52.5	1.4	2.7
medium	173.8	5.6	3.2
high	408.5	33.0	8.1
Mean			4.7

Table 18: Inter-Assay Precision

Sample	Mean [μ g/g]	SD [μ g/g]	CV [%]
Sample 1	18.1	2.5	13.5
Sample 2	44.5	6.4	14.5
Sample 3	74.3	7.9	10.7
Sample 4	227	15.0	6.6
Sample 5	520	57.8	11.1
Mean			11.3

Figure 2: Precision Profile

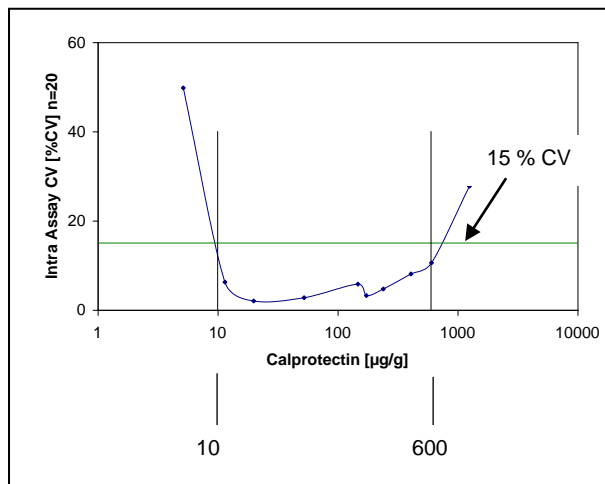
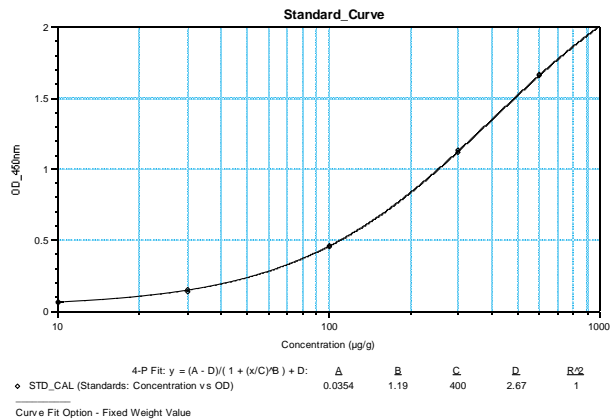


Table 19: Dilution Linearity/Parallelism

Figure 1: Example of a Standard Curve



Sample	Dilution	Observed [μ g/g]	Expected [μ g/g]	O/E [%]
S 1	1:200	405	-	--
	1:400	182	202	90
	1:800	95	101	94
	1:1600	49	51	98
	1:3200	25	25	99
	1:6400	15.6	12.7	123
	1:12800	6.6	6.3	104
Mean				101
S 2	1:50	232	-	--
	1:100	124	116	107
	1:200	61	58	106
	1:400	28	29	96
	1:800	12	15	86
Mean				98
S 3	1:400	290	-	--
	1:800	145	145	100
	1:1600	73	72	100
	1:3200	39	36	106
	1:6400	19	18	103
Mean				103
S 4	Mean			100
S 5	Mean			124
S 6	Mean			88
S 7	Mean			106
Mean				103

Table 20: Spiking Recovery

Sample	μ g/g	spiked with [μ g/g]	Observed [μ g/g]	Expected [μ g/g]	O/E [%]
S 1	5.3	10	13.6	15.3	88.9
		30	33.6	35.3	95.2
		100	101	105	96.1
		150	147	155	94.5
		300	287	305	94.1
		400	468	405	115.4
Mean				97.4	
S 2	24.6	10	32.9	34.6	95.1
		30	49.2	54.6	90.1
		100	139	125	111.5
		150	176	175	100.5
		300	358	325	110.3
		400	467	425	109.9
Mean				103	
Mean				100	

APPENDIX II
TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS
EXTENDED RANGE PROCEDURE 30-1800 µg/g
Example of a Standard Curve

Figure 3

Table 21: **Example of Results**

	Conc. [µg/g]	Absorb. [OD]	Calc. Conc. [µg/g]	CV Conc [%]
Blank Avg.		0.057		
Cal A	30	0.047		
Cal A	30	0.046		
Cal A Avg.	30	0.047		0.9
Cal B	90	0.138		
Cal B	90	0.140		
Cal B Avg.	90	0.139		1.0
Cal C	300	0.464		
Cal C	300	0.452		
Cal C Avg.	300	0.458		1.9
Cal D	900	1.207		
Cal D	900	1.192		
Cal D Avg.	900	1.200		0.8
Cal E	1800	1.627		
Cal E	1800	1.630		
Cal E Avg.	1800	1.629		0.1
Ctrl Low		0.147	105	
Ctrl Low		0.162	115	
Ctrl Low Avg.		0.155	110	6.2
Ctrl High		0.618	396	
Ctrl High		0.618	396	
Ctrl High Avg.		0.618	396	0.6

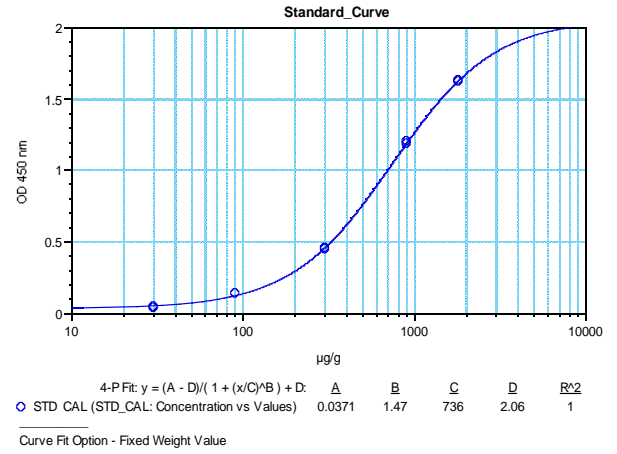


Table 22: **Intra-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
Sample 1	37.7	2.5	6.7
Sample 2	713	20.1	2.8
Sample 3	1246	32.4	2.6
Mean			4.0

Table 23: **Inter-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
Sample 1	75.5	9.7	12.8
Sample 2	225	20	8.8
Sample 3	788	62	7.8
Sample 4	1000	111	11.1
Sample 5	1764	221	12.6
Mean			10.6

Figure 4: **Precision Profile**

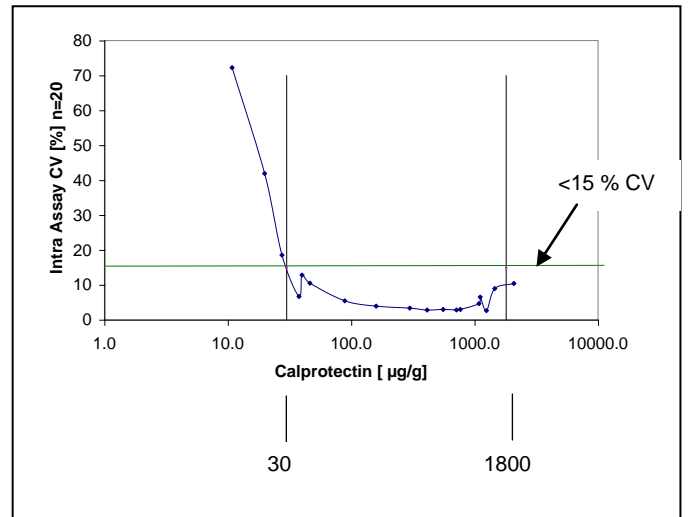


Table 24: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S 1	1:225	2466	-	100
	1:350	1296	1585	82
	1:1200	420	462	91
	1:2400	237	233	102
	1:4800	111	116	96
	Mean			92.6
S 2	1:100	758	-	100
	1:120	702	632	111
	1:150	552	505	109
	1:200	406	379	107
	1:400	210	190	111
	1:800	108	95	114
Mean			111	
S 3	Mean			105
S 4	Mean			101
S 5	Mean			99
Mean All				102

Table 25*

Cross Reactivity

Spiked with	MRP8 [ng/ml]	MRP14 [ng/ml]
100 µg/ml	26.0	38.7
10 µg/ml	8.0	3.4
1 µg/ml	<4.0	<4.0
100 ng/ml	<4.0	<4.0
10 ng/ml	<4.0	<4.0

* Data have been established with the lower range ELISA procedure

Table description: cf. "Results" (pg. 4, 6), "Performance Characteristics" (pg.4, 6) and "Interpretation of Results" (pg. Fehler! Textmarke nicht definiert.).

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (Seite 9), "Leistungsmerkmale" (Seite 10) und "Interpretation der Resultate" (Seite 11).

Explications relatives aux tableaux: voir "Résultats" (page 16, "Caracteristiques de Performance" (page 15, 16) et "Interprétation des Résultats" (page 16).

Descrizione tavola: cf. "Risultati" (pagina 20), "Caratteristiche di Prestazione" (pagina 20, 21) e "interpretazione dei risultati" (pagina 21).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados" (página 25), "Características de Eficiencia" (página 25, 26) y "Interpretaciones de los resultados" (página 27) .

Table 26*

Clinical Study

	Calprotectin (EK-CAL)	Lactoferrin
n	401	391
cut-off	50 µg/g	3 µg/ml
Sensitivity	84.4%	74.2%
Specificity	94.5%	91.0%
PPV	87.8%	79.3%
NPV	92.8%	88.4%
LR+	15.4	0.17
LR-	8.25	0.28

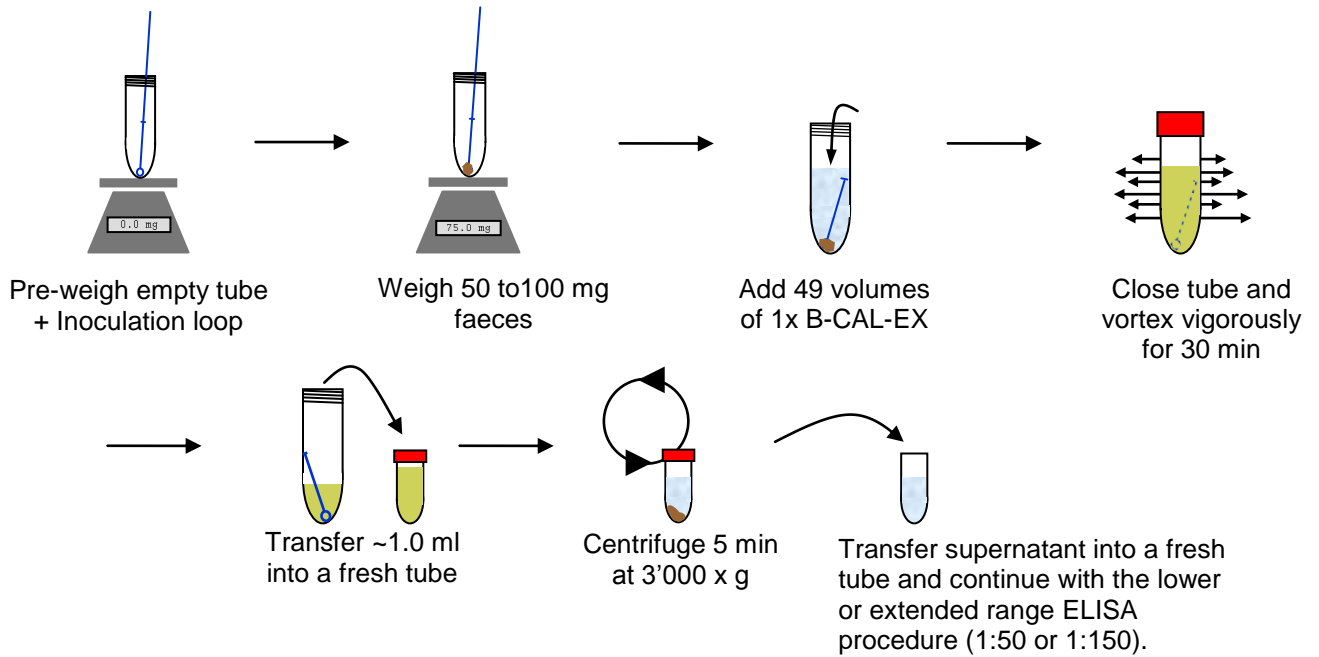
APPENDIX III

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

- Striz I and Trebichavsky I: *Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation*. *Physiol Res*. **53**, 245-253 (2004)
- Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. *Gastroenterol* **123**, 450-460 (2002)
- Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. *Lancet* **356**, 1783-4 (2000)
- Hessian PA and Fisher L: *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure*. *Eur J Biochem* **268**, 353-63 (2001).
- Goebeler M et al.: *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. *Transplantation* **58**, 355-61 (1994).
- Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. *Gut* **47**, 506-513 (2000).
- Wassell J et al.: *Faecal Calprotectin: a new marker for Crohn's disease?* *Ann Clin Biochem* **41**, 230-232 (2004)
- Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis* **12**(6), 524-34 (2006)
- Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **40**, 450-5 (2005)
- Johnson M W et al.: *Faecal calprotectin: a noninvasive diagnostic tool and marker of severity in pouchitis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20** :174-179, (2008)
- Sipponen T et al. *Faecal Calprotectin, Lactoferrin, and Endoscopic Disease Activity in Monitoring Anti-TNF-alpha Therapy for Crohn's Disease*. *Aliment Pharmacol Ther* **28**, 1221–1229, (2008)
- Tschanguizi et al. *Stool Calprotectin as a Marker of inflammation*. Poster at UEGW, 2007
- Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces*. *Tidsskr Nor Lægeforen* **128**, 743–5 (2008)

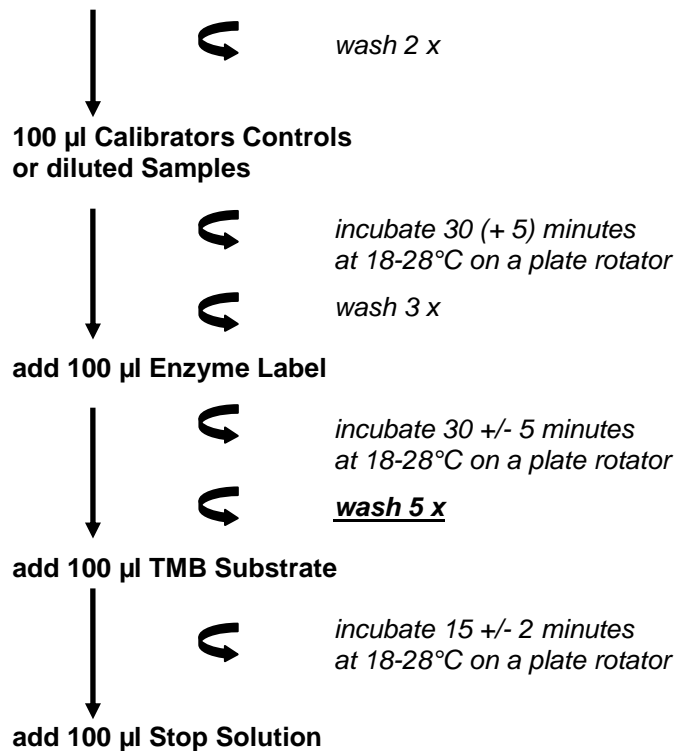
CALPROTECTIN EXTRACTION

Standard Extraction Procedure



CALPROTECTIN ELISA





Precoated Microtiter Plate



➔ Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)

TIME TO RESULT: 75 MINUTES

APPENDIX V
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
BUFEX	Extraction Buffer Extraktions-Puffer Tampon d'extraction Tampone per estrazione Tampón de extracción
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación
CAL A - CAL E	Calibrator A -E Kalibrator A -E Calibreur A -E Calibratore A - E Calibrador A - E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2012-02-01