

PhiCal[®] Calprotectin ELISA Kit

***Zur in vitro Bestimmung von PhiCal[®] Calprotectin
(MRP 8/14) in Stuhl***

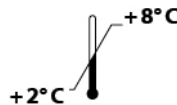
PhiCal[®] Calprotectin ELISA Kit

***For the in vitro determination of PhiCal[®] Calprotectin
(MRP 8/14) in stool***

Gültig ab / Valid from 02.08.2011



K 6927



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

[Not sold in the USA and Norway]



Immundiagnostik AG · Stubenwald-Allee 8a · D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
info@immundiagnostik.com

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30
www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	5
Stuhlprobenextraktion	5
Probenverdünnung	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	7
Testprinzip	7
Pipettierschema	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
Erwartete Ergebnisse	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
Präzision und Reproduzierbarkeit	10
Wiederfindung	10
Analytische Sensitivität	11
Kreuzreaktivität	11
Linearität	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von **PhiCal®** Calprotectin (MRP 8/14) in Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10 (in Maus)

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

MRP8/14: L1, (p8,14), p34

Calprotectin ist ein Calcium-bindendes Protein, das von Neutrophilen und Monozyten gebildet wird. Fäkales Calprotectin ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher und neoplastischer Genese.

Die Unterscheidung zwischen Patienten mit Colon irritabel und solchen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) fällt häufig schwer. Dies führt zu vielen nicht notwendigen Koloskopien. Mittels des Calprotectin-Tests können diese beiden Patientengruppen jetzt deutlich voneinander unterschieden werden. Der Nachweis aus dem Stuhl korreliert sehr gut mit den histologischen und endoskopischen Befunden der Krankheitsaktivität bei *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa*, sowie mit dem bisherigen „Gold-Standard“ für die Aktivitätsbeurteilung bei CED, der Messung der fäkalen Exkretion 111-Indium-markierter neutrophiler Granulozyten. Der Indium-111-Granulozytentest ist jedoch kostenintensiv (Krankenhausaufenthalt, Isotopenbestimmung und Entsorgung) und durch die Radioaktivität belastend für die Patienten. Eine wiederholte Anwendung bei Kindern und Schwangeren ist daher nicht empfehlenswert.

Im Gegensatz zu den bisherigen Standardmarkern für entzündliche Vorgänge (CRP, ESR, HB) zeigen erhöhte Calprotectin-Werte mit größerer Sicherheit ein Rezidiv an. Calprotectin ist damit ein idealer Verlaufsmarker, z.B. bei M. Crohn oder nach Polypenabtragung. Vergleichende Messungen von Calprotectin und okkultem Blut zum Nachweis des Kolonkarzinoms ergaben einen eindeutigen diagnostischen Vorteil für Calprotectin. Der Parameter hat eine hohe negative prädiktive Aussagekraft: Ist der Calprotectin-Spiegel im Stuhl niedrig, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung des Intestinaltrakts vor.

Indikationen

- Entzündungsmarker für akute entzündliche Erkrankungen
- Bewertung des Schweregrads einer Entzündung
- Verlaufsparemeter bei *M. Crohn*, *Colitis ulcerosa* oder nach Polypenabtragung
- Sichere Differenzierung zwischen einer organischen Erkrankung des Intestinaltrakts (chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, infektiöse Erkrankungen, Polypen, Kolonkarzinom) und einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6927MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6927WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6927EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	2 x 90 ml
K 6927PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungsspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6927ST	STD	Calprotectin Standards, lyophilisiert (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6927KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6927KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6927K	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	15 ml
K 6927TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6927AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
 - Laborwaage
 - Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
 - Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
 - Multikanal- bzw. Multipipette
 - Zentrifuge, 3000 x g
 - Vortex-Mixer
 - Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
 - Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm
- * Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≤18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch 1:10 in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung (Waschpuffer)** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Der **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch 1:2.5 mit Reinstwasser verdünnt werden (90 ml EXBUF + 135 ml Reinstwasser). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist **3 Monate** in einem geschlossenen Gefäß bei **2-8 °C** haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert, auf einem Wirbelmischer (Vortexer) 4 Sekunden gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

Der **verdünnte Extraktionspuffer** wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!

- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Proben-vorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

Verdünnung I (1a. oder 1b.):

1:50

Probenverdünnung

Stuhlproben

Die Suspension aus Probenvorbereitung 1a. bzw. 1b. (Verdünnung I) wird **1:50 mit SAMPLEBUF** (Probenverdünnungsspuffer) verdünnt. Zum Beispiel:

20 µl Überstand (Verdünnung I) + 980 µl **SAMPLEBUF** = 1:50 (**Verdünnung II**)

100 µl der Verdünnung II im Test pro Vertiefung einsetzen.

Laut Literatur ist Calprotectin im Stuhl bis zu 6 Tagen stabil. Trotzdem empfehlen wir die Probe nicht länger als 48 Stunden bei 2–8 °C zu lagern. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Gefrorene Proben über Nacht bei 2–8 °C auftauen und am besten vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen.

(Poullis A et al. (2002) Aliment Pharmacol Ther 16:675-681)

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes Calprotectin erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Calprotectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Calprotectin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Calprotectin – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2. Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden
4. 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
5. Streifen abdecken und 30 min. bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
7. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren

8. Streifen abdecken und **30 min.** bei **Raumtemperatur** (18-26°C) inkubieren
9. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
10. **100 µl SUB** (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
11. **10–20 min.** bei **Raumtemperatur** (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
12. **50 µl STOP** (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
13. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm

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

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001). Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Der ermittelte Calprotectin-Wert der Stuhlprobe wird mit **2500** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II).

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Stuhlproben mit hohen Calprotectin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungsspuffer) verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

1g Stuhl entspricht 1ml

- **Der Medianwert von augenscheinlich gesunden Personen beträgt ca. 25 mg/kg.**
- **Proben mit Werten von mehr als 50 mg/kg werden als positiv betrachtet.**

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)		
Probe	Calprotectin [ng/mL]	VK [%]
1	89,2	5,6
2	229,1	3,2

Inter-Assay (n = 12)		
Probe	Calprotectin [ng/mL]	VK [%]
1	107,8	4,4
2	476,1	8,9

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Calprotectin Standardmengen versetzt und gemessen. Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
1	10,5	28,5	29,6
1	17,5	35,3	35,6
1	40,5	57,9	59,3
1	63,3	79,9	83,2
1	173,2	188,1	188,7
2	10,5	31,2	33,3
2	17,5	38,1	41,0
2	40,5	60,6	62,7
2	63,3	82,4	90,8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B0 + 6 \cdot SD$ festgelegt. Gemessen wurde 22 mal der Standard null.

Probe	Calprotectin Mittelwert [OD]	Standardabweichung [SD]	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0,021	0,00188	2,099

* Bei Berücksichtigung der Stuhlprobenverdünnung von 1 : 2500 entspricht einer Konzentration von 5,2475 mg/L.

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Plasmaproteinen gefunden:

Lysozym - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Laktoferrin - 0%

Linearität

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

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	2500	120	120
	5000	60	61,8
	10000	30	32,4
B	2500	116	116
	5000	58	59,4
	10000	29	28,9

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Poullis A et al. (2002) *Aliment Pharmacol Ther* 16:675-681
2. Fagerhol et al. (2000) *The Lancet* 356:1783-1784
3. Tibble et al. (2000) *Gut* 47:506-513
4. Tibble et al. (2000) *Gastro* 119:15-22

Publikationen mit dem Immundiagnostik Calprotectin-ELISA:

1. Langhorst J, Koelzer J, Elsenbruch S, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ (2007) Non-invasive Marker der Entzündungsaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED): Vergleich von Lactoferrin, Calprotectin, PMN-Elastase im Stuhl, Serum-CRP und klinischen Aktivitätsindizes. *Z Gastroenterol* 45: P261
2. Schröder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J (2007) Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* Oct 1;26(7):1035-42
3. Shastri YM, Bergis D, Schäfer V, Povse N, Stein J (2006) Prospective Multicentre double blind randomized controlled trial for predicting microbiological stool culture positivity for acute diarrhea. *Poster presented at Conference of Indian Society of Gastroenterology*, November 7-12, 2006, Mumbai

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

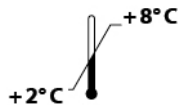
PhiCal[®] Calprotectin ELISA Kit

***For the in vitro determination of PhiCal[®] Calprotectin
(MRP 8/14) in stool***

Valid from 02.08.2011



K 6927



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

[Not sold in the USA and Norway]

Content

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
6. SAMPLE PREPARATION	20
Extraction of the stool sample	20
Dilution of samples	21
7. ASSAY PROCEDURE	21
Principle of the test	21
Test procedure	22
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
Expected values	23
Precision and reproducibility	24
Recovery	24
Analytical Sensitivity	25
Linearity	25
Cross-reactivity	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of **PhiCal®** Calprotectin (MRP (8/14) in stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Alternative names:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10 (in mouse)

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

MRP8/14: L1, (p8,14), p34

Calprotectin is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. Fecal Calprotectin is a marker for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases. It is often difficult to distinguish between irritable bowel syndrome and chronic inflammatory bowel disease. This leads in many cases to extensive and unnecessary colonoscopic examinations. The Calprotectin test allows clear differentiation between the two patient groups. Fecal Calprotectin levels correlate significantly with histologic and endoscopic assessment of disease activity in *Morbus Crohn's* disease and ulcerative colitis as well as with the fecal excretion of indium-111-labelled neutrophilic granulocytes that has been suggested as the "gold standard" of disease activity in inflammatory bowel disease. However, measuring 111-indium-labeled granulocytes is very costly (patient's hospitalization, analysis and disposal of isotopic material) and is connected with radioactive exposition of the patients. For this reason, a repeated application to children and pregnant women is not recommended.

Elevated levels of Calprotectin are a much better predictor of relapse than standard inflammatory markers (CRP, ESR HB). Comparing this marker with standard fecal occult blood screening in colorectal cancer demonstrates clearly the diagnostic advantages of the fecal Calprotectin test. The parameter is of a high diagnostic value: if the Calprotectin level in stool is low, the probability is high that no organic intestinal disease exists.

Indications

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree
- Parameter for monitoring *Morbus Crohn's* disease, *Colitis ulcerosa* or the patient's status after removal of polyps.
- Discrimination between patients with inflammatory bowel disease (acute *Morbus Crohn's* disease and ulcerative colitis) and irritable bowel syndrome when using a fecal test system

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6927MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6927WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6927EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5x	2 x 90 ml
K 6927PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 6927ST	STD	Calprotectin standards, lyophilized (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6927KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6927KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6927K	CONJ	Conjugate, ready to use	15 ml
K 6927TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6927AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

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

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be re-dissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution (wash buffer)** can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (90 ml EXBUF + 135 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37°C in a water bath. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2–8°C for three months**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be re-constituted with **500 µl** of ultra pure water. After the reconstitution, vortex the vial for 4 seconds and allow the pellet to dissolve by a subsequent incubation for 10 minutes to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8°C for four weeks**.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date given on the label when stored at **2–8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the stool sample

Diluted extraction buffer is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

1a. Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) **Fill the empty sample tube with 0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for app. 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)

Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.

Dilution I (1a. or 1b.)**1:50***Dilution of samples***Stool samples**

The suspension of sample preparation procedure 1a. or 1b. (dilution I) is diluted **1:50 with SAMPLEBUF** (sample dilution buffer). For example:

20 µl supernatant (dilution I) + 980 µl **SAMPLEBUF** = 1:50 (**dilution II**)

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant of **dilution II** per well.

Calprotectin in stool is described to be stable for approximately 6 days. Nevertheless, we recommend to store the samples for not more than 48 h at 2-8 °C. Long term storage is recommended at -20 °C. Allow frozen samples to thaw slowly, preferably at 2-8° C over night and warm the samples to room temperature before analysis.

(Poullis A et al. (2002) Aliment Pharmacol Thr 16:675-681)

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site "sandwich" technique with two selected monoclonal antibodies that bind to human Calprotectin.

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human Calprotectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human Calprotectin antibody. During the first incubation step, Calprotectin in the samples is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase labeled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Calprotectin - Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Calprotectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Calprotectin present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Controls) in duplicate on a protocol sheet
3.	Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4.	Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) in duplicate into respective well
5.	Cover plate tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C)
6.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
7.	Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well
8.	Cover plate tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C)
9.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
10.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
11.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
12.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
13.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the „4-Parameter-algorithm“.

1. *4-parameter-algorithm*

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. *Point-to-point-calculation*

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. *Spline-algorithm*

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool samples

To obtain the calprotectin concentration in the stool samples, multiply the obtained result by **2500** (dilution step I x dilution step II).

9. LIMITATIONS

Stool samples with Calprotectin levels greater than the highest standard value, should be diluted with SAMPLEBUF (sample dilution buffer), and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

Normal ranges

1 g stool is equivalent to 1ml

- **The median value in healthy adults is about 25 mg/kg.**
- **Samples giving values above 50 mg/kg are regarded as positive.**

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)		
Sample	Calprotectin [ng/mL]	CV [%]
1	89.2	5.6
2	229.1	3.2

Inter-Assay (n = 12)		
Sample	Calprotectin [ng/mL]	CV [%]
1	107.8	4.4
2	476.1	8.9

Recovery

Two samples were spiked with different Calprotectin standards and measured using this assay. n=2

Sample [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Calprotectin expected [ng/mL]	Calprotectin measured [ng/mL]
1	10.5	28.5	29.6
1	17.5	35.3	35.6
1	40.5	57.9	59.3
1	63.3	79.9	83.2
1	173.2	188.1	188.7
2	10.5	31.2	33.3
2	17.5	38.1	41.0
2	40.5	60.6	62.7
2	63.3	82.4	90.8

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as $B0 + 6 \cdot SD$. The zero-standard was measured 22 times.

Sample	Calprotectin mean value [OD]	Standard variation [SD]	Detection limit [ng/mL]
1	0.021	0.00188	2.099

* Corresponds to 5.2475 mg/L at 1:2500 dilution of the stool sample.

Linearity

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

n= 2

Sample	Dilution	Expected [ng/mL]	Measured [ng/mL]
A	2500	120	120
	5000	60	61,8
	10000	30	32,4
B	2500	116	116
	5000	58	59,4
	10000	29	28,9

Cross-reactivity

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

Lysozyme - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Lactoferrin - 0%

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution contains sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

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

15. REFERENCES

1. Poullis A et al. (2002) *Aliment Pharmacol Ther* 16:675-681
2. Fagerhol et al. (2000) *The Lancet* 356:1783-1784
3. Tibble et al. (2000) *Gut* 47:506-513
4. Tibble et al. (2000) *Gastro* 119:15-22

Publications based on Immundiagnostik's calprotectin ELISA

1. Langhorst J, Koelzer J, Elsenbruch S, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ (2007) Non-invasive Marker der Entzündungsaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED): Vergleich von Lactoferrin, Calprotectin, PMN-Elastase im Stuhl, Serum-CRP und klinischen Aktivitätsindizes. *Z Gastroenterol* 45: P261
2. Schröder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J (2007) Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* Oct 1;26(7):1035-42
3. Shastri YM, Bergis D, Schäfer V, Povse N, Stein J (2006) Prospective Multicentre double blind randomized controlled trial for predicting microbiological stool culture positivity for acute diarrhea. *Poster presented at Conference of Indian Society of Gastroenterology*, November 7-12, 2006, Mumbai

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com