

Calprest®

Test per la determinazione della calprotectina nelle feci.

Per uso diagnostico in vitro.

Campo di applicazione

Calprest è un test immunoenzimatico in colorimetria per la determinazione della calprotectina nelle feci. La nuova soluzione di estrazione permette di estrarre la calprotectina dai campioni fecali secondo il nuovo e migliorato metodo di preparazioni delle feci proposto in questo test [1].

Principio del test

Calprest è un test immunoenzimatico che sfrutta l'uso di anticorpi policlonali diretti contro la calprotectina. La calprotectina presente nel campione diluito viene legata dall'anticorpo adsorbito sulla superficie in plastica dei pozzetti. Gli anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina legano l'antigene e quindi l'enzima catalizza la conversione del substrato in prodotto colorato. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità del coniugato legato e pertanto alla quantità di calprotectina legata. La concentrazione di calprotectina nel campione si calcola usando i calibratori forniti nel kit.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica di Calprest è 6,25 ng/ml, che corrisponde a 15,6 mg calprotectina/kg feci quando il campione è diluito 1:2500.

Materiali forniti

(quantità sufficiente per 96 test)

Pozzetti con anticorpi	12x8
Coperchio per micropiastre	1 pezzo
Coniugato (IgG, coniglio)	1x15 ml
Substrato	1x15 ml
Soluzione di lavaggio 20x	1x50 ml
Soluzione di diluizione (10x)	1x20 ml
Soluzione di estrazione (2,5)	2x50 ml
Calibratori	6x1 ml
Controllo 1	1x1.0 ml
Controllo 2	1x1.0 ml

Composizione dei materiali/reagenti forniti

Pozzetti con anticorpi

12x8 pozzetti rivestiti con anticorpi anticalprotectina, in un sacchetto sigillato di plastica contenente un desiccante.

Coniugato (IgG)

1 flacone contenente 15 ml di anticorpi IgG anti-calprotectina umana (coniglio) marcati con fosfatasi alcalina con aggiunta di un colorante viola come conservante. Pronto per l'uso.

Substrato

1 flacone contenente 15 ml di reagente substrato con aggiunta di sodioazide come conservante. Pronto per l'uso.

Soluzione di lavaggio (20x)

1 flacone contenente 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata (20x) con detergenti. Diluire con acqua distillata.

Soluzione di diluizione (10x)

1 flacone contenente 20 ml di soluzione concentrata (10x) di colore blu. Diluire con acqua distillata.

Soluzione di estrazione (2,5x)

2 flaconi contenenti 50 ml di soluzione tampone concentrata (2,5x). Diluire con acqua distillata.

Calibratori

6 fiale contenenti 1 ml di Calprotectina a 6 concentrazioni note (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/ml) con aggiunta di un colorante rosso. Il valore di ciascun calibratore è riportato in etichetta. I calibratori sono pronti per l'uso.

Controllo 1

1 fiala contenente 1.0 ml di controllo di colore rosso pronto per l'uso. Non diluire. Il range dei valori è stampato sull'etichetta.

Controllo 2

1 fiala contenente 1.0 ml di controllo di colore rosso pronto per l'uso. Non diluire. Il range dei valori è stampato sull'etichetta.

Strumenti e materiali richiesti ma non forniti

Per la raccolta dei campioni di feci

1. Provette per raccolta campioni
2. Contenitore per trasporto

Per la preparazione delle feci

1. Anse per inoculazione monouso, sterili
2. Provette con tappo a vite da circa 14 ml
3. Provette Eppendorf (1÷1.5 ml)
4. Bilancia (range di misura 40÷150 mg)
5. Vortex mixer
6. Shaker
7. Microcentrifuga (10000g)
8. Congelatore (-20°C)

Attrezzature per test ELISA

1. Pipetta multicanale, 50-200 µl
2. Lavatore per piastre
3. Lettore per piastre (filtro 405 nm)
4. Acqua distillata
5. Soluzione di arresto (NaOH 1M)

Criteri di prestazione

1. Variazioni intra-saggio

8 campioni di feci di riferimento sono stati testati 4 volte nella stessa seduta. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4	5	6	7	8
Media (DO)	0,273	0,509	0,352	0,555	0,201	0,170	0,151	0,744
D.S.	0,011	0,021	0,012	0,015	0,006	0,006	0,004	0,028
CV%	4,0	4,0	3,5	2,7	3,1	3,7	2,7	3,8

2. Variazione inter-saggio

5 campioni di feci di riferimento sono stati testati in doppio in tre sedute differenti. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4	5
Media (ng/ml)	203,00	25,00	38,60	148,70	89,10
D.S.	1,79	1,79	1,44	3,85	3,03
CV%	0,88	7,14	3,74	2,59	3,40

3. Variazione inter-lotto

5 campioni di feci di riferimento sono stati testati in doppio utilizzando tre lotti differenti. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4	5
Media (ng/ml)	14,13	22,50	12,38	23,61	15,10
D.S.	0,58	1,75	1,05	1,55	0,96
CV%	4,11	7,79	8,47	6,56	6,35

4. Sensibilità diagnostica

Sono stati testate feci provenienti da 36 pazienti pediatrici con diagnosi clinica di malattia infiammatoria cronica dell'intestino. Il valore rilevato è stato del **95%**.

5. Specificità diagnostica

Sono stati testate feci provenienti da 14 soggetti sani senza sintomi di malattia infiammatoria intestinale. Il valore rilevato è stato del **93%**.

Precauzioni ed avvertenze

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Attendere che i reagenti, i campioni ed i pozzetti della micropiastrella raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
3. I materiali di origine umana usati in questo kit sono stati testati e confermati negativi dall'analisi per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) e per gli anticorpi anti-HCV ed anti-HIV I e II. Tuttavia è consigliabile manipolarli come se si trattasse di materiale potenzialmente infettante e devono essere trattati in accordo alla legislazione vigente.
4. **Attenzione:** è molto importante non scambiare i componenti di lotti diversi. Una performance soddisfacente può essere garantita solo usando componenti dello stesso lotto di Calprest.
5. Il conservante presente nel substrato è sodio azide a concentrazione inferiore a 0.1 % (p/p). La sodio azide è altamente tossica per gli organismi acquatici. Evitare di gettare il prodotto nella rete fognaria.
6. Il substrato deve avere una colorazione giallo pallida ed è sensibile alla luce. Conservare al buio ed agitare prima dell'uso.
7. Le strip non usate devono essere rimesse nel contenitore e sigillate assieme al desiccante e conservate a 2-8°C.
8. Se il lavaggio delle piastre è insufficiente, possono generarsi errori nella rilevazione della concentrazione di Calprotectina a causa della rimozione incompleta della soluzione di lavaggio. Controllare pertanto che il lavatore in uso sia completamente efficiente.
9. Tutti i reagenti, eccetto il substrato e la soluzione di lavaggio concentrata, contengono Proclin 300 come conservante, al di sotto dei limiti consentiti.

Preparazione dei reagenti

Tampone di estrazione

Diluire la Soluzione di Estrazione concentrata aggiungendo una parte di soluzione (50 ml) a 1,5 parti (75 ml) di acqua distillata. Si ottengono così 125 ml di soluzione di lavoro.

Tampone di Diluizione

Diluire la Soluzione di Diluizione concentrata aggiungendo una parte di soluzione (20 ml) a 9 parti (180 ml) di acqua distillata. Si ottengono così 200 ml di soluzione di lavoro.

Soluzione di lavaggio

Preparare la Soluzione di lavaggio diluendo l'intero contenuto del flacone (50 ml) in acqua distillata fino ad ottenere un volume finale di 1000 ml.

Conservazione

Tutti reagenti devono essere conservati a 2-8°C ed usati prima della data di scadenza stampata sull'etichetta.

Stabilità dei reagenti (dopo la prima apertura)

Reagente	Conserv. a	Tempo
Coniugato	2-8°C	1 mese
Soluzione substrato	2-8°C	3 mesi
Standard	2-8°C	1 mese
Controlli	2-8°C	1 mese

Stabilità delle soluzioni di lavoro

Reagente	Conserv. a	Tempo
Soluzione di lavaggio	20-25°C	30 giorni
Tampone di estrazione	2-8°C	3 mesi
Tampone di diluizione	2-8°C	30 giorni

1. La data di scadenza di ciascun componente è stampata sull'etichetta del flacone.
2. Evitare l'esposizione ad alta temperatura, luce solare diretta o condizioni di estrema umidità.
3. Le strip non ancora usate possono essere conservate nel loro contenitore di alluminio ben chiuso con il desiccante per un mese dalla data di apertura.

Stabilità al trasporto

In uno studio di stabilità accelerata tutti i componenti del dispositivo si sono dimostrati stabili dopo conservazione a 37°C per 96 ore.

Raccolta dei campioni di feci e preparazione

1. Il paziente dovrebbe prelevare circa 1 ÷ 5g di feci e porle in un contenitore adatto.
2. Il campione di feci deve essere inviato al laboratorio entro 4 giorni.
3. La temperatura durante il trasporto non dovrebbe mai superare i 30°C.
4. Conservare i campioni di feci a -20°C.
5. Scongellare i campioni di feci e portarli a temperatura ambiente.
6. Pesare (tara) una provetta vuota e l'ansa per inoculazione.

- Prelevare circa 100 mg (range 40÷120 mg) di feci per mezzo dell'ansa e porle in una provetta con tappo a vite.
- Pesare la provetta (contenente l'ansa ed il campione) e calcolare il peso netto delle feci (tra 40÷120 mg).
- Rompere il manico dell'ansa, lasciando la parte inferiore con le feci e 4-6 cm del manico all'interno della provetta.
- Aggiungere la soluzione di estrazione diluita (rapporto peso/volume 1:50), per esempio 100 mg feci + 4,9 ml di soluzione di estrazione diluita (vedere la tabella riportata nella Scheda Tecnica per maggiori dettagli). Chiudere la provetta.
- Agitare/mescolare vigorosamente con vortex per 30 sec.
- Omogeneizzare per 25±5 minuti su un agitatore. L'ansa all'interno della provetta funzionerà da agitatore.
- Trasferire l'omogenato (1 ml) in una provetta Eppendorf e centrifugare per 20 minuti a 10.000g a temperatura ambiente usando una centrifuga da tavolo (esempio Heraeus Biofuge 13).
- Trasferire 0,5 ml del sopranatante chiaro in una provetta Eppendorf nuova.
- L'estratto può essere analizzato immediatamente oppure congelato a -20°C e conservato per un massimo di 3 mesi.

Procedura ELISA

La procedura descritta di seguito può essere utilizzata anche con campioni di plasma. Vedere "Nota Tecnica" per ulteriori dettagli.

- Assicurarsi che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C).
- Scongelare i campioni congelati e portarli a temperatura ambiente (20-25°C).
- Diluire i campioni 1:50 (20 µl campione + 980 µl di Tampone di diluizione). Per ulteriori diluizioni di campioni ad alta concentrazione diluire il campione 1:250 (esempio 200 µl della diluizione 1:50 + 800 µl di Tampone di diluizione).
- Un esempio di disposizione della piastra è riportata di seguito. Inserire il numero richiesto di strip nel supporto. Usare strip con pozzetti non rivestiti per completare la piastra se il lavatore richiede una piastra intera. Il Bianco, gli Standard ed i Controlli devono essere inseriti in ogni serie.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Bianco	Cal 4	Ctr. 2	Ca 4	Ca 8	Ca 12	
B	Bianco	Cal 4	Ctr. 2	Ca 4	Ca 8	Ca 12	
C	Cal 1	Cal 5	Ca 1	Ca 5	Ca 9	Ca 13	
D	Cal 1	Cal 5	Ca 1	Ca 5	Ca 9	Ca 13	
E	Cal 2	Cal 6	Ca 2	Ca 6	Ca 10	Ca 14	
F	Cal 2	Cal 6	Ca 2	Ca 6	Ca 10	Ca 14	
G	Cal 3	Ctr. 1	Ca 3	Ca 7	Ca 11		
H	Cal 3	Ctr. 1	Ca 3	Ca 7	Ca 11		

- Aggiungere 100 µl di Tampone di Diluizione nei pozzetti A1-B1 (Bianco).
- Aggiungere 100 µl di ciascuno standard in doppio (C1-D1, E1-F1, G1-H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2).
- Aggiungere 100 µl di ciascun controllo in doppio (G2-H2, A3-B3).
- Mescolare bene i campioni diluiti prima di dispensarli nei

pozzetti. Dispensare 100 µl di ciascun campione in doppio nei rispettivi pozzetti (C3-D3, E3-F3, ...).

- Coprire le piastre ed incubare temperatura ambiente per 45±5 min.
- Alla fine del periodo di incubazione, lavare i pozzetti aggiungendo 0,3 ml di soluzione di lavaggio diluita a ciascun pozzetto. Rimuovere tutto il liquido dai pozzetti. Ripetere la procedura altre 2 volte per un totale di 3 cicli di lavaggio. Dopo l'aspirazione finale, capovolgere la piastra e batterla con delicatezza su un pezzo di carta da filtro per rimuovere ogni traccia di liquido residuo.
- Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto.
- Coprire le piastre ed incubare temperatura ambiente per 45±5 min.
- Ripetere i lavaggi come indicato sopra (cfr. 10).
- Aggiungere 100 µl di substrato in ciascun pozzetto.

Nota: si raccomanda di usare una pipetta multicanale per evitare variazioni del tempo di sviluppo del substrato.

- Incubare a temperatura ambiente per circa 30 minuti al buio o dopo aver coperto la piastra con un foglio di alluminio.
- Leggere i valori di Densità Ottica (DO) per mezzo di lettore per ELISA a 405 nm. Quando il Calibratore 6 raggiunge un valore di DO compreso tra 1,8 – 2,1, leggere la piastra con un lettore automatico EIA oppure fermare la reazione aggiungendo 100 µl di NaOH 1M. Dopo aver aggiunto la soluzione di arresto, la piastra può essere conservata a 4°C per 24 ore.

Calibrazione e controllo di qualità

- Una nuova curva standard deve essere usata in ogni test.
- Il valore di fondo dei pozzetti dovrebbe essere minore di 0,20 DO.
- Inserire il Controllo 1 ed il Controllo 2 in ogni test.

Calcolo dei risultati

Calcolare il valore medio di DO di tutti i duplicati. Sottrarre il valore medio del Bianco da tutti i valori. Tracciare la curva di calibrazione riportando i valori della concentrazione di calprotectina contenuta in ciascuno standard in ng/ml ed il rispettivo valore medio di DO in un sistema lineare XY. La lettura dei Campioni dalla curva standard viene corretta per il fattore di diluizione e convertita in mg/kg moltiplicando per 2,5 il valore ottenuto dalla curva standard (esempio: una lettura di 50 ng/ml diviene 125 mg/kg). Se il campione è stato diluito ulteriormente, tale fattore dovrà essere tenuto in considerazione per il calcolo della concentrazione. Le concentrazioni possono essere inoltre determinate collegando il lettore ELISA ad un computer.

Valori di riferimento

Studi clinici(2-5,15,17) hanno fornito i seguenti valori:

Valori di riferimento normali, mediana	25 mg/kg
Cancro Colorettale, mediana	350 mg/kg
MICI (IBD) (CD&UC), mediana	1722 mg/kg

Interpretazione dei risultati

I campioni con una concentrazione superiore a 50 mg/kg devono essere considerati positivi al test Calprest. Negli adulti

sani, il valore medio è di circa 25 mg/kg. Il valore mediano in pazienti con cancro coloretale è di circa 350 mg/kg. I pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali sintomatiche ed attive hanno livelli di calprotectina tra 200 e 20 000 mg/kg.

Bibliografia

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Dale I. et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.
7. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
8. Brandtzaeg P. et al.: Distribution of a formalin resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. American J of Clin Pathology 1987;87:700-707.
9. Fagerhol M.K.: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol: Mol Pathos 1996;49:M74-M79.

10. Isaksen B. and Fagerhol M.K.: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:289-292.
11. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
12. Yui S. et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. Journal of Leukocyte Biology; 58:650-658
13. John B. et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol: Molec Pathol 1997;50:113-123.
14. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
15. Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol 2000;95:2831-2837
16. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
17. John B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Calprest

96 test, codice 9031



Data di preparazione

2012.10.25

Eurospital

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com



Preparazione dei campioni

a) FECEI

Pesatura e diluizione dei campioni

Per effettuare rapidamente le diluizioni dei campioni, la tabella riportata di seguito fornisce il volume di Tampone di estrazione da aggiungere ad un quantitativo di feci (peso + volume = 1+49).

Feci (mg)	Tampone Estrazione (ml)
120	5.9
115	5.6
110	5.4
105	5.2
100	4.9
95	4.7
90	4.4
85	4.2
80	3.9
75	3.7
70	3.4
65	3.2
60	2.9
55	2.7
50	2.5
45	2.2
40	2.0

Estrazione ed omogeneizzazione

1. Il tempo di applicazione sul Vortex dovrebbe essere il più accurato possibile (30 secondi).
2. Il tempo di agitazione non deve essere inferiore a 20 min.
3. Numero di campioni consigliabile per ogni serie: 10, 20, 30 o 40 campioni.
4. Centrifugazione: per facilitare la raccolta e la manipolazione dei campioni, assicurarsi che il pellet sia compattato sul fondo della provetta da centrifugazione.
5. Non variare il tempo di centrifugazione, né il valore di forza g, né il valore di rpm.

Raccolta del supernatante dell'estratto di feci

1. Raccogliere la metà superiore del supernatante limpido, circa 500 μ l.
2. Evitare il contatto con il pellet poiché aggregato o particelle possono causare valori di calprotectina erranei.

b) PLASMA

La procedura ELISA per i campioni di plasma è uguale a quella descritta per i campioni di feci.

Materiali richiesti ma non forniti

1. Vacutainer® con EDTA per raccolta del plasma.
2. Centrifuga
3. Provette Eppendorf.

Raccolta del campione

1. Prelevare il sangue nelle provette Vacutainer® con EDTA.
2. Centrifugare a 2000g per 15 minuti.
3. Prelevare il plasma e congelarlo a -200C in aliquote di almeno 150 μ l.

Diluizione dei campioni

Diluire i campioni di plasma 1:50 (20 μ l campione + 980 μ l Tampone di diluizione).

Calcolo dei risultati

La concentrazione di calprotectina nel campione viene determinata moltiplicando la concentrazione di calprotectina ottenuta dalla curva standard per 0,05. Se il campione è stato diluito ulteriormente, tale fattore dovrà essere tenuto considerato per il calcolo della concentrazione. La concentrazione di Calprotectina presente viene espressa in μ g/ml di plasma.

Valori di riferimento

Uno studio preliminare ha fornito i seguenti risultati:

Range di riferimento normale: 0,3 -1,6 μ g/ml

Note sulla Procedura ELISA

Lavaggio

1. Evitare il blocco dei puntali.

Pipette

1. Usare puntali monouso.
2. Evitare contaminazione delle pipette.
3. Evitare che si formino bolle d'aria nei puntali.

Substrato

1. Conservare il contenitore del substrato al buio.
2. Il colore della soluzione substrato deve essere incolore o pallida, non gialla.
3. Usare contenitori separati per coniugato e substrato, se diversi dai flaconi originali.
4. Usare pipette multicanali per eliminare variazioni nel tempo di sviluppo del substrato. Evitare contaminazioni tra coniugato e substrato se si usa una pipetta unica.

Coniugato

1. Mescolare delicatamente per inversione il flacone prima dell'uso.

Calprest®

ELISA assay for determination of calprotectin in stools.

For in vitro diagnostic use.

Intended use

Calprest is a quantitative enzyme-linked immunoassay for the detection of calprotectin in faeces. New calprotectin extraction solution is a medium for extraction of calprotectin from faecal samples according to the new and improved faeces sample preparation method [1].

Test Principle

Calprest uses polyclonal antibody against calprotectin in an enzyme linked immuno-sorbent assay system. Calprotectin present in the diluted sample is bound by the antibody adsorbed to the surface of the plastic well. The enzyme conjugated antibody binds to the captured antigen and subsequently the enzyme catalyses the conversion of the substrate to a coloured product. The intensity of the colour is proportional to the amount of conjugate bound, and thus to the amount of captured calprotectin. Concentration of calprotectin in the samples is calculated using the provided standards.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of "Calprest" is 6.25 ng/ml, which corresponds to 15.6 mg calprotectin/kg faeces at a sample dilution of 1:2500.

Materials provided with the kit

(quantity sufficient for 96 tests)	
Antibody coated plate	12x8 wells
Microtiter plate cover	1 piece
Enzyme conjugate antibody (IgG, rabbit)	1x15 ml
Substrate	1x15 ml
Washing solution (20x)	1x50 ml
Diluent solution(10x)	1x20 ml
Extraction solution(2,5x)	2x50 ml
Standards	6x1 ml
Control 1 (high)	1x 1.0 ml
Control 2 (low)	1x 1.0 ml

Composition of supplied reagents/materials

Antibody coated plate

12x8 wells coated with antibody against calprotectin. Plastic sealed bag containing a desiccant.

Enzyme conjugate antibody (IgG)

1 vials containing 15 ml alkaline phosphatase-labelled anti-human calprotectin IgG antibodies (rabbit) in a buffer solution with the addition of a purple dye. Ready-to-use.

Substrate

1 vial containing 15 ml substrate reagent with Sodium-azide as a preservative. Ready to use.

Washing solution (20x)

1 vial containing 50 ml concentrated washing solution. To be diluted with distilled water.

Dilution solution(10x)

1 vial containing 20 ml diluent solution (10x) with the addition of a blue dye, to be diluted with distilled water.

Extraction solution(2,5x)

2 vials containing 50 ml (2,5x) to be diluted with distilled water.

Standards

6 vials containing 1 ml Calprotectin at six known concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ng/ml) with the addition of a red dye. The value of each standard is printed on the vial label. Ready to use.

Control 1

1 vial containing 1,0ml with the addition of a red dye. Ready to use. Do not dilute. The range of values is printed on the vial label.

Control 2

1 vial containing 1,0ml with the addition of a red dye. Ready to use. Do not dilute. The range of values is printed on the vial label.

Materials required but not provided

Faeces sample collection

1. Sample collection tube
2. Transport container

Faeces preparation

1. Disposable, breakable sterile inoculation loops
2. Disposable polystyrene screw cap tubes, 14 ml
3. Eppendorf tubes (1 ÷ 1.5 ml)
4. Sensitive digital scale (40 ÷ 150 mg)
5. Vortex mixer
6. Shaker
7. Microcentrifuge (10000g)
8. Freezer (-20°C)

Equipment for ELISA measurements

1. Multi-channel pipette, 50-200 ml
2. ELISA plate washer
3. ELISA plate reader (filter 405 nm)
4. Distilled water
5. Stop solution (NaOH 1M)

Performance criteria

1. Intra-assay

8 reference stool samples were tested 4 times in the same run. The results are reported below:

Samples	1	2	3	4	5	6	7	8
Mean (DO)	0,273	0,509	0,352	0,555	0,201	0,170	0,151	0,744
S.D.	0,011	0,021	0,012	0,015	0,006	0,006	0,004	0,028
CV%	4,0	4,0	3,5	2,7	3,1	3,7	2,7	3,8

2. Inter-assay variation

5 reference stool samples were tested 3 times in 4 different runs. The results are reported below:

Sample	1	2	3	4	5
Mean (ng/ml)	203,00	25,00	38,60	148,70	89,10
S.D.	1,79	1,79	1,44	3,85	3,03
CV%	0,88	7,14	3,74	2,59	3,40

3. Inter-lotto variation

5 reference stool samples were tested in duplicate using 3 different batches. The results are reported below:

Sample	1	2	3	4	5
Mean (ng/ml)	14,13	22,50	12,38	23,61	15,10
S.D.	0,58	1,75	1,05	1,55	0,96
CV%	4,11	7,79	8,47	6,56	6,35

4. Diagnostic sensitivity

Stool from 36 clinically diagnosed IBD pediatric patients were tested. The found value was **95%**.

5. Diagnostic specificity

Stool from 14 subjects with gastrointestinal symptoms not related to inflammatory bowel disease were tested. The found value was **93%**.

Precautions and warnings

1. For in vitro use only.
2. Reagents, samples and microtiter strips should be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the test.
3. Materials of human origin used in this kit have been tested and confirmed negative for HBsAg and anti-HIV I and II and anti-HCV antibodies. However, they should be treated as a potential biohazard, and shall be handled and disposed of according to local laboratory legislation.
4. **Warning:** do not interchange components from the different kit batches. Satisfactory performance of the test is guaranteed only when components from the same batch of Calprest are used.
5. The substrate reagent contains sodium azide as preservative at concentrations lower than 0,1% (w/w). Sodium azide is highly toxic to aquatic organisms. Avoid to empty into drains.
6. Substrate reagent should be pale yellow. The substrate is light sensitive. Store in the dark and shake before use.
7. Unused microtiter strips should be re-sealed air tight in the foil bag with the enclosed drying pad and stored at 2-8°C.
8. Insufficient washing of the ELISA plate can lead to erroneous values of Calprotectin due to incomplete removal of reagents. Routine maintenance of aspiration/wash system is strongly recommended.
9. All reagents, except to the substrate and the concentrated washing solution, contain Proclin 300 as a preservative agent below the allowed limits.

Reagent preparation

Extraction buffer

Dilute concentrated Extraction solution by adding 1 part (50 ml) of it to 1,5 parts (75 ml) of freshly distilled water to obtain 125 ml working solution. Mix well.

Diluent buffer

Dilute concentrated Dilution solution by adding 1 part (20 ml) of it to 9 parts (180 ml) of distilled water to obtain 200 ml working solution. Mix thoroughly.

Washing solution

Prepare the washing solution by diluting the content of the whole vial (50 ml) with distilled water to a final volume of 1000 ml.

Storage

All reagents must be stored at 2-8°C and used before expiration date printed on the label.

Reagent stability (unsealed reagents)

Reagent	Storage conditions	Storage time
Conjugate	2-8°C	1 month
Substrate	2-8°C	3 months
Standards	2-8°C	1 mese
Controls	2-8°C	1 mese

Stability of working solutions

Reagent	Storage conditions	Storage time
Washing solution	20-25°C	30 days
Extraction solution	2-8°C	3 months
Dilution liquid	2-8°C	30 days

1. The expiry date is printed on all component labels.
2. Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity.
3. Unused microtiter strips resealed air tight in the plastic bag with the drying pad inside can be stored for one month.

Stability during transportation

An accelerate stability test proved that all reagents are stable after 96 hours at 37°C.

Faeces sample collection and preparation

1. Collect approx. 1 ÷ 5 g stool and place it in a suitable container.
2. Stool sample is sent or delivered to the laboratory within 4 days.
3. Temperatures during transport should never exceed 30°C.
4. Store faeces samples at -20°C.
5. Thaw frozen stool samples at room temperature.
6. Weigh (tare) the empty screw cap tube together with the inoculation loop.
7. Take out approx. 100 mg (between 40 - 120 mg) faeces by means of the inoculation loop, and place into a screw-cap-tube.

8. Weigh tube and loop with faeces and calculate net faeces weight (between 40 - 120 mg).
9. Break off the loop handle, leaving the loop with faeces and a 4-6 cm handle inside the screw cap tube.
10. Add pre-diluted extraction buffer (weight/volume ratio 1:50), e.g. 100 mg faeces + 4.9 ml diluted extraction solution. (See table in the Technical advice and customer service). Close the tube.
11. Shake/mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex.
12. Homogenise 25 ± 5 minutes on a shaker or roller. The loop inside the tube will act as an agitator.
13. Transfer the homogenate (1 ml) to an Eppendorf tube and centrifuge for 20 min. at 10,000g at RT using a bench-top centrifuge (e.g., Heraeus Biofuge 13).
14. Transfer 0.5 ml of the clear extract supernatant to new Eppendorf tubes.
15. The extracts may be tested immediately. Store frozen extracts (max. 3 months at -20°C) for later measurement.

ELISA Procedure

The procedure described hereafter can be used for testing plasma samples. See "Technical Advice" for further details.

1. Ensure that all reagents reach room temperature (20-25°C).
2. Thaw frozen sample at room temperature.
3. Dilute samples 1:50 (20 µl sample + 980 µl dilution buffer). For further dilution of high concentration samples, dilute the sample to a final 1: 250 dilution (e.g. 200 µl of the 1:50 dilution + 800 µl dilution buffer).
4. Suggested plate layout in duplicates is shown below. Fit the strip holder with the required number of micro ELISA strips. Use uncoated strips to complete the strip holder if the washer requires a full plate. Blank, standards and controls must be included in each run.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blank	STD4	Ctr. 2	Sa 4	Sa 8	Sa 12	
B	Blank	STD4	Ctr. 2	Sa 4	Sa 8	Sa 12	
C	STD1	STD5	Sa 1	Sa 5	Sa 9	Sa 13	
D	STD1	STD5	Sa 1	Sa 5	Sa 9	Sa 13	
E	STD2	STD6	Sa 2	Sa 6	Sa 10	Sa 14	
F	STD2	STD6	Sa 2	Sa 6	Sa 10	Sa 14	
G	STD3	Ctr. 1	Sa 3	Sa 7	Sa 11		
H	STD3	Ctr. 1	Sa 3	Sa 7	Sa 11		

5. Add 100 µl of Dilution buffer to wells A1-B1 (blank).
6. Add 100 µl of each standard in duplicate wells (C1-D1, E1-F1, G1-H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2).
7. Add 100 µl of each control in duplicate wells (G2-H2, A3-B3).
8. Mix diluted sample well before application to the plate and add 100 µl of each sample in duplicate wells (C3-D3, E3-F3...).
9. Cover plate with plate cover and incubate the plate at room temperature for 45 ± 5 min.

10. At the end of the incubation time, wash the plate by adding 0,3 ml of diluted washing solution to each well. Remove as much liquid as possible. Repeat this step two more times up to a total of 3 washing steps. After the final aspiration, invert plate and tap gently on absorbent tissue to ensure complete removal of washing solution.
11. Add 100 µl conjugate to each well.
12. Cover plate with plate cover and incubate the plate at room temperature for 45 ± 5 min.
13. Repeat washing step as above (see 10).
14. Add 100 µl substrate solution to each well. Note: a multi-channel pipette is recommended in order to avoid variation in substrate development time. Avoid also the formation of bubbles during substrate pipetting.
15. Incubate the plate at room temperature for approx. 30 minutes in a dark place or wrap the plate with an aluminium foil.
16. Read the O.D. values by means of an ELISA reader at 405 nm. When standard 6 reaches an OD value between 1.8-2.1, the reaction should be read with an automatic EIA reader or stopped by adding 100 µl NaOH 1M stop solution. Plates stopped with NaOH 1M may be stored at 4°C for 24 hours.

Assay calibration and quality control

1. A new standard curve is used with each run.
2. The plate background should be < 0.20 OD.
3. Control 1 and 2 are to be included in each run.

Calculation of test results

Calculate the mean optical densities (OD) of all duplicates. Subtract the mean Blank OD from all values. Plot the standard curve with actual calprotectin concentration of standards as ng/ml and corresponding mean OD values on an xy system. The readings of the Samples from the Standard curve is corrected for the dilution and converted to mg/kg by multiplying 2.5 (e.g. a reading of 50 ng/ml becomes 125 mg/kg). If samples are further diluted this must be compensated for during calculations. Concentrations can also be determined by use of a computer linked to the Elisa reader.

Reference values

Clinical studies^(2-5, 17) gave the following values:

Normal healthy reference, median	25 mg/kg
Colorectal cancers, median	350 mg/kg
Inflammatory bowel disease (CD&UC), median	1722 mg/kg

Interpretation of results

Samples giving values above 50 mg/kg are regarded as having a positive Calprest test. In healthy adults the median value is about 25 mg/kg. The median value in patients with colorectal cancers is about 350 mg/kg. Patients with active, symptomatic inflammatory bowel disease have levels between 200 and 20 000 mg/kg.

References

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Dale I. et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.
7. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
8. Brandtzaeg P. et al.: Distribution of a formalin resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. American J of Clin Pathology 1987;87:700-707.
9. Fagerhol M.K.: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol: Mol Pathol 1996;49:M74-M79.
10. Isaksen B. and Fagerhol M.K.: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:289-292.

11. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
12. Yui S. et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. Journal of Leukocyte Biology; 58:650-658
13. Johne B. et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol: Molec Pathol 1997;50:113-123.
14. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
15. Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol 2000;95:2831-2837
16. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
17. Johne B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Calprest

96 tests, code 9031



Date of preparation:

2012.10.25

Eurospital

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com



Sample preparation

a) Stools

Weighing and sample dilution

For a rapid sample dilution regime the table below gives the volume of extraction solution added to a given amount of stools (weight + volume = 1+49)-

Stools (mg)	Extraction solution (ml)
120	5.9
115	5.6
110	5.4
105	5.2
100	4.9
95	4.7
90	4.4
85	4.2
80	3.9
75	3.7
70	3.4
65	3.2
60	2.9
55	2.7
50	2.5
45	2.2
40	2.0

Extraction and homogenisation

1. Vortex mixing time should be as accurate as possible (30 seconds).
2. Shaking time not shorter than 20 minutes. Reduce delay before pipetting.
3. Recommended batch sizes: 10, 20, 30 or 40 samples
4. Centrifugation: for ease of harvesting and handling, make sure the pellet is compact at the bottom of the centrifuge tube.
5. Do not change centrifugation time and g force. Check g force and rpm.

Harvesting of faeces extract supernatant

1. Harvest the top half of the clear supernatant, approx. 500 µl.
2. Avoid contact with the pellet as aggregates or particles can cause erroneous calprotectin values.

b) Plasma

The ELISA procedure is the same for both faeces and plasma specimens.

Materials required but not provided

1. EDTA Vacutainer® Tubes for plasma collection
2. Centrifuge
3. Eppendorf tubes

Sample collection

1. Draw blood into EDTA Vacutainer® tube
2. Centrifuge 2000g for 15 minutes
3. Plasma is pipetted off and frozen at -20°C in aliquots larger than 150 ml

Calculation of test results

The calprotectin concentration in the sample is determined by multiplying the actual calprotectin concentration read from the standard curve by 0,05. If samples are further diluted, this factor must be included in the calculation. The concentration is expressed as µg/ml plasma.

Reference values

A preliminary study gave the following values:

Normal reference range: 0,3-1,6 µg/ml

Note on ELISA assay procedure

Washing

1. Avoid blocking of aspiration probes

Pipetting

1. Use disposable tips
2. Avoid contamination of the pipette
3. Avoid air bubbles in the tips

Substrate

1. Store Substrate container in the dark.
2. Colour of substrate should be colourless or pale, not yellow.
3. Use separate reservoir for conjugate and substrate if different than original vials.
4. Change vessel between each plate. Use multichannel pipettes to eliminate variations in substrate development time. Carry-over from conjugate to substrate is avoided if only one pipette is used.

Conjugate

1. Mix content of the vial gently prior to use (do not shake).

Calprest®

Test pour l'extraction et le dosage de la calprotectine dans les selles.

Usage in vitro.

Utilisation

Calprest est une technique d'extraction et de dosage de la calprotectine dans les selles par technique ELISA [1].

Principe

L'anticorps polyclonal adsorbé sur la phase solide d'une plaque ELISA réagit en présence de la calprotectine contenue dans l'échantillon extrait et dilué à partir des selles pour former des complexes spécifiques antigène-anticorps. Après une phase de lavage, le conjugué enzymatique ajouté se lie spécifiquement aux complexes antigène-anticorps. Le conjugué en excès est éliminé lors d'une étape de lavage. Le substrat ensuite ajouté est hydrolysé pour donner une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon. La concentration en calprotectine présente dans l'échantillon est calculée à partir d'une courbe étalon.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du test Calprest est de 6,25 ng/ml soit 15,6 mg de calprotectine/kg de selles à la dilution d'échantillon de 1:2500.

Matériel fourni

(q.s.p 96 tests)

Microplaque sensibilisée	12 x 8 puits
Couvercle de microplaque	1 unité
Conjugué (IgG de lapin)	1 x 15 ml
Substrat	1 x 15 ml
Solution de lavage (20X)	1 x 50 ml
Diluant d'échantillon (10X)	1 x 20 ml
Solution d'extraction (2,5X)	2 x 50 ml
Standards	6 x 1 ml
Contrôle 1 (titre élevé)	1 x 1.0 ml
Contrôle 2 (titre faible)	1 x 1.0 ml

Phase solide

12 x 8 puits sensibilisés avec les anticorps anti-calprotectine et un agent déshydratant dans un sachet plastique scellé.

Conjugué (IgG)

Un flacon contenant 15 ml de phosphatase alcaline conjuguée aux anticorps IgG de lapin anti-calprotectine humaine dans une solution tamponnée violette. Solution prête à l'emploi.

Substrat

Un flacon contenant 15 ml de substrat additionné de Proclin 300 comme conservateur. Prêt à l'emploi.

Solution de lavage (20X)

Un flacon contenant 50 ml de solution de lavage concentrée à diluer dans de l'eau distillée.

Diluant d'échantillon (10X)

Un flacon contenant 20 ml de diluant concentré (10X) de couleur bleue à diluer avec de l'eau distillée.

Solution d'extraction (2,5X)

2 flacons contenant 50 ml de solution d'extraction concentrée (2,5X) à diluer avec de l'eau distillée.

Standards

6 flacons contenant 1 ml de solution rouge de calprotectine à six concentrations différentes (6,25, 12,5, 25, 50, 100 et 200 ng/ml). Le titre de chaque standard est imprimé sur l'étiquette du flacon. Solution prête à l'emploi.

Contrôle 1

Un flacon contenant 1 ml de solution rouge de contrôle prêt à l'emploi. La valeur du titre est imprimée sur l'étiquette du flacon.

Contrôle 2

Un flacon contenant 1 ml de solution rouge de contrôle prêt à l'emploi. La valeur du titre est imprimée sur l'étiquette du flacon.

Matériel nécessaire non fourni

Transport des échantillons de selles

1. Pots à prélèvement de selles.
2. Pots de transport.

Préparation de selles

1. Anse stérile cassable à usage unique.
2. Tube de polystyrène bouché (14 ml).
3. Tubes Eppendorf (1 ÷ 1,5 ml).
4. Balance de précision (40 ÷ 150 mg).
5. Vortex.
6. Agitateur.
7. Microcentrifugeuse (10000g).
8. Congélateur (-20°C).

Technique ELISA

1. Pipette multicanaux de 50 à 200 µl.
2. Lecteur de microplaque ELISA avec filtre à 405 nm.
3. Laveur ELISA
4. Eau distillée
5. Solution d'arrêt (NaOH 1M).

Critères d'interprétation

1. Variations intra-essai

Pour 8 échantillons de selles différents testés 6 fois chacun en une seule série, les résultats sont les suivants:

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8
Moyenne (DO)	0,273	0,509	0,352	0,555	0,201	0,170	0,151	0,744
D.S.	0,011	0,021	0,012	0,015	0,006	0,006	0,004	0,028
CV%	4,0	4,0	3,5	2,7	3,1	3,7	2,7	3,8

2. Variations inter-essai

Pour 5 échantillons de selles différents testés en double lors de 3 séries différentes, les résultats sont les suivants:

Echantillon	1	2	3	4	5
Moyenne (ng/ml)	203,00	25,00	38,60	148,70	89,10
D.S.	1,79	1,79	1,44	3,85	3,03
CV%	0,88	7,14	3,74	2,59	3,40

3. Variations Inter-lot

Pour 5 échantillons de selles différents testés en double lors de 4 lots différents, les résultats sont les suivants:

Echantillon	1	2	3	4	5
Moyenne (ng/ml)	14,13	22,50	12,38	23,61	15,10
D.S.	0,58	1,75	1,05	1,55	0,96
CV%	4,11	7,79	8,47	6,56	6,35

4. Sensibilité diagnostique

53 échantillons de selles provenant de patients pédiatriques cliniquement diagnostiqués comme IBD ont été testés et ont donné une sensibilité de **95%**.

5. Spécificité diagnostique

14 échantillons de selles provenant de sujets sains avec des symptômes gastrointestinaux sans IBD ont été testés et ont donné une spécificité de **93%**.

Précautions d'emploi

1. Usage in vitro.
2. Les réactifs, les échantillons et les barrettes doivent être à température ambiante (20-25°C) avant le début du test.
3. Les matériels d'origine humaine ont été testés et rendus négatifs pour l'antigène Hbs et les anticorps anti-HIV I et II et anti-HCV. Cependant, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et traités en conséquence selon les règles sanitaires en vigueur.
4. **Attention** : ne pas échanger les composants de différents lots. La bonne performance du test n'est garantie que pour les composants d'un même coffret.
5. Le Substrat du coffret contient de l'azote de sodium à des concentrations inférieures à 0,1% (p/v). L'azote de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations pour former des sels très explosifs. Rincer abondamment les canalisations afin d'éliminer le risque de formation de sels explosifs.
6. Le substrat qui doit être jaune pâle est sensible à la lumière. Le stocker à l'obscurité et agiter avant utilisation. Les barrettes ELISA non utilisées doivent être stockées à 2-8°C dans leur sachet d'origine scellé avec son déshydratant.
7. Un lavage insuffisant de la microplaque ELISA peut engendrer des valeurs de calprotectine erronées : vérifier régulièrement l'efficacité du système de lavage (dispositif de

dépôt et d'aspiration). Une bonne maintenance quotidienne du système de lavage est fortement conseillée.

8. En cas de contact du tampon d'extraction avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin.

Préparation des réactifs

Tampon d'extraction

Préparer 125 ml de tampon d'extraction en ajoutant 50 ml de solution d'extraction concentrée à 75 ml d'eau distillée. Bien mélanger.

Diluant d'échantillon

Préparer 200 ml de diluant d'échantillon en ajoutant 20 ml de diluant concentré à 180 ml d'eau distillée. Mélanger vigoureusement.

Solution de lavage

Préparer 1000 ml de solution de lavage en ajoutant 50 ml de diluant concentré à 950 ml d'eau distillée.

Conservation

Tous les réactifs doivent être conservés à 2-8°C et utilisés avant la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Stabilité des réactifs non ouverts

Réactif	Conservé à	
Conjugué	2-8°C	1 mois
Solution de Substrat	2-8°C	3 mois
Standards	2-8°C	1 mois
Contrôles	2-8°C	1 mois

Stabilité des solutions reconstituées

Réactif	Conservé à	
Solution de lavage	20-25°C	30 jours
Solution d'extraction	2-8°C	3 mois
Diluant d'échantillon	2-8°C	30 jours

1. La date de péremption est imprimée sur l'étiquette de chaque réactif.
2. Eviter une exposition à des températures élevées, à la lumière directe ou à une forte humidité.
3. Les barrettes de la microplaque non utilisées remises dans le sachet plastique bien refermé avec le déshydratant se conservent un mois.

Stabilité pendant le transport

Un test de stabilité accélérée a prouvé que tous les réactifs sont stables après 96 heures à 37°C.

Prélèvement et préparation des échantillons de selles

1. Prélever environ 1 à 5 g de selle dans un pot approprié et l'envoyer au laboratoire dans les quatre jours suivants au plus tard. Lors du transport la température ne doit pas dépasser 30°C.
2. Stocker les échantillons de selles à -20°C.
3. Décongeler les échantillons de selles à tester à température ambiante.

4. Peser (tarage) le tube vide bouché vis avec l'anse. Réunir environ 100 mg (40 à 120 mg) de selles sur l'anse et le placer dans le tube bouché vis. Peser le tube avec les selles et l'anse et calculer le poids net de selles (40 à 120 mg).
5. Couper la tige de l'anse pour ne conserver dans le tube qu'une tige de 4 à 6 cm de long avec les selles sur l'anse.
6. Ajouter la solution d'extraction pré-diluée (poids/volume = 1:50, ex: 100 mg de selles + 4,9 ml de solution d'extraction diluée. Fermer le tube et agiter au vortex pendant 30 secondes.
7. Agiter et bien mélanger pendant 25 ± 5 minutes au vortex. L'anse à l'intérieur du tube agit comme un agitateur.
8. Transférer 1 ml de la solution obtenue dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 20 minutes à 10000g à température ambiante à l'aide d'une centrifugeuse de paillasses (ex : Heraeus Biofuge 13).
9. Transférer 0,5 ml de surnageant limpide dans un nouveau tube Eppendorf. Le surnageant peut être testé immédiatement ou bien conservé congelé à -20°C pendant trois mois au plus avant utilisation.

Procédure

La procédure décrite ci-dessous peut-être utilisée pour tester des échantillons de plasma. Voir «Notice technique» pour plus de détails.

1. Vérifier que tous les réactifs et les échantillons sont à température ambiante ($20-25^{\circ}\text{C}$) avant de commencer le test.
2. Décongeler les échantillons de selles à température ambiante.
3. Diluer les échantillons au 1:50 (20 μl d'échantillon de selles + 980 μl de diluant d'échantillon). Pour des échantillons ayant des concentrations très élevées de calprotectine il est conseillé de diluer l'échantillon pour avoir une dilution finale de 1:250 (ex: 200 μl de l'échantillon diluée au 1:50 + 800 μl de diluant d'échantillon).
4. Un plan de microplaque avec les échantillons testés en double est présenté ci-dessous. Fixer sur la microplaque le nombre de barrettes nécessaires pour la série d'échantillons à tester. Utiliser des barrettes vierges non sensibilisées pour compléter la microplaque si le laveur nécessite d'utiliser des microplaques entières. Le blanc, les standards et les contrôles doivent être inclus dans chaque série de tests.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Bl.	Std 4	Ct. 2	Ech 4	Ech 8	Ech 12	
B	Bl.	Std 4	Ct. 2	Ech 4	Ech 8	Ech 12	
C	Std 1	Std 5	Ech 1	Ech 5	Ech 9	Ech 13	
D	Std 1	Std 5	Ech 1	Ech 5	Ech 9	Ech 13	
E	Std 2	Std 6	Ech 2	Ech 6	Ech 10	Ech 14	
F	Std 2	Std 6	Ech 2	Ech 6	Ech 10	Ech 14	
G	Std 3	Ct. 1	Ech 3	Ech 7	Ech 11		
H	Std 3	Ct. 1	Ech 3	Ech 7	Ech 11		

5. Déposer 100 μl de diluant d'échantillon dans les puits A1 et B1 (blanc).
6. Déposer 100 μl de chaque standard en double (puits C1-D1, E1-F1, G1-H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2).

7. Déposer 100 μl des contrôles appropriés en double dans les puits (G2-H2, A3-B3).
8. Déposer 100 μl de chaque échantillon bien mélangé en double (puits C3-D3, E3-F3, ...).
9. Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incuber à température ambiante pendant 45 ± 5 minutes.
10. Après incubation, effectuer trois lavages en ajoutant pour chaque lavage 0,3 ml de solution de lavage dans chaque puits puis en éliminant le liquide de lavage. Après aspiration finale retourner la microplaque et la sécher en la tapotant sur un papier absorbant afin d'éliminer tout liquide résiduel.
11. Déposer 100 μl de conjugué dans chaque puits.
12. Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incuber à température ambiante pendant 45 ± 5 minutes.
13. Répéter le lavage comme indiqué ci-dessus (étape 10)
14. Déposer 100 μl de substrat dans chaque puits.

Remarque: utiliser une pipette multicanaux pour éviter toute variation due au temps de développement du substrat. Éviter la formation de bulles lors du pipetage du substrat.

15. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité.
16. Mesurer les densités optiques (D.O.) à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA à 405 nm. Si la DO du standard 6 est comprise entre 1,8 et 2,1, lire la microplaque ou stopper la réaction en ajoutant 100 μl de solution d'arrêt NaOH 1M dans chaque puits. Les microplaques ayant reçu la solution d'arrêt NaOH 1M peuvent être conservées à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures.

Courbe étalon et contrôle de qualité

1. Une nouvelle courbe étalon est utilisée pour chaque série de tests.
2. La DO due au bruit de fond de la microplaque doit être inférieure à 0,20.
3. Les Contrôles 1 et 2 doivent être inclus dans chaque série de tests.

Calcul et interprétation des résultats

Calculer la densité optique (DO) moyenne de tous les duplicats. Soustraire la DO moyenne du blanc de toutes les valeurs. Tracer la courbe étalon en utilisant les concentrations en calprotectine des standards en ng/ml sur l'axe des x et les valeurs de DO moyennes correspondantes sur l'axe des y. La concentration en calprotectine des échantillons, obtenue sur la courbe est corrigée en fonction du facteur de dilution et convertie en mg/kg en multipliant par 2,5 (ex : une concentration de 50 ng/ml devient 125 mg/kg). Si les échantillons sont plus dilués, le facteur de dilution correspondant doit être utilisé pour les calculs. Les concentrations peuvent aussi être déterminées en utilisant un ordinateur relié au lecteur ELISA.

Valeurs de référence

Les études cliniques^(2,5, 15, 17) ont donné les résultats suivants:

Valeurs de référence normale, moyenne	25 mg/kg
Cancer colorectal, moyenne	350 mg/kg
IBD (CD & UC), moyenne	1722 mg/kg

Interprétation des résultats

Les échantillons dont le titre est supérieur à 50 mg/Kg sont positifs.

La moyenne de la population adulte saine est d'environ 25 mg/Kg.

La moyenne lors de cancers colorectaux est d'environ 350 mg/kg.

Les patients avec une IBD en phase active ont des titres compris entre 200 et 20 000 mg/Kg.

Références

- Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
- Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
- Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
- Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
- Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
- Dale I. et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.
- Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
- Brandtzaeg P. et al.: Distribution of a formalin resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. American J of Clin Pathology 1987;87:700-707.

9. Fagerhol M.K.: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol: Mol Pathos 1996;49:M74-M79.

10. Isaksen B. and Fagerhol M.K.: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:289-292.

11. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.

12. Yui S. et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. Journal of Leukocyte Biology; 58:650-658

13. Johnne B. et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol: Molec Pathol 1997;50:113-123.

14. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.

15. Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol 2000;95:2831-2837

16. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.

17. Johnne B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Conditionnement

Calprest

Code 9031, 96 tests



Date de la notice:

2012.10.25

Eurospital 

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com



a) Préparation des échantillons de selles

Pour une dilution rapide des échantillons, le tableau ci-dessous donne le volume de solution d'extraction à ajouter à une quantité donnée de selles (poids + volume = 1 + 49)

Selles (mg)	Solution d'extraction (ml)
120	5,9
115	5,6
110	5,4
105	5,2
100	4,9
95	4,7
90	4,4
85	4,2
80	3,9
75	3,7
70	3,4
65	3,2
60	2,9
55	2,7
50	2,5
45	2,2
40	2,0

Extraction et homogénéisation

1. La durée de mélange au vortex doit être aussi précise que possible (30 secondes).
2. Temps d'agitation pas inférieur à 20 minutes. Réduire le délai avant pipetage.
3. Nombre d'échantillons recommandé : 10, 20, 30 ou 40 échantillons.
4. Centrifugation: pour faciliter le pipetage et la manipulation, s'assurer que le culot est compact au fond du tube de centrifugation.
5. Ne pas changer le temps de centrifugation ni le nombre de g. Vérifier le nombre de g et les t/min.

Pipetage du surnageant de l'extrait de selles

1. Pipeter la moitié supérieure du surnageant, environ 500 µl.
2. Eviter le contact avec le culot car les agrégats et les particules peuvent donner des valeurs erronées de calprotectine.

b) Préparation des échantillons de plasma

La procédure ELISA est la même pour les échantillons de selles et de plasma.

Matériel nécessaire non fourni

1. Tubes Vacutainer avec EDTA pour plasma (1,5 ml)
2. Centrifugeuse
3. Tubes Eppendorf (1,5 ml)

Prélèvement et préparation des échantillons de plasma

1. Effectuer un prélèvement en utilisant un tube Vacutainer avec EDTA.
2. Centrifuger pendant 15 minutes à 2000 g.
3. Transférer le plasma dans un nouveau tube. Le plasma peut être testé immédiatement ou bien conservé congelé à -20°C en aliquotes ne dépassant pas 150 µl.

Dilution des échantillons du plasma

Diluer les échantillons au 1:50 (20 µl d'échantillon de plasma + 980 µl de diluant d'échantillon).

Calcul et interprétation des résultats

La concentration en calprotectine des échantillons obtenue sur la courbe est corrigée en fonction du facteur de dilution et convertie en µg/ml en multipliant par 0,05. Si les échantillons sont plus dilués, le facteur de dilution correspondant doit être utilisé pour les calculs.

Valeurs de référence

Une étude préliminaire a donné les résultats suivants:

Valeurs de référence normales: 0,3-1,6 µg/ml

Notes sur la technique ELISA

Lavage

1. Eviter le bouchage des rampes de lavage

Pipetage

1. Utiliser des embouts jetables
2. Eviter la contamination de la pipette
3. Eviter les bulles d'air dans les embouts

Substrat

1. Stocker le substrat à l'obscurité
2. Le substrat doit être incolore ou pâle mais pas jaune.
3. Utiliser des réservoirs différents pour le substrat et le conjugué s'ils sont utilisés hors de leurs flacons d'origine.
4. Changer de récipients entre chaque plaque. Utiliser une pipette multicanaux pour éliminer les variations de développement de la réaction. Eviter les contaminations entre le conjugué et le substrat si une seule pipette est utilisée.

Conjugué

1. Mélanger doucement le contenu de chaque flacon avant utilisation (ne pas secouer).

Calprest®

Ensayo para la determinación de la calprotectina fecal.

Para diagnóstico in vitro.

Indicaciones

Calprest es un ensayo inmunoenzimático, mediante método colorimétrico, para la determinación de la calprotectina fecal. La nueva solución de extracción permite extraer la calprotectina de las muestras fecales, de acuerdo con el nuevo método mejorado de preparación de las heces, propuesto en este ensayo [1].

Principios del ensayo

Calprest es un ensayo inmunoenzimático que saca partido del uso de los anticuerpos policlonales, cuya diana es la calprotectina. El anticuerpo adsorbido se fija a la calprotectina, presente en la muestra diluida, en la superficie de plástico de los pocillos. Los anticuerpos, conjugados con fosfatasa alcalina, se fijan al antígeno. A continuación, la enzima cataliza la conversión del sustrato en producto coloreado. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de conjugado fijado y, en consecuencia, a la cantidad de calprotectina fijada. La concentración de calprotectina, presente en la muestra, se calcula por medio de los calibradores, que se suministran en el kit.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de Calprest es de 6,25 ng/ml, que corresponde a 15,6 mg de calprotectina/kg de heces, cuando la muestra se diluye a 1:2500.

Material suministrado

(cantidad suficiente para 96 ensayos)

Pocillos con anticuerpos	12x8
Tapa para microplaca	1
Conjugado (IgG, conejo)	1x15 ml
Sustrato	1x15 ml
Solución de lavado 20x	1x50 ml
Diluyente (10x)	1x20 ml
Solución de extracción (2.5x)	2x50 ml
Calibradores	6x1 ml
Control 1	1x1.0 ml
Control 2	1x1.0 ml

Composición de los materiales/reactivos suministrados

Pocillos con anticuerpos

12 tiras de 8 pocillos cada una, recubiertos con anticuerpos anti-calprotectina. Vienen selladas en una bolsa de plástico que contiene un desecante.

Conjugado (IgG)

1 frasco con 15 ml de anticuerpos IgG anti-calprotectina humana (conejo), marcados con fosfatasa alcalina, y coloreado de violeta. El conjugado está listo para usar.

Sustrato

1 frasco con 15 ml de reactivo sustrato, con azida sódica como conservante. El sustrato está listo para usar.

Solución de lavado (20x)

1 frasco con 50 ml de solución de lavado concentrada (20x) con detergentes. Dilúyase con agua destilada.

Diluyente (10x)

Un frasco con 20 ml de solución concentrada (10x) y coloreada de azul. Dilúyase con agua destilada.

Solución de extracción (2.5x)

2 frascos con 50 ml de solución tampón concentrada (2.5x). Dilúyase con agua destilada.

Calibradores

6 viales con 1 ml de Calprotectina, en 6 concentraciones conocidas (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 ng/ml) y coloreado de rojo. El valor de cada calibrador viene impreso en su etiqueta. Los calibradores están listos para usar.

Control 1

1 vial con 1.0 ml de control coloreado de rojo y listo para usar. No diluir. El rango de los valores viene impreso en la etiqueta correspondiente.

Control 2

1 vial con 1.0 ml de control coloreado de rojo y listo para usar. No diluir. El rango de los valores viene impreso en la etiqueta correspondiente.

Instrumentos y materiales necesarios pero no suministrados

Para la toma de muestras de heces

1. Probetas de recoger muestras
2. Recipiente de transporte

Para la preparación de las heces

1. Agujas de inoculación desechables, esterilizadas
2. Probetas con tapón de rosca de 14 ml aproximadamente
3. Tubos Eppendorf (1 ÷ 1.5 ml)
4. Balanza de laboratorio (rango de medición 40 ÷ 150 mg)
5. Mezclador Vórtex
6. Agitador
7. Microcentrífuga (10000g)
10. Congelador (-20°C)

Instrumentación para la prueba ELISA

1. Pipeta multicanal, 50-200 µl
2. Lavador para placas
3. Lector de placas (filtro de 405 nm)
4. Agua destilada
5. Solución de parada (NaOH 1M)

Indicaciones del procedimiento

1. Variabilidad intra-ensayo

8 heces de referencia fueron analizadas en 4 veces durante un mismo ensayo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Media (DO)	0,273	0,509	0,352	0,555	0,201	0,170	0,151	0,744
D.S.	0,011	0,021	0,012	0,015	0,006	0,006	0,004	0,028
CV%	4,0	4,0	3,5	2,7	3,1	3,7	2,7	3,8

2. Variabilidad inter-ensayo

5 heces de referencia fueron analizadas por duplicado, en 3 ensayos diferentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	1	2	3	4	5
Media (ng/ml)	203,00	25,00	38,60	148,70	89,10
D.S.	1,79	1,79	1,44	3,85	3,03
CV%	0,88	7,14	3,74	2,59	3,40

3. Variabilidad inter-lote

5 heces de referencia fueron analizadas por duplicado con 3 lotes diferentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	1	2	3	4	5
Media (ng/ml)	14,13	22,50	12,38	23,61	15,10
D.S.	0,58	1,75	1,05	1,55	0,96
CV%	4,11	7,79	8,47	6,56	6,35

4. Sensibilidad diagnóstica

Se ensayaron heces de 53 pacientes pediátricos con la enfermedad inflamatoria crónica intestinal clínicamente diagnosticada. El resultado encontrado fue del **95%**.

5. Especificidad diagnóstica

Se ensayaron heces de 14 sujetos con síntomas gastrointestinales pero sin correlación con la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. El valor encontrado fue del **93%**.

Medidas de precaución

1. Para diagnóstico in vitro.

2. Antes de empezar el ensayo, aguarde hasta que los reactivos, las muestras y los pocillos lleguen a temperatura ambiente (20-25° C).

3. Los materiales de origen humano, que se emplearon para este kit fueron negativos en los análisis de detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y de los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV I y II. Sin embargo, es aconsejable manipularlos como si se tratara de material potencialmente infeccioso. Manéjelos de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente.

4. **iCuidado!:** es sumamente importante no mezclar componentes de lotes diferentes. Eurospital garantiza resultados satisfactorios exclusivamente si se usan componentes del mismo lote de Calprest.

5. El conservante del substrato es azida sódica, con una concentración inferior al 0.1%. La azida sódica es altamente tóxica para los organismos acuáticos. No arroje el producto en el alcantarillado.

6. El substrato tiene que ser de color amarillo pálido y es sensible a la luz. Consérvese en la oscuridad y agítese antes de usar.

7. Vuelva a guardar las tiras sin usar en el recipiente y séllelas junto al desecante. Consérvelas a una temperatura de 2-8°C.

8. El lavado insuficiente de las placas puede generar errores, en la detección de la concentración de Calprotectina, si la solución de lavado no se ha eliminado por completo. Por consiguiente, asegúrese que el lavador que usa sea completamente eficiente o bien golpee la placa al revés contra un papel absorbente.

9. Todos los reactivos, excepto el substrato y la solución de lavado concentrada, contienen Proclin 300 como conservante, por debajo de los límites autorizados.

Preparación de los reactivos

Tampón de extracción

Diluya 50 ml de solución de extracción concentrada en 75ml de agua destilada. De esta manera, obtendrá 125 ml de solución de trabajo.

Tampón diluyente

Diluya 20 ml de tampón diluyente concentrado en 180 ml de agua destilada. De esta manera, obtendrá 200 ml de solución de trabajo.

Solución de lavado

Prepare la solución de lavado, diluyendo todo el contenido del frasco (50 ml) en 950 ml de agua destilada, hasta obtener un volumen final de 1000 ml.

Conservación

Todos los reactivos se conservarán a 2-8°C y se utilizarán antes de la fecha de caducidad que se aprecia en la etiqueta.

Estabilidad de los reactivos

(tras abrir el envase por primera vez)

Reactivo	Consérvese a	Tiempo
Conjugado	2-8°C	1 mes
Substrato	2-8°C	3 meses
Estándar	2-8°C	1 mes
Controles	2-8°C	1 mes

Estabilidad de las soluciones de trabajo

Reactivo	Consérvese a	Tiempo
Solución de lavado	20-25°C	30 días
Tampón de extracción	2-8°C	3 meses
Tampón diluyente	2-8°C	30 días

1. La fecha de caducidad de cada componente se encuentra impresa en la etiqueta del frasco.

2. No exponga los componentes a las altas temperaturas, a la luz solar directa, ni a condiciones de humedad extremadamente elevada.

3. Conserve las tiras sin usar en su recipiente de aluminio, bien cerrado, con el desecante y durante un mes, a contar desde la fecha en que abra el recipiente por primera vez.

Estabilidad durante el transporte

1. Un test acelerado de estabilidad ha probado que todos los reactivos siguen estables después de 96 horas a 37°C.

Toma de las muestras de heces y preparación

1. El paciente recogerá alrededor de 1 ÷ 5 g de heces y las conservará en un recipiente adecuado.

2. La muestra de heces se enviará al laboratorio en un plazo de 4 días.

3. La temperatura durante el transporte nunca ha de superar los 30°C.

4. Conserve las muestras de materia fecal a -20°C.

5. Descongele las muestras de heces y espere hasta que lleguen a temperatura ambiente.

6. Pese (tara) una probeta vacía y la aguja de inyección.

7. Recoja alrededor de 100 mg (rango 40 ÷ 120 mg) de materia fecal mediante la aguja e introdúzcala en una probeta con tapón de rosca.

8. Pese la probeta (con la aguja y la muestra) y calcule el peso neto de las heces (entre 40 ÷ 120 mg).

9. Rompa el mango de la aguja. Deje la parte inferior con las heces y 4-6 cm del mango, en el interior de la probeta.

10. Añada la solución de extracción diluida (relación peso/volumen 1:50). Por ejemplo: 100 mg de heces + 4,9 ml de solución de extracción diluida (para más información, véase la tabla que publicamos en la Ficha Técnica). Cierre la probeta.

11. Agite/mezcle vigorosamente con el Vórtex durante 30 segundos.

12. Proceda a homogeneizar, durante 25 ± 5 minutos con un agitador. La aguja que se encuentra en el interior de la probeta hará de agitador.

13. Transfiera el material homogeneizado (1 ml) a un tubo Eppendorf y centrifugue, durante 20 minutos a 10.000 g, a temperatura ambiente, por medio de una centrifuga de sobremesa (por ejemplo: Heraeus Biofuge 13).

14. Transfiera 0,5 ml del sobrenadante de color claro a un tubo Eppendorf nueva.

15. El extracto se puede analizar inmediatamente, o bien, se puede congelar a -20°C. En este caso, se puede conservar 3 meses, como máximo.

Realización de la prueba ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

El procedimiento que describimos a continuación también se puede utilizar con muestras de plasma. Para más información, véase la "Nota Técnica".

1. Asegúrese que todos los reactivos estén a temperatura ambiente (20-25°C).

2. Descongele las muestras congeladas y aguarde hasta que lleguen a temperatura ambiente (20-25°C).

3. Diluya las muestras 1:50 (20 µl de muestra + 980 µl de tampón diluyente). Si es necesario diluir nuevamente las muestras, a una concentración elevada, diluya la muestra a 1:250 (por ejemplo: 200 µl de la dilución 1:50 + 800 µl de tampón diluyente).

4. A continuación, se aprecia un ejemplo de placa madre. Coloque el número indicado de tiras en el soporte. Utilice tiras con pocillos no tapizados, a efectos de completar la

placa, si el lavador requiere una placa entera. El Blanco, los Estándares y los Controles se han de introducir en cada serie.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blanco	Cal 4	Ctr.2	Ca 4	Ca 8	Ca 12	
B	Blanco	Cal 4	Ctr.2	Ca 4	Ca 8	Ca 12	
C	Cal 1	Cal 5	Ca 1	Ca 5	Ca 9	Ca 13	
D	Cal 1	Cal 5	Ca 1	Ca 5	Ca 9	Ca 13	
E	Cal 2	Cal 6	Ca 2	Ca 6	Ca 10	Ca 14	
F	Cal 2	Cal 6	Ca 2	Ca 6	Ca 10	Ca 14	
G	Cal 3	Ctr. 1	Ca 3	Ca 7	Ca 11		
H	Cal 3	Ctr. 1	Ca 3	Ca 7	Ca 11		

5. Coloque 100 µl de tampón diluyente en los pocillos A1-B1 (Blanco).

6. Coloque 100 µl de cada estándar por duplicado (C1-D1, E1-F1, G1- H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2).

7. Coloque 100 µl de cada control por duplicado (G2-H2, A3-B3).

8. Mezcle bien las muestras diluidas, antes de colocarlas en los pocillos. Coloque 100 µl de cada muestra en duplicado en los pocillos correspondientes (C3-D3, E3-F3,...).

9. Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 45 ± 5 minutos.

10. Al final de la incubación lave los pocillos colocando 0,3 ml de solución de lavado diluida en cada pocillo. Elimine todo el líquido de los pocillos. Repita el procedimiento otras 2 veces, para realizar 3 ciclos de lavado en total. Efectúe la aspiración final. A continuación, ponga la placa boca abajo colóquela sobre un trozo de papel de filtro. Dé un golpecito en la placa, con delicadeza, para eliminar todos los restos de líquido.

11. Coloque 100 µl de conjugado en cada pocillo.

12. Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 45 ± 5 minutos.

13. Repita los lavados tal como se ha descrito en el punto 10.

14. Coloque 100 µl de sustrato en cada pocillo.

Nota: a fin de evitar que el desarrollo del sustrato varíe a lo largo del tiempo, se recomienda el uso de una pipeta multicanal.

15. Incube a temperatura ambiente durante unos 30 minutos en la oscuridad, o bien tapando la placa con una hoja de aluminio.

16. Lea el valor de Densidad Óptica (D.O.) por medio del lector de ELISA a 405 nm. Cuando el valor de D.O. del Calibrador 6 oscile entre 1,8 - 2,1, lea la placa con un lector automático EIA, o pare la reacción añadiendo 100 µl de NaOH 1M. Tras añadir la solución de parada, la placa se puede conservar a 4°C durante 24 horas.

Calibración y control de calidad

1. En cada ensayo se necesita utilizar una nueva curva estándar.

2. El valor de fondo de los pocillos debería ser inferior a 0,20 D.O.

3. Introduzca el Control 1 y el Control 2 en cada ensayo.

Cálculo de los resultados

Calcule el promedio de D.O. de todos los duplicados. Reste el promedio del Blanco de todos los valores. Trace la curva de

calibración, trasladando a un sistema lineal XY, los valores de la concentración de calprotectina, contenida en cada estándar en ng/ml y el valor promedio correspondiente de D.O. La lectura de las muestras de la curva estándar se corrige tomando en consideración el factor de dilución y se convierte en mg/kg multiplicando el valor que se obtuvo en la curva estándar por 2,5 (por ejemplo: una lectura de 50 ng/ml se transforma en 125 mg/kg). Si la muestra se diluyó más de una vez, dicho factor se tomará en consideración, para calcular la concentración. Además, las concentraciones se pueden determinar conectando el lector ELISA con un PC.

Valores de referencia

Los estudios clínicos ^(2-5,15,17) dieron los siguientes valores:

Valores normales de referencia, mediana	25 mg/kg
Cancer Colorrectal, mediana	350 mg/kg
IBD (CD & UC), mediana	1722 mg/kg

Interpretación de los resultados

Las muestras con una concentración superior a 50 mg/kg se considerarán positivas al ensayo Calprest. En los adultos sanos, el promedio es de 25 mg/kg aproximadamente. El valor promedio en pacientes con cáncer colorrectal es de 350 mg/kg aproximadamente. Los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, sintomáticas y activas, tienen unos niveles de calprotectina que oscilan entre los 200 y los 20 000 mg/kg.

Bibliografía

1. Fagerhol M.K. y otros: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) en: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, pág.187-210.
2. Røseth A.G. y otros: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. y otros: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. y otros: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. y otros: Faecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Dale I. y otros: Purification and partila characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.
7. Sohnle P.G. y otros: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.

8. Brandtzaeg PÅG. y otros: Distribution of a formalinresistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. American J of Clin Pathology 1987;87:700-707.

9. Fagerhol M.K.: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol: Mol Pathos 1996;49:M74-M79.

10. Isaksen B. and Fagerhol M.K.: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:289-292.

11. Steinbakk M. y otros: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.

12. Yui S. y otros: Induction of apoptotic cell death en mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. Journal of Leukocyte Biology; 58:650-658

13. Johnne B. y otros: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. J Clin Pathol: Molec Pathol 1997;50:113-123.

14. Ton H. y otros: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica ACTA 2000;292:41-54.

15. Limburg PÅG.J. y otros: Faecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol 2000;95:2831-2837

16. Røseth A.G. y otros: Assessment of disease activity en ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.

17. Johnne B. y otros: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Calprest

96 ensayos, código 9031



Fecha de preparación:

2012.10.25

Eurospital 

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com



Preparación de las muestras

a) Heces

Pesada y dilución de las muestras

A fin de diluir las muestras rápidamente, consulte la siguiente tabla. En la misma hallará el volumen de tampón de extracción que hay que añadir a una cantidad determinada de materia fecal (peso + volumen = 1+49).

Heces (mg)	Tampón de Extracción (ml)
120	5,9
115	5,6
110	5,4
105	5,2
100	4,9
95	4,7
90	4,4
85	4,2
80	3,9
75	3,7
70	3,4
65	3,2
60	2,9
55	2,7
50	2,5
45	2,2
40	2,0

Extracción y homogeneización

1. Controle con sumo cuidado el tiempo durante el cual la muestra permanece en el Vórtex (30 segundos).
2. Agite al menos 20 minutos.
3. El número de muestras aconsejable por serie es de 10, 20, 30 o 40 muestras.
4. Centrifugación: para que la tarea de recoger y manipular las muestras le resulte más fácil, asegúrese que el pellet esté bien compacto en el fondo del Eppendorf de centrifugación.
5. No modifique el tiempo de centrifugación, el valor de fuerza g, ni las r.p.m.

Recogida del sobrenadante del extracto de heces

1. Recoja la mitad superior del sobrenadante límpido, aproximadamente 500 μ l.
2. Evite el contacto con el pellet, puesto que todo agregado o partícula puede falsear los valores de la calprotectina.

b) Plasma

La prueba ELISA para las muestras de plasma es igual a la descrita para las muestras de materia fecal.

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Vacutainer® con EDTA para recoger el plasma.
2. Centrifugadora
3. Tubos Eppendorf.

Toma de la muestra

1. Coloque la muestra de sangre en las probetas Vacutainer® con EDTA.
2. Centrifugue a 2000 g durante 15 minutos.
3. Extraiga el plasma y congélelo a -20°C en alícuotas de 150 μ l como mínimo.

Dilución de las muestras

Diluya las muestras de plasma 1:50 (20 μ l muestra + 980 μ l tampón diluyente).

Cálculo de los resultados

La concentración de calprotectina, presente en la muestra, se determina multiplicando por 0,05 la concentración de calprotectina que se obtuvo mediante la curva estándar. Si la muestra se diluyó más de una vez, dicho factor se tomará en consideración a la hora de calcular la concentración. La concentración de calprotectina presente se expresa en μ g/ml de plasma.

Valores de referencia

Un estudio preliminar dio los siguientes resultados:

Rango de referencia normal: 0,3 -1,6 μ g/ml

Notas de la Prueba ELISA

Lavado

1. Evite que se bloqueen las puntas.

Pipetas

1. Utilice puntas desechables.
2. Impida que las pipetas se contaminen.
3. Evite que se formen burbujas de aire en las puntas.

Substrato

1. Conserve el recipiente del substrato en la obscuridad.
2. La solución de substrato ha de ser incolora o de un color pálido, pero no amarillo.
3. Si no utiliza los frascos originales del conjugado y el substrato, emplee recipientes separados.
4. Use pipetas multicanal, con el objeto de impedir que se produzcan variaciones durante el tiempo de desarrollo del substrato. Impida que el conjugado y el substrato se contaminen, si usa una única pipeta.

Conjugado

1. Mezcle con delicadeza, poniendo el frasco boca abajo, antes de usar.

Calprest®

Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin im Stuhl.

Nur für In-vitro Diagnostik

Verwendung

Calprest® ist ein immunenzymatischer Test zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin im Stuhl. Mit Hilfe der im Kit enthaltenen neuen Extraktionslösung wird das Calprotectin aus den Stuhlproben, welche nach einer neuen und verbesserten Methode vorbereitet werden, extrahiert [1].

Testprinzip

Calprest® ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der polyklonale Antikörper gegen Calprotectin nutzt. Das Calprotectin aus der verdünnten Probe, wird durch den an die Mikrotiterplatte adsorbierten Antikörper gebunden. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Fänger-Antikörper bindet an das an die Platte gebundene Calprotectin. Das Enzym katalysiert die Umsetzung der nachfolgend zugegebenen -Substratlösung wodurch ein Farbumschlag erfolgt. Die Farbintensität ist proportional zur Menge des gebundenen Konjugates und somit auch zur Menge des erfassten Calprotectins. Die Konzentration des Calprotectins in der Probe kann mit Hilfe der mitgelieferten Standards ermittelt werden.

Analytische Sensitivität

Calprest® hat eine analytische Sensitivität von 6,25 ng/ml, dies entspricht 15,6 mg Calprotectin/kg Stuhl, wenn die Stuhlprobe mit 1:2500 verdünnt wurde.

Kitinhalt

(ausreichend für 96 Bestimmungen)	
Mikrotiterplatte, beschichtet	12x8
Deckel für Mikrotiterplatte	1 Stück
Enzym Konjugat (IgG, Kaninchen)	1x15 ml
Substratlösung	1x15 ml
Waschlösung (20x)	1x50 ml
Verdünnungslösung (10x)	1x20 ml
Extraktionslösung (2,5x)	2x50 ml
Standards	6x1 ml
Kontrolle 1	1x1,0 ml
Kontrolle 2	1x1,0 ml

Zusammensetzung der mitgelieferten Materialien/ Reagenzien

Mikrotiterplatte

12x8 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-Calprotectin-Antikörpern, versiegelt in einem Plastikbeutel, der ein Trockenmittel enthält.

Enzym Konjugat (IgG)

1 Flasche, 15 ml, mit alkalischer Phosphatase markiertem Anti-human Calprotectin IgG Antikörper (Kaninchen) in Pufferlösung, lila eingefärbt durch violetten Farbstoffs als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig.

Substratlösung

1 Flasche, 15 ml, Substratlösung mit, Natriumazid als Konservierungsmittel gebrauchsfertig.

Waschlösung (20x)

1 Flasche, 50 ml konzentrierte Waschlösung (20x). Mit destilliertem Wasser verdünnen.

Verdünnungslösung (10x)

1 Flasche, 20 ml konzentrierte blaue Lösung (10x). Mit destilliertem Wasser verdünnen.

Extraktionslösung (2,5x)

2 Flaschen, à 50 ml konzentrierte Lösung (2,5x). Mit destilliertem Wasser verdünnen.

Standards

6 Fläschchen, mit je 1 ml Standardlösung (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 ng/ml) rot eingefärbt, gebrauchsfertig.

Kontrolle 1

1 Fläschchen, 1,0 ml, gebrauchsfertig. Nicht verdünnen. Der Wertebereich ist auf dem Etikett.

Kontrolle 2

1 Fläschchen, 1,0 ml, gebrauchsfertig. Nicht verdünnen. Der Wertebereich ist auf dem Etikett.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Zum Sammeln der Stuhlproben

1. Probensammelbehälter

2. Transportbehälter

Zur Probenvorbereitung

1. Sterile Einweg-Impfösen

2. Einweg Polystyrol Röhrchen mit Schraubverschluss, 14ml

3. Reaktionsgefäße (1,5 ml), z.B. der Eppendorf AG

4. Waage (Messbereich 40-150mg)

5. Vortex-Mischer

6. Schüttler

7. Mikrozentrifuge (10000U.)

8. Gefriergerät (-20°C)

Zur Testdurchführung

1. Mehrkanalpipette, 50-200 µl

2. Plattenwascher

3. Mikrotiterplatten-Lesegerät (Filter 405 nm)

4. Destilliertes Wasser

5. Stopplösung (NaOH 1M)

Leistungsmerkmale

a. Intra-Assay

Acht Stuhlproben wurden in vierfach-Bestimmung getestet.

Folgende Ergebnisse wurden gemessen:

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
Durchschnitt								
(OD)	0,273	0,509	0,352	0,555	0,201	0,170	0,151	0,744
S.D.	0,011	0,021	0,012	0,015	0,006	0,006	0,004	0,028
CV%	4,0	4,0	3,5	2,7	3,1	3,7	2,7	3,8

b. Inter-Assay

Fünf Stuhlproben wurden in drei unterschiedlichen Testläufen in zweifach-Bestimmung getestet.

Folgende Ergebnisse wurden gemessen:

Probe	1	2	3	4	5
Durchschnitte (ng/ml)	203,00	25,00	38,60	148,70	89,10
S.D.	1,79	1,79	1,44	3,85	3,03
CV%	0,88	7,14	3,74	2,59	3,40

c. Lot zu Lot Variation

Fünf Stuhlproben wurden in drei unterschiedlichen Test-Chargen in zweifach-Bestimmung getestet.

Folgende Ergebnisse wurden gemessen:

Probe	1	2	3	4	5
Durchschnitte (ng/ml)	14,13	22,50	12,38	23,61	15,10
S.D.	0,58	1,75	1,05	1,55	0,96
CV%	4,11	7,79	8,47	6,56	6,35

d. Diagnostische Sensitivität

Stuhlproben von 36 Pädiatrie Patienten mit der klinischen Diagnose einer chronischen Darmentzündung wurden getestet. Die diagnostische Sensitivität beträgt **95%**.

e. Diagnostische Spezifität

Stuhlproben von 14 gesunden Personen ohne Symptome einer Darmentzündung wurden getestet. Die diagnostische Spezifität beträgt **93%**.

Vorsichtsmaßnahmen und Hinweise

- Nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Alle Reagenzien, Proben sowie die benötigte Anzahl von Vertiefungen sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20°-25° C) gebracht werden.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden auf HIV/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Achtung:** Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Zufriedenstellende Leistungskriterien können nur gewährleistet werden, wenn die Komponenten der gleichen Calprest-Lot benutzt werden.
- Die Substratlösung enthält Natriumazid als Konservierungsmittel in einer Konzentration von weniger als 0,1 %. Natriumazid ist sehr giftig für aquatische Organismen. Vermeiden Sie die Entleerung in der Kanalisation.
- Das Substrat sollte eine blassgelbe Färbung aufweisen. Da es sehr lichtempfindlich ist, bitte an einem dunklen Ort aufbewahren. Vor Gebrauch schütteln.
- Unbenutzte Mikrotiterwells sollten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel wieder verschlossen und bei 2-8°C gelagert werden.
- Ein Verbleib von Resten der Waschlösung in den Vertiefungen kann fehlerhafte Calprotectin-Messergebnisse

verursachen. Bei Verwendung eines Waschautomaten sollte dieser regelmäßig gewartet und überprüft werden.

9. Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Substrats und der Waschlösung, enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel unterhalb der zulässigen Konzentrationsgrenzen.

Vorbereitung der Reagenzien

Extraktionspuffer

Ein Teil der konzentrierten Extraktionslösung mit 1,5 Teilen frischem destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 50 ml Extraktionslösung mit 75 ml destilliertes Wasser ergibt 125 ml Arbeitslösung. Gut mischen!

Verdünnungspuffer

Ein Teil der konzentrierten Verdünnungslösung mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 20 ml Verdünnungslösung mit 180 ml destilliertes Wasser ergibt 200 ml Arbeitslösung. Gründlich mischen.

Waschpuffer

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 950 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung des Kits

Die Reagenzien sollten bei 2-8°C gelagert werden und sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Die Reagenzien sollten nach überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Lagerung und Haltbarkeit geöffneter Komponenten

Komponente	Lagerung bei	Haltbarkeit
Enzym Konjugat	2-8°C	1 Monat
Substratlösung	2-8°C	3 Monate
Standards	2-8°C	1 Monat
Kontrollen	2-8°C	1 Monat

Haltbarkeit der Arbeitslösungen

Komponente	Lagerung bei	Haltbarkeit
Waschpuffer	20-25°C	30 Tage
Extraktionspuffer	2-8°C	3 Monate
Verdünnungspuffer	2-8°C	30 Tage

- Das Verfallsdatum einer jeden Komponente ist auf dem Etikett des Flakons aufgedruckt.
- Ein Aussetzen an hohe Temperaturen, direkte Sonneneinstrahlung und hohe Feuchtigkeit ist zu vermeiden.
- Die unbenutzten Streifen können in ihrem gut geschlossenen Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel bis zu einem Monat nach der ersten Öffnung aufbewahrt werden.

Haltbarkeit während des Transportes

Eine beschleunigte Haltbarkeitsstudie ergab, dass alle Komponenten bei 37°C für 96 Stunden stabil sind.

Probensammlung und Vorbereitung

1. Es sollten ca. 1 – 5 g Stuhl in einem geeigneten Behälter gesammelt werden.
2. Die Stuhlprobe sollten innerhalb von 4 Tagen an das Labor gesendet werden.
3. Die Temperatur während des Transportes sollte 30°C nicht überschreiten.
4. Die Stuhlproben sollten bei -20°C aufbewahrt werden.
5. Stuhlproben auftauen und auf Raumtemperatur bringen.
6. Ein leeres Schraubverschlussröhrchen zusammen mit einer Einweg-Impföse wiegen (Tara).
7. Mit der Impföse etwa 100 mg (Bereich 40 – 100 mg) Stuhl entnehmen und in das zuvor gewogene Schraubverschlussröhrchen geben.
8. Das Schraubverschlussröhrchen (einschließlich Impföse und Stuhlprobe) erneut wiegen und das Nettogewicht der Stuhlprobe (zwischen 40 und 120 mg) kalkulieren.
9. Den Stiel der Impföse abbrechen und den unteren Teil mit der Stuhlprobe und 4-6 cm des Stiels im Röhrchen belassen.
10. Die verdünnte Extraktionslösung (Verhältnis Gewicht/Menge 1:50) hinzufügen, beispielsweise 100 mg Stuhl + 4,9 ml verdünnte Extraktionslösung (für weitere Details siehe Tabelle des technischen Datenblatts). Das Röhrchen verschließen.
11. Für 30 Sek. kräftig im Vortex-Mischer schütteln/mischen.
12. Auf einem Schüttler für 25 ± 5 Minuten homogenisieren. Dabei dient der Ring im Röhrchen als Rührer.
13. Das Homogenisat (ca. 1 ml) in ein Reaktionsgefäß geben und für 20 Minuten bei 10.000 U zentrifugieren.
14. 0,5 ml des hellen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
15. Das Extrakt kann sofort analysiert oder bei -20°C eingefroren und für maximal 3 Monate gelagert werden.

Testdurchführung

Das nachfolgend beschriebene Verfahren kann auch für Plasmaproben benutzt werden. Für weitere Details siehe "Technischer Hinweis".

1. Die eingefrorenen Proben auftauen und auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.
2. Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien Raumtemperatur haben.
3. Die Proben im Verhältnis 1:50 (20µl Probe + 980µl Verdünnungslösung) verdünnen. Zur weiteren Verdünnung hochkonzentrierter Proben, die Probe 1:1250 (z.B. 200µl der Verdünnung 1:50 + 800µl Verdünnungslösung) verdünnen.
4. Nachfolgend ist ein Beispiel der Plattenbelegung in Doppelbestimmung aufgeführt. Die erforderliche Anzahl an Streifen in den Träger einsetzen. Wenn der Plattenwascher eine vollständige Platte verlangt, zum Ergänzen der Platte Streifen mit nicht beschichteten Vertiefungen verwenden. Die Leerwertprobe (BLANK), die Standards und Kontrollen müssen in jedem Ansatz pipettiert werden.

	1	2	3	4	5	6
A	BLANK	Cal 4	Ctr. 2	Probe 4	Probe 8	Probe 12
B	BLANK	Cal 4	Ctr. 2	Probe 4	Probe 8	Probe 12
C	Cal 1	Cal 5	Probe 1	Probe 5	Probe 9	Probe 13
D	Cal 1	Cal 5	Probe 1	Probe 5	Probe 9	Probe 13
E	Cal 2	Cal 6	Probe 2	Probe 6	Probe 10	Probe 14
F	Cal 2	Cal 6	Probe 2	Probe 6	Probe 10	Probe 14
G	Cal 3	Ctr. 1	Probe 3	Probe 7	Probe 11	
H	Cal 3	Ctr. 1	Probe 3	Probe 7	Probe 11	

5. In die Vertiefungen A1-B1 (BLANK) 100µl Verdünnungspuffer geben.
 6. Je 100µl Standards in Doppelbestimmung (C1-D1, E1-F1, G1-H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2) in die entsprechende Vertiefung geben.
 7. Je 100µl Kontrollen in Doppelbestimmung (G2-H2, A3-B3) in die entsprechende Vertiefung geben.
 8. Die verdünnten Proben gründlich mischen, anschließend 100µl in Doppelbestimmung (C3-D3, E3-F3,...) in die entsprechende Vertiefung geben.
 9. Die Platte abdecken und 45 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
 10. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütteln. Vertiefungen 3mal mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
 11. 100µl Enzym Konjugat in jede Vertiefung geben.
 12. Die Platte abdecken und 45 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
 13. Den Waschschrift wie unter Punkt 10 beschrieben wiederholen.
 14. 100µl Substratlösung in jede Vertiefung geben.
- Achtung:** Die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen um Schwankungen in der Einwirkzeit der Substratlösung zu vermeiden. Schaumbildung während des Pipettierens ist ebenfalls zu vermeiden.
15. Die Platte für etwa 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
 16. Mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405nm, die Werte der optischen Dichte (OD) ablesen. Wenn der Standard 6 einen OD-Wert zwischen 1,8–2,1 erreicht hat, die Platte mit einem EIA-Plattenlesegerät ablesen oder die Reaktion durch Zugabe von 100µl NaOH 1M unterbrechen. Nach Zugabe der Stopplösung, kann die Platte bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt werden.

Kalibrierung und Qualitätskontrolle

1. In jedem Testansatz muss eine neue Standardkurve benutzt werden.
2. Der Leerwert der Vertiefungen sollte unter 0,20 OD liegen.
3. In jedem Testansatz sollten die Kontrollen mitgeführt werden.

Ergebnisermittlung

Den OD-Mittelwert aller Duplikate berechnen und den Mittelwert des Leerwertes von diesen subtrahieren. Die Kalibrationskurve zeichnen, indem man die Calprotectin-Konzentration der Standards in ng/ml gegen den entsprechenden OD-Mittelwert in ein XY-Diagramm einträgt.

Die aus der Standardkurve abgelesenen Probenergebnisse müssen durch den Verdünnungsfaktor korrigiert und in mg/kg konvertiert werden, indem der aus der Standardkurve abgelesene Wert mit 2,5 multipliziert wird (Beispiel: eine Ablesung von 50 ng/ml wird 125 mg/kg). Falls die Probe noch weiter verdünnt wurde, muss dieser Faktor bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt werden. Die Konzentrationen können auch durch das Anschließen des ELISA-Lesegeräts an eine Computergestützte Auswertesoftware bestimmt werden.

Erwartete Werte

Klinische Studien^[2,5, 15, 17] ergaben folgende Werte:

Normale gesunde Verteilung, Median	25 mg/kg
Darmkrebs, Median	350 mg/kg
entzündliche Darmerkrankung, Median	1722 mg/kg

Interpretation der Ergebnisse

Die Proben mit einer Konzentration von über 50 mg/kg müssen hinsichtlich des Calprest®-Tests als positiv angesehen werden. Bei gesunden erwachsenen Personen beträgt die durchschnittliche Caproctectin-Konzentration etwa 25 mg/kg. Der Durchschnittswert bei Patienten mit Darmkrebs beläuft sich auf etwa 350 mg/kg. Patienten mit symptomatischen, chronischen und aktiven Darmentzündungen haben Calprotectin-Werte, welche zwischen 200 und 20 000 mg/kg liegen.

Literatur

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Dale I. et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.

7. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.

8. Brandtzaeg P. et al.: Distribution of a formalin resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. American J of Clin Pathology 1987;87:700-707.

9. Fagerhol M.K.: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol: Mol Pathos 1996;49:M74-M79.

10. Isaksen B. and Fagerhol M.K.: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:289-292.

11. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.

12. Yui S. et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. Journal of Leukocyte Biology; 58:650-658

13. John B. et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol: Molec Pathol 1997;50:113-123.

14. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.

15. Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. Am J Gastroenterol 2000;95:2831-2837

16. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.

17. John B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Calprest®

96 Tests, Artikel Nr. 9031



IVD

Revisionierungsdatum

2012.10.25

Eurospital

Eurospital SpA

34147 Trieste, via Flavia 122
Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944
www.eurospital.com



Probenvorbereitung

A) STUHL

Einwaage und Probenverdünnen

Zum raschen Verdünnen der Stuhlproben, liefert die nachfolgende Tabelle die Menge des Extraktionspuffers, die einer Stuhlmenge beizugeben ist (Gewicht + Volumen = 1 + 49).

Stuhl (ng)	Extraktionspuffer (ml)
120	5,9
115	5,6
110	5,4
105	5,2
100	4,9
95	4,7
90	4,4
85	4,2
80	3,9
75	3,7
70	3,4
65	3,2
60	2,9
55	2,7
50	2,5
45	2,2
40	2,0

Extraktion und Homogenisierung

1. Die Zeit im Vortex-Mischer sollte so genau wie möglich eingehalten werden (30 Sekunden).
2. Die Schüttelzeit darf nicht weniger als 20 Minuten betragen.
3. Empfohlene Probenanzahl pro Testansatz: 10, 20, 30 oder 40 Proben.
4. Zentrifugation: zum leichteren Aufnehmen und zur besseren Probenbearbeitung, sicherstellen, dass sich das Pellet kompakt auf dem Boden des zentrifugierten Röhrchens befindet.
5. Es dürfen weder die Zentrifugationszeit, noch der Wert der Stärke (g) oder die Drehzahl (rpm) geändert werden.

Aufnehmen des Überstandes des Stuhlextrakts

1. Die obere Hälfte des klaren Überstandes, etwa 500µl, abnehmen.
2. Den Kontakt mit dem Pellet meiden, denn Aggregate oder Partikel können falsche Calprotectin-Werte verursachen.

B) PLASMA

Das ELISA-Verfahren für Plasmaproben ist identisch zum Verfahren für Stuhlproben.

Nicht beiliegendes, aber erforderliches Material

1. Blut-Abnahmesystem mit EDTA als Antikoagulanzen, z.B.: Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;
2. Zentrifuge
3. Reaktionsgefäße, z.B. der Firma Eppendorf AG

Sammeln der Probe

1. Blut durch Venenpunktion entnehmen.
2. Für 15 Minuten bei 2000 U. zentrifugieren.
3. Das Plasma (Überstand) ab pipettieren und bei -20°C in Aliquotes von mindestens 150µl einfrieren.

Ergebnisermittlung

Die Calprotectin Konzentration der Probe wird ermittelt, indem das aus der Standardkurve abgelesene Ergebnis mit 0,05 multipliziert wird. Falls die Probe noch weiter verdünnt wurde, muss dieser Faktor bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt werden. Die Konzentration wird in µg/ml Plasma angegeben.

Bezugswerte

Eine vorausgegangene Studie ergab folgende Ergebnisse:

Normalbereich: 0,3 – 1,6 µg/ml

Vorsichtsmaßnahmen und Hinweise

Waschschritt

1. Verstopfen der Spühsonden vermeiden.

Pipetten

1. Einweg-Pipettenspitzen verwenden
2. Kontamination der Pipette vermeiden
3. Luftblasen in der Pipettenspitze vermeiden

Substrat

1. Substratflasche im Dunkeln aufbewahren
2. Das Substrat sollte farblos oder eine blassgelbe Färbung aufweisen, nicht gelb.
3. Falls sie von den Originalflakons abweichen, getrennte Behälter für Konjugat und Substrat verwenden.
4. Um Schwankungen der Inkubationszeit des Substrats auszuschließen, Mehrkanalpipetten verwenden.
5. Kontamination zwischen Konjugat und Substrat vermeiden.

Konjugat

1. Vor Gebrauch vorsichtig mischen. Nicht schütteln!

Legend-Legende-Legenda-Légend

DIL 10X	Diluent. Probenverdünnungspuffer. Diluyente. Diluyente. Diluant.	PLATE	Solid phase. Mikrotiterplatte. Fase sólida. Fase solida. Phase solide.
CONTROL X	Controll. Kontrolle. Control. Controllo. Contrôle.	CAL X	Calibrator. Kalibrator. Calibrador. Calibratore. Calibrateur.
CONJ	Conjugate. Konjugat. Conjugado. Coniugato. Conjugué.	SUBS PNPP	Substrate. Substrat. Substrat. Sustrato. Substrat.
EXTR SOL 2.5X	Extraction solution. Extraktionpuffer. Solución de extracción. Soluzione di estrazione. Solution d'extraction.	WASH 20X	Washing solution. Waschlösung. Solución de lavado. Soluzione di lavaggio. Solution de lavage.