



BÜHLMANN fCAL®

ELISA

Calprotectin

EK-CAL	96 tests
EK-CAL2	192 tests

Revision date: 2016-12-08

BÜHLMANN LABORATORIES AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234

info@buhlmannlabs.ch

English	page	3
Deutsch	page	9
Français	page	15
Italiano	page	22
Español	page	28
Português	page	34

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN fCAL® ELISA is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid to the assessment of intestinal mucosal inflammation. The assay results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, e.g. Crohn's disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-7), in patients with chronic abdominal pain, above the age of four (ref. 8-9), and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 10-12).

For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The BÜHLMANN fCAL® ELISA allows the selective measurement of calprotectin in fecal extracts by sandwich ELISA. The microtiter plate of the BÜHLMANN fCAL® ELISA is coated with a monoclonal capture antibody (mAb) highly specific to the calprotectin heterodimeric and polymeric complexes (ref.13). Patient fecal sample extracts, controls for determination of ELISA run acceptability, and calibrators are loaded onto wells of the microtiter plate. After a 30 minute incubation at room temperature and washing steps, a detection antibody (Ab) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) detects the calprotectin molecules bound to the capture antibody on the plate. After incubation and further washing steps, the chromogenic HRP substrate, tetramethylbenzidine (TMB) is added (blue color formation) followed by a stopping reaction (change to yellow color). The absorption is measured at 450 nm. The final calprotectin concentration in µg/g stool in the patient samples is determined using the calibration curve generated from the measured calibrator values.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity		Code	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Extraction Buffer	3 bottles x 125 mL	6 bottles x 125 mL	B-CAL-EX	Ready to use
Microtiter Plate precoated with anti-calprotectin mAb	12 x 8 wells	2 x 12 x 8 wells	B-CAL-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces	6 pieces	-	Ready to use
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle x 100 mL	2 bottles x 100 mL	B-CAL-WB	Dilute each with 900 mL of deionized H ₂ O
Incubation Buffer with preservatives	2 bottles x 125 mL	3 bottles x 125 mL	B-CAL-IB	Ready to use
Calibrators A to E^{1) 2)} Calprotectin in a buffer matrix with preservatives	5 vials x 1 mL	5 vials x 1 mL	B-CAL-CASET	Ready to use

Reagents	Quantity		Code	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Control Low / High³⁾ Human serum with preservatives	2 vials x 1 mL	2 vials x 1 mL	B-CAL-CONSET	Ready to use
Enzyme Label Anti-calprotectin Ab conjugated to HRP	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-CAL-EL	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-TMB12	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-STS12	Ready to use Corrosive agent

Table 1

¹⁾ The actual calprotectin concentration of the standards A to E are 4, 12, 40, 120 and 240 ng/mL, respectively. For extraction and subsequent sample dilution, a dilution of 1:2500 was taken into account for the assignment of calibrator A to E. For the lower range ELISA procedure the calibrator values have to be set as: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g calprotectin.

²⁾ If you choose the extended range ELISA procedure the nominal calibrator values have to be set as: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g calprotectin.

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

Table 2

REAGENTS AND MATERIALS SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal Extraction Devices

Fecal extraction devices described in table 3 are not delivered with the kit and either of them has to be ordered with the kit.

CALEX® Cap Device	Package with 50, 200 or 500 tubes respectively, each filled with Extraction Buffer, 5 mL / ready to use	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubes, spatulas, and base caps	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip, 1.3 mL / ready to use	B-CAL-SO50

Table 3

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Extraction Procedure

- 10 µL disposable inoculation loops
- 15 mL polypropylene tubes with screw caps required for standard extraction procedure; extraction devices (see above).
- Laminar flow work station
- Multi tube vortex mixer
- Precision balance (10-150 mg)
- Micro centrifuge (≥3000 x g)
- Centrifuge (≥500 x g)

ELISA Procedure

- 10, 100 and 1000 µL precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder to dilute the Wash Buffer.
- Microtiter plate washer (see Technical Precautions) or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator (see Technical Precautions).
- Blotting paper.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

PRECAUTIONS

Safety Precautions

- The microtiter-plate, calibrators and controls of this test contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practices (GLP) using appropriate precautions.

- **Stop Solution:** The Stop Solution (B-ST512) contains sulfuric acid (0.25 M). The reagent is an irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation / burns can occur.

- Unused solution should be disposed of according to local state and federal regulations.

Technical Precautions

Kit Components

- **Residues in the microtiter plate wells** result from the production process. They are removed in the washing step (assay procedure step 3) and do not affect the results.
- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Allow the reagents to equilibrate to room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Microwells cannot be re-used.

Extraction

- To receive quantitative results it is important to homogenize the stool sample completely with the Extraction Buffer. Avoid contamination at the top of the tube - insoluble (undigested) components can still be in the tube after extraction.

ELISA Procedure

- In the ELISA procedure the washing step is essential to guarantee reproducible results. A minimal incubation time of the Wash Buffer in the wells of at least 20 seconds must be ensured each time.
- When using an automated washer, BÜHLMANN strongly recommends using "plate mode" i.e. each process step (dispense/aspiration) is performed on all of the strips sequentially, before proceeding to the next process step. Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The indicated no. of washing cycles is mandatory to ensure reproducible results.
- Set the plate rotator (shaker) at 450 rpm (<10 Hz). Higher rotation frequency may cause poor dilution linearity at values between 300/900 and 600/1800 µg/g. Orbital rotation instead of reciprocal shaking should be used.

- To ensure a complete antigen/antibody interaction, the incubation time in step 5 must be at least 30 minutes. Moderately longer incubation time (up to 5 minutes) has no influence on the final outcome.
- The Enzyme Label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- A new standard curve must be generated each time the assay is performed. Vertical alignment is recommended.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the concentration of the highest Calibrator, Calibrator E, the sample must be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting total dilution factor must be taken into account for the calculation of results.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

If the extraction devices are used, less than 1 g of native stool specimen is needed for the extraction procedure.

Stool specimens should be collected into plain tubes.

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

Specimen Transport

Stool specimens should be received by the laboratory within 3 days of collection. The specimens may be transported at room temperature (23 °C).

Specimen Storage

Received stool specimens should be stored at 2-8 °C and extracted within 3 days.

Extract Storage

Calprotectin in extracts obtained by the BÜHLMANN CALEX® Cap is stable at room temperature for 3 days, at 2-8°C for 6 days and at -20°C for 18 months.

Calprotectin in extracts obtained by manual weighing method, by BÜHLMANN Smart-Prep or by ScheBo® Quick-Prep™ is stable at 2-8°C for 6 days or at -20°C for 18 months.

STANDARDIZATION

The BÜHLMANN fCAL® ELISA calibrator values are assigned in multiple measurement runs using internal reference material based on human serum and the BÜHLMANN fCAL® ELISA measurement procedure. The calprotectin concentration of the internal reference material was established using purified MRP8/14 from human granulocytes as primary reference material.

STOOL SAMPLE EXTRACTION

Standard extraction procedure

1. Label and weigh (tare) the empty polypropylene tube together with the inoculation loop.
2. Take out 50 to 100 mg of the stool sample by means of the inoculation loop and place it into the pre-weighted tube.

3. Calculate the net amount of sample, break off the inoculation loop and leave the lower part of the loop in the tube.
4. Add Extraction Buffer according to the formula $x \text{ mg stool} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L Extraction Buffer}$ (e.g. 50 mg stool + 2450 μL buffer) to the tube and close the tube.
5. Homogenize the sample on a multi tube vortexer by vigorous shaking (at highest speed) for 30 minutes.
6. Transfer the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge in a microcentrifuge for 5 minutes at 3000 x g.
7. Take the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the ELISA procedure.

Extraction procedures using fecal extraction devices:

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

1. CALEX® Cap Device (Code B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500): The extraction tubes are prefilled with Extraction Buffer.

Important: After extraction, centrifuge the CALEX® Cap Device for 5 minutes at 500-3000 x g and continue with the assay procedure.

2. Fecal Extraction Device Roche (Code 10745804322) or BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).

3. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50): The extraction tubes are prefilled with Extraction Buffer.

Important: After extraction with BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. Alternatively, transfer the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge it in a microcentrifuge for 5 minutes at 3000 x g. Decant the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the assay procedure.

WORKING RANGE

The assay can be performed according to the following procedures – lower or extended range ELISA procedure. Which procedure is to be chosen depends on the expected calprotectin concentration of the samples. For samples up to 600 $\mu\text{g/g}$ choose the lower range procedure (working range 10-600 $\mu\text{g/g}$). If the samples tend to exceed 600 $\mu\text{g/g}$ choose the extended range procedure (working range 30-1800 $\mu\text{g/g}$).

ASSAY PROCEDURE

Important: Allow the reagents to equilibrate to 18-28 °C prior to use. Only dilute stool extracts. Standards and controls are ready to use.

1. Sample dilution option 1:

Working range 10-600 $\mu\text{g/g}$

- 1.1. Manual weighing procedure, Smart Prep, or ScheBo® Quick-Prep™: Dilute the stool extracts 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 20 μL extract and 980 μL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

- 1.2. **CALEX® Cap Device:** Dilute the stool extracts 1:5 with Incubation Buffer (e.g. 100 µL extract and 400 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

**1. Sample dilution option 2:
Working range 30-1800 µg/g**

The working range can be extended by a factor of 3, if you dilute the samples 1:7500 instead of 1:2500. This procedure is recommended, if high calprotectin concentrations are to be expected. The precision, linearity and analytical sensitivity of the extended range ELISA have been validated. The results of the validation (please refer to the performance characteristics section) support the extension of the measuring range to 30-1800 µg/g.

- 5.1 **Manual weighing procedure, Smart Prep, or ScheBo® Quick Prep™:** Dilute the stool extracts 1:150 with Incubation Buffer (e.g. 20 µL extract and 2980 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

- 1.2 **CALEX® Cap Device:** Dilute the stool extracts 1:15 with Incubation Buffer (e.g. 50 µL extract and 700 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and diluted samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs without delay. Store refrigerated.

3. Wash the coated wells twice using at least 300 µL of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

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

- 4a. Pipet 100 µL of Incubation Buffer (Blank) and Pipet 100 µL of Calibrator A-E into the respective wells.
- 4b. Pipet 100 µL of the Low and High Controls into the respective wells.
- 4c. Pipet 100 µL of each diluted sample into the subsequent wells.
5. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 + max. 5 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28 °C (see Technical Precautions – ELISA Procedure).
6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µL of Wash Buffer per well (see Technical Precautions – ELISA Procedure). Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.
7. Pipet 100 µL of Enzyme Label to each well.
8. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 ±5 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28 °C.

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

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

10. Pipet 100 µL of the TMB Substrate Solution to all wells.
11. Cover the plate with a plate sealer, protect the plate from direct light and incubate for 15 ±2 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28 °C.
12. Pipet 100 µL of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 min.
13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS AND CALCULATION

Read the absorbance at 450 nm in a microplate reader for each calibrator, control and sample using a 4 PL fit with blank subtraction and have the concentration of the samples calculated.

Working range 10-600 µg/g

If you choose the lower range ELISA procedure, the calibrator concentrations have to be set as: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g calprotectin. Additional dilution factors (if using a different final dilution than 1:2500) have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to Table 19 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

Working range 30-1800 µg/g

If you choose the extended range ELISA procedure, the following nominal calibrator values have to be set as: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g calprotectin. Additional dilution factors (if using a different final dilution than 1:7500) have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to Table 21 and Figure 5 for typical data (results and standard curve). These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Working range: 10-600 µg/g

Repeatability: 1.8-5.9 % CV

Within-laboratory precision: 5.3 %-10.0 % CV

Repeatability and within-laboratory precision was determined according to the CLSI approved guideline EP5-A2. Nine extracted stool samples were tested in duplicate according to assay procedure in a period of over 20 days. One run per day was performed. The values are presented in Table 20.

Limit of Blank (LoB): <10 µg/g. The Limit of Blank was determined according to CLSI approved guideline EP17-A. Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run with 2 different reagent lots. The OD values were far below that of the lowest Calibrator A (10 µg/g). A cubic spline function was used to extrapolate OD values to calprotectin concentrations in µg/g.

Limit of detection (LoD): <10 µg/g. The Limit of Detection was determined according to CLSI approved guideline EP17-A. Four stool extracts diluted to concentrations below 10 µg/g were tested in 20 replicates in two independent runs with two different reagent lots.

Functional sensitivity: <10 µg/g. Ten stool samples with values between 5.2 and 1254 µg/g calprotectin were assayed 20 times in duplicates in one assay. The % CV and the mean values were calculated for each sample. The functional sensitivity was observed at 15 % CV. The resulting precision profile (Figure 2) confirms that precise measurements can be performed within the whole standard range from 10 to 600 µg/g. The results are presented in Figure 2.

Linearity: 10-600 µg/g. Assay linearity was assessed according to CLSI-approved guideline EP6-A. Four extracted stool samples with concentrations higher than 600 µg/g were diluted in incubation buffer. For each sample up to 17 dilutions in the range of 1:2500 (lowest recommended dilution) up to 1:500000 were performed. Linearity results for one of the extracted stool samples are presented in Figure 3.

Spiking Recovery. Total bias: -1.1 %; Lower Limit of Agreement: -17.5 %, Upper Limit of Agreement: 15.4 %. Four negative extracted stool samples were spiked with increasing amounts of calprotectin from serum specimens. The results are presented in Figure 4.

Working range: 30-1800 µg/g

Intra-Assay Precision: 2.6 %-10.5 % CV. The intra-assay precision was validated by testing 12 extracted stool samples in 20 duplicates within a single run according to the assay procedure. The values are presented in Table 22.

Inter-Assay Precision: 7.8-12.8 % CV. The inter-assay precision of the ELISA was calculated from 5 extracted stool samples. The aliquots were tested according to the assay procedure in 10 different runs by three technicians using 2 kit lots in two different labs. The values are presented in Table 23.

Limit of Blank (LoB): <30 µg/g.

Functional sensitivity: <30 µg/g. The intra-assay precision values obtained for 18 extracted stool samples with values between 10.8 and 2080 µg/g calprotectin were plotted against calprotectin concentration values. The resulting precision profile confirms that precise measurements can be performed within the whole standard range from 30 to 1800 µg/g. The results are presented in Figure 6.

Linearity: 30-1800 µg/g. The assay linearity described for the 10-600 µg/g working range is valid for the 30-1800 µg/g working range. The 30-1800 µg/g working range is achieved by a higher sample dilution (1:7500) and different assignment of nominal calibrator values. Linearity was demonstrated using sample dilutions in the range of 1:2500-1:500000.

Spiking recovery: Total bias: -1.6 %; Lower Limit of Agreement: -11.6 %, Upper Limit of Agreement: 8.5 %. Two negative extracted stool samples were spiked with increasing amounts of calprotectin from serum specimens. The results are presented in Figure 7.

General performance characteristics

High dose hook effect. An extracted stool sample with a calprotectin concentration of 14000 µg/g and a serum sample with a calprotectin concentration of 60000 µg/g, that is 100 times higher than the highest Calibrator E (600 µg/g), were tested undiluted and in serial dilutions. No high dose hook effect was observed. The results for the extracted stool sample are presented in Figure 8.

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

Interfering substances: The susceptibility of the BÜHLMANN fCAL® ELISA to interfering substances such as oral pharmaceuticals, nutritional supplements, hemoglobin and enteropathological microorganisms was assessed according to the CLSI-approved guideline EP7-A2. No interaction with the assay was observed. The values are presented in Table 26 and Table 27.

INTERPRETATION OF RESULTS

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

In a clinical study, fecal calprotectin values of 344 symptomatic patients were compared with endoscopic findings. Endoscopy examination showed 264 patients with functional diseases whereas 80 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulcers, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases) (ref. 5). ROC curve analysis (AUC: 0.962) resulted in an optimal clinical cut-off at 50 µg/g. Applying this cut-off, a clinical sensitivity and specificity of 88.8 % and 93.6 %, respectively can be reached in the differentiation between organic and functional diseases (see Table 24).

Fecal calprotectin levels from adults and children are comparable, whereas levels of newborns can be significantly increased (ref. 9).

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Normal values below 50 µg/g:

Calprotectin values <50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patients with low calprotectin levels are likely not to be in need of invasive procedures to determine the inflammation cause (ref. 5).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:

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

Elevated values above 200 µg/g:

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

The cut-off level suggested for adults (50 µg/g) can also be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref. 8-10).

QUALITY CONTROL

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

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

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

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

PERFORMANCE LIMITATIONS

- Reagents delivered with the BÜHLMANN fCAL® ELISA kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevations in their fecal calprotectin levels.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN fCAL® ELISA ist ein *in vitro* Diagnostest, für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben und ist zur Unterstützung der Beurteilung einer Entzündung der Darmschleimhaut vorgesehen. Die Testergebnisse können zur Unterstützung dienen bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen, entzündlichen Erkrankung des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen; z. B. Morbus Crohn; oder Colitis ulcerosa) von einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (Ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (Ref. 8-9). Die Testergebnisse können auch zur Unterstützung bei der Überwachung entzündlicher Darmerkrankungen (Ref. 10-12) verwendet werden.

Nur zur Verwendung in Laboratorien.

PRINZIP DER METHODE

Der BÜHLMANN fCAL® ELISA ermöglicht die selektive Messung von Calprotectin in Stuhlprobenextrakten mit dem Sandwich-ELISA. Die Mikrotiterplatte des BÜHLMANN fCAL® ELISAs ist mit einem monoklonalen Fängerantikörper beschichtet, der hochspezifisch für die heterodimeren und polymeren Calprotectinkomplexe ist (Ref. 13).

Stuhlprobenextrakte von Patienten, Kontrollen zur Bestimmung der ELISA Messakzeptanz und Kalibratoren werden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte geladen. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und nach den Waschschrritten bindet ein Detektions-Antikörper, der an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, an die Calprotectinmoleküle, die wiederum an die Fängerantikörper auf der Platte gebunden sind. Nach der Inkubation und weiteren Waschschrritten wird das chromogene HRP-Substrat und Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt (Bildung einer blauen Farbe); danach wird die Reaktion gestoppt (Farbumschlag nach gelb). Die Absorption wird bei 450 nm gemessen. Die endgültige Calprotectinkonzentration in µg/g Stuhl in den Patientenproben wird mithilfe der Kalibrierkurve ermittelt, die anhand der gemessenen Kalibratorwerte erstellt worden ist.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge		Art.-Nr	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Extraktionspuffer	3 Flaschen x 125 mL	6 Flaschen x 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Mikrotiterplatte Beschichtet mit anti-Calprotectin mAk	12 x 8 Kavitäten	2 x 12 x 8 Kavitäten	B-CAL-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Säck	6 Stück	-	Gebrauchsfertig

Reagenz	Menge		Art.-Nr	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Waschpuffer Konzentrat 10x Konservierungsstoffe	1 Flasche x 100 mL	2 Flaschen x 100 mL	B-CAL-WB	Jede mit 900 mL deionisier-tem H ₂ O verdünnen
Inkubationspuffer Konservierungsstoffe	2 Flaschen x 125 mL	3 Flaschen x 125 mL	B-CAL-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren A-E^{1) 2)} Calprotectin in proteinhaltigem Puffer; Konservierungsstoffe	5 Röhrchen x 1 mL	5 Röhrchen x 1 mL	B-CAL-CASET	Gebrauchsfertig
Kontrolle tief / hoch³⁾ Humanserum mit Konservierungsstoffen	2 Röhrchen x 1 mL	2 Röhrchen x 1 mL	B-CAL-CONSET	Gebrauchsfertig
Enzym-Marker anti-Calprotectin Ak konjugiert mit HRP	1 Röhrchen x 12 mL	2 Röhrchen x 12 mL	B-CAL-EL	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat-Lösung Citrat-gepufferte TMB Lösung	1 Röhrchen x 12 mL	2 Röhrchen x 12 mL	B-TMB12	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	1 Röhrchen x 12 mL	2 Röhrchen x 12 mL	B-ST512	Gebrauchsfertig korrosiv

Table 4

¹⁾ Die tatsächliche Konzentrationen der Kalibratoren A-E betragen 4, 12, 40, 120 und 240 ng/mL Calprotectin. Für die Extraktion und die Probenverdünnung wurde eine Gesamtverdünnung von 1:2500 bei den Konzentrationen der Kalibratoren A-E bereits berücksichtigt. Für die „Lower Range“ ELISA Variante im unteren Bereich müssen die Kalibratorwerte wie folgt eingestellt werden: 10, 30, 100, 300 und 600 µg/g Calprotectin.

²⁾ Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die nominalen Kalibratorwerte wie folgt eingestellt werden: 30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g Calprotectin.

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

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

Table 5

REAGENZIEN UND MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTlich

Extraktionsbesteck für Stuhlproben

Extraktionsröhrchen zur Stuhlextraktion werden nicht mit diesem Kit mitgeliefert. Eines der in Tabelle 6 beschriebenen Devices muss zusätzlich zum Kit bestellt werden.

CALEX® Cap Device	Packungen zu 50, 200 und 500 Röhrchen, gefüllt mit Extraktionspuffer, 5 mL / gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 Röhrchen, Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, 1.3 mL / gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Table 6

ERFORDERLICHE HILFSMITTEL, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Extraktion

- 10 µL Einweg Impfschlingen
- 15 mL Polypropylen Einwegröhrchen mit Schraubverschluss für die Standardextraktion
- Laminar Flow Arbeitsplatz
- „Multi Tube“ Vortex Mixer
- Präzisionswaage (10-150 mg)
- Mikrozentrifuge (≥3000 x g)
- Zentrifuge (≥500 x g)

ELISA

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 10, 100 und 1000 µL.
- Polystyrol oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Durchführung von Probenverdünnungen.

- 1000 mL Messkolben zur Verdünnung des Waschpuffer Konzentrats.
- Mikrotiterplattenwaschautomat oder Spritzflasche für Waschpuffer (siehe technische Vorsichtsmassnahmen).
- Mikrotiterplattenschüttler (siehe technische Vorsichtsmassnahmen).
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Die Mikrotiterplatte, Kalibratoren und Kontrollen enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss Good Laboratory Practice (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Stopp-Lösung: Die Stopp-Lösung (B-ST12) enthält Schwefelsäure (0.25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spühlen, ansonsten kann eine Reizung oder Verätzungen auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der lokalen gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kit Komponenten

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Kavitäten der Mikrotiterplatten haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Testdurchführung Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- Lesen Sie vor der Testdurchführung die Arbeitsanleitung sorgfältig durch. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden, sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu Kontaminationen zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Kavitäten kommt.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

Extraktion

- Um die Extraktion quantitativ durchzuführen, ist es wichtig, dass die eingewogene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird. Kontaminationen am oberen Rand des Extraktionsröhrchens sollten vermieden werden – unlösliche (unverdaute) Bestandteile können auch nach der Extraktion vorhanden sein.

ELISA

- Die korrekte Durchführung der in der Arbeitsvorschrift beschriebenen Waschschritte ist essentiell, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine minimale Inkubationszeit des Waschpuffers in der Kavität von mindestens 20 Sekunden muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, muss der „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor der nächste Schritt (Absaugen) gestartet wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.
- Die angegebene Anzahl von Waschschritten muss eingehalten werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Der Mikrotiterplattenschüttler muss auf 450 rpm (<10 Hz) eingestellt sein. Eine höhere Rotationsgeschwindigkeit kann zu einer schlechteren Verdünnungslinierität bei Werten zwischen 300/900 und 600/1800 µg/g führen. Eine Rotationsbewegung sollte einer Horizontalbewegung vorgezogen werden.
- Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig ablaufen kann, muss die Inkubationszeit in Schritt 5 mindestens 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkubationszeiten (bis zu 5 Minuten) zeigen keinen Einfluss auf das Endresultat.
- Die als Enzymmarker verwendete Peroxidase (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische chlorierte Kohlenwasserstoffe, die im Wasser vorkommen können. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser von hoher Qualität verwendet werden.
- Die Standardkurve muss bei jedem Testansatz bestimmt werden. „Vertikale Anordnung“ wird empfohlen.
- Falls die Konzentration einer Probe grösser als diejenige des höchsten Kalibrators (E) ist, muss diese Probe mit Inkubationspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Der zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Konzentrationsberechnung dieser Probe berücksichtigt werden.

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Wird Extraktionsbesteck für die Extraktion verwendet, werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden.

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

Transport der Proben

Innerhalb von 3 Tagen nach Gewinnung des Untersuchungsmaterials sollte es vom Labor erhalten werden. Die Proben können bei Raumtemperatur transportiert werden (23 °C).

Lagerung der Proben

Erhaltene Stuhlproben sollten bei 2-8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen extrahiert werden.

Lagerung des Extraktes

Calprotectin in Extrakten, die durch BÜHLMANN CALEX® Cap gewonnen wurden, sind bei Raumtemperatur 3 Tage, bei 2-8°C 6 Tage und bei -20°C 18 Monate stabil.

Calprotectin in Extrakten, die durch manuelle Wiegemethoden, wie BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™, gewonnen wurden, ist bei 2-8°C 6 Tage oder bei -20°C 18 Monate stabil.

STANDARDISIERUNG

Die BÜHLMANN fCAL® ELISA Kalibratorwerte werden in mehrfachen Messdurchgängen mithilfe von internem Referenzmaterial zugewiesen, das auf Humanserum und dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Messverfahren basiert. Die Calprotectinkonzentration des internen Referenzmaterials wurde mithilfe von gereinigtem MRP8/14 aus humanen Granulozyten als primäres Referenzmaterial ermittelt.

STUHLPROBENEXTRAKTION

Standardextraktionsanleitung

1. Die leeren Polypropylenröhrchen beschriften und zusammen mit der Einweg-Impfschlinge austarieren.
2. Mit Hilfe der Impfschlinge 50-100 mg Stuhlprobe entnehmen und in das vorgewogene Röhrchen geben.
3. Das Nettogewicht der entnommenen Probe bestimmen, die Impfschlinge abbrechen und den unteren Teil davon im Röhrchen belassen.
4. Extraktionspuffer entsprechend der Formel
 $x \text{ mg Stuhl} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L Extraktionspuffer}$
(z.B. 50 mg Stuhl + 2450 µL Extraktionspuffer) ins Röhrchen geben und verschliessen.
5. Die Probe in einem Multi-Tube Vortex Mixer durch starkes Schütteln (höchste Geschwindigkeit) 30 Minuten extrahieren.
6. Das Homogenat in ein 2 mL Eppendorf Röhrchen überführen und für 5 Min bei 3000 x g in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
7. Den Überstand in ein frisches, beschriftetes Röhrchen geben und den ELISA durchführen.

Extraktion unter Verwendung von Stuhlextraktionsbesteck

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

1. CALEX® Cap Device (Code: B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500): Die Extraktionsröhrchen sind mit 5 mL Extraktionspuffer gefüllt.

Wichtig: Nach der Extraktion werden die Extraktionsröhrchen 5 Minuten bei 500-3000 x g zentrifugiert. Danach mit der Testdurchführung fortfahren.

2. Fäkales Extraktionsbesteck (Code: 10745804322) oder BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).
3. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50): Die Extraktionsröhrchen sind vorgefüllt mit Extraktionspuffer.

Wichtig: Nach der Extraktion mit Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ werden die Röhrchen 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Alternativ wird das Homogenat in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 3000 x g in einer Mikrofuge zentrifugiert. Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen überführen und mit der Testdurchführung fortfahren.

MESSBEREICHE

Der Test kann entweder nach der Anleitung für den unteren Konzentrationsbereich „Lower Range“ ELISA Variante oder der Anleitung für den erweiterten Messbereich „Extended Range“ ELISA Variante durchgeführt werden. Welche Version Sie wählen sollten, hängt von der erwarteten Calprotectin Konzentration der Proben ab. Für Proben bis zu 600 µg/g sollte die Anleitung für den Messbereich 10-600 µg/g verwendet werden. Wenn die Konzentration der Proben jedoch häufig oberhalb von 600 µg/g liegt, raten wir zu der Anleitung für den erweiterten Messbereich 30-1800 µg/g.

TESTDURCHFÜHRUNG

Wichtig: Die Reagenzien sollten vor der Verwendung auf eine Temperatur von 18-28 °C äquilibriert werden. Nur die Stuhlextrakte verdünnen. Kalibratoren und Kontrollen sind gebrauchsfertig.

1. Option 1 für die Probenverdünnung: Messbereich 10-600 µg/g

1.1 Manuelle Einwaage, Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 980 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und, vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen.

1.2 CALEX® Cap Device: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:5 verdünnen (z.B. 100 µL Extrakt + 400 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen.

1. Option 2 für die Probenverdünnung: Messbereich 30–1800 µg/g

Der Messbereich kann um einen Faktor von 3 erweitert werden, wenn die Proben 1:7500 statt 1:2500 verdünnt werden. Diese Testversion wird empfohlen, wenn hohe Calprotectinkonzentrationen zu erwarten sind. Die Präzision, Linearität und analytische Empfindlichkeit des erweiterten ELISA-Bereichs wurde validiert. Die Ergebnisse der Validierung (Siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“) unterstützen die Erweiterung des Messbereichs auf 30-1800 µg/g.

1.1 Manuelle Einwaage, Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:150

verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 2980 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen.

1.2` 1.2. CALEX® Cap Device: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:15 (z.B. 50 µL Extrakt + 700 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen.

2. Eine Mikrotiterplatte mit ausreichender Menge an Streifen für die Bestimmung von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben bestücken. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und unverzüglich mit Trockenmittel einpacken und gekühlt lagern.

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

Wichtig: Eine minimale Inkubationszeit des Waschpuffers in der Kavität von 20 Sekunden muss bei allen drei Waschsritten eingehalten werden (siehe technische Vorsichtsmassnahmen - ELISA).

4a. 100 µL Inkubationspuffer (Blank) in die entsprechende Kavität pipettieren.

Je 100 µL Kalibrator A-E in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

4b. Je 100 µL Kontrolle tief und hoch in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

4c. Je 100 µL der verdünnten Proben in die nächsten Kavitäten pipettieren.

5. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm 30 + max. 5 Minuten bei 18-28 °C inkubieren (siehe technische Vorsichtsmassnahmen - ELISA).

6. Abdeckfolie entfernen, die Kavitäten entleeren und 3 x mit jeweils mind. 300 µL Waschpuffer waschen (siehe technische Vorsichtsmassnahmen - ELISA). Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

7. 100 µL Enzym-Marker zu allen Kavitäten zugeben.

8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm 30 ±5 Min bei 18-28 °C inkubieren.

9. Abdeckfolie entsorgen, die Kavitäten entleeren und 5 x mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

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

10. 100 µL TMB-Substrat zu jeder Kavität zugeben.

11. Mikrotiterplatte zudecken und 15 ±2 Min bei 18-28 °C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.

12. 100 µL Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und vorhandene Luftbläschen mit Pipettenspitzen entfernen. Innerhalb der nächsten 30 Minuten mit Schritt 13 fortfahren.

13. Optische Dichte in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen.

ERGEBNISSE UND BERECHNUNGEN

Messen Sie die Extinktion bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer für Kalibratoren, Kontrollen und Proben unter Verwendung eines 4PL Auswertemodus und Blankabzug.

Messbereich 10-600 µg/g

Wenn Sie die „Lower Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die Kalibratorkonzentrationen wie folgt eingestellt werden: 10, 30, 100, 300 und 600 µg/g Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren (bei Verwendung einer anderen Verdünnung als 1:2500) müssen für den Erhalt der endgültigen Ergebnisse mit den Ergebnissen multipliziert werden.

In der Tabelle 19 und Abbildung 1 werden Beispiele für Ergebnisse und die Standardkurve gezeigt. Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.

Messbereich 30-1800 µg/g

Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die folgenden nominalen Kalibratorwerte eingestellt werden: 30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren (bei Verwendung einer anderen Verdünnung als 1:7500) müssen für den Erhalt der endgültigen Ergebnisse mit den Ergebnissen multipliziert werden.

In Tabelle 21 und Abbildung 5 sind Beispiele für Ergebnisse und die Standardkurve angegeben. Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.

LEISTUNGSMERKMALE

Messbereich: 10-600 µg/g

Wiederholbarkeit: 1.8-5.9 % CV

Intra-Assay Präzision: 5.3 %-10.0 % CV

Wiederholbarkeit und Intra-Assay Präzision wurden gemäß der CLSI Richtlinie EP5-A2 bestimmt. Neun extrahierte Stuhlproben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung über einen Zeitraum von 20 Tagen in Duplikaten geprüft. Pro Tag wurde eine Messung durchgeführt. Die Werte sind in Tabelle 20 dargestellt.

Limit of Blank (LoB): <10 µg/g. Die Nachweisgrenze (LoB) wurde gemäß der CLSI Richtlinie EP17-A bestimmt. Zwanzig Duplikate des Inkubationspuffers wurden in einer Einzelanalyse mit 2 unterschiedlichen Reagenzien-Lots geprüft. Die OD-Werte lagen weit unterhalb des Kalibrators A mit der niedrigsten Konzentration (10 µg/g). Eine kubische Spline-Funktion wurde verwendet, um die OD-Werte auf die Calprotectinkonzentrationen in µg/g zu extrapolieren.

Limit of Detection (LoD): <10 µg/g. Die Nachweisgrenze (LoD) wurde gemäß der CLSI Richtlinie EP17-A bestimmt. Vier Stuhlextrakte wurden auf Konzentrationen unter 10 µg/g verdünnt und in 20 Replikaten in zwei voneinander

unabhängigen Einzelanalysen mit zwei unterschiedlichen Reagenzien-Lots geprüft.

Funktionelle Empfindlichkeit: <10 µg/g. Zehn Stuhlproben mit Werten zwischen 5.2 und 1254 µg/g Calprotectin wurden in einem Test 20 Mal in Duplikaten getestet. Der % CV und die Mittelwerte wurden für jede Probe berechnet. Die funktionelle Empfindlichkeit wurde bei 15 % CV beobachtet. Das daraus resultierende Präzisionsprofil (Abbildung 2) bestätigt, dass innerhalb des gesamten Standardbereichs von 10 bis 600 µg/g präzise Messungen durchgeführt werden können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Linearität: 10-600 µg/g. Die Testlinearität wurde gemäß der CLSI Richtlinie EP6-A beurteilt. Vier extrahierte Stuhlproben mit Konzentrationen oberhalb von 600 µg/g wurden im Inkubationspuffer verdünnt. Für jede Probe wurden bis zu 17 Verdünnungen im Bereich von 1:2500 (niedrigste empfohlene Verdünnung) bis zu 1:500000 durchgeführt. Linearitätsergebnisse von einer der extrahierten Stuhlproben sind in Abbildung 3 dargestellt.

Wiederfindung:

Gesamte systematische Messabweichung: -1.1 %; Untere Grenze der Übereinstimmung: -17.5 %; Obere Grenze der Übereinstimmung: 15.4 %. Vier negative extrahierte Stuhlproben wurden mit ansteigenden Mengen von Calprotectin aus Serumproben versetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Messbereich: 30-1800 µg/g

Intra-Assay-Präzision: 2.6 %-10.5 % CV. Die Intra-Assay-Präzision wurde durch Prüfung von 12 extrahierten Stuhlproben in 20 Duplikaten innerhalb einer Einzelanalyse entsprechend der Testdurchführung validiert. Die Werte sind in der Tabelle 22 dargestellt.

Intra-Assay-Präzision: 7.8-12.8 % CV. Die Inter-Assay-Präzision des ELISA-Tests wurde anhand von 5 extrahierten Stuhlproben berechnet. Die Aliquote wurden entsprechend der Testdurchführung in 10 unterschiedlichen Messungen von drei Technikern mit 2 Kit-Lots in zwei unterschiedlichen Labors getestet. Die Werte werden in der Tabelle 23 angegeben.

Limit of Blank (LoB): <30 µg/g.

Funktionelle Empfindlichkeit: <30 µg/g. Die für 18 extrahierte Stuhlproben erhaltenen Werte der Intra-Assay-Präzision, mit Werten zwischen 10.8 und 2080 µg/g Calprotectin, wurden gegen die Konzentrationswerte von Calprotectin aufgetragen. Das daraus resultierende Präzisionsprofil bestätigt, dass innerhalb des gesamten Standardbereichs von 30 bis 1800 µg/g präzise Messungen durchgeführt werden können. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 6 dargestellt.

Linearität: 30-1800 µg/g. Die für den Messbereich von 10-600 µg/g beschriebene Test-Linearität ist für den Messbereich von 30-1800 µg/g gültig. Der Messbereich von 30-1800 µg/g wird durch eine größere Probenverdünnung (1:7500) und eine andere Zuweisung der nominalen Kalibratorwerte erreicht. Die Linearität wurde mit

Probenverdünnungen im Bereich von 1:2500-1:500000 nachgewiesen.

Wiederfindung:

Gesamte systematische Messabweichung: -1.6 %;
Untere Grenze der Übereinstimmung: -11.6 %;
Obere Grenze der Übereinstimmung: 8.5 %. Zwei negative extrahierte Stuhlproben wurden mit ansteigenden Mengen von Calprotectin aus Serumproben versetzt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt.

Allgemeine Leistungseigenschaften

Hook-Effekt bei hohen Dosen. Eine extrahierte Stuhlprobe mit einer Calprotectinkonzentration von 14000 µg/g und eine Serumprobe mit einer Calprotectinkonzentration von 60000 µg/g, die 100 Mal höher als die höchste Konzentration von Kalibrator E ist (600 µg/g), wurden unverdünnt und in einer seriellen Verdünnung geprüft. Es wurde kein Hook-Effekt bei hohen Dosen beobachtet. Die Ergebnisse der extrahierten Stuhlprobe sind in Abbildung 8 dargestellt.

Kreuzreaktivität: <0.1 %. Mit verschiedenen Mengen von rekombinierten MRP8 und MRP14 versetzter Inkubationspuffer wurde entsprechend der Testdurchführung gemessen. Die Werte sind in Tabelle 25 dargestellt.

Störsubstanzen: Die Empfindlichkeit des BÜHLMANN fCAL® ELISA gegenüber Störsubstanzen, wie beispielsweise oral anwendbaren Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmitteln, Hämoglobin und enteropathologischen Mikroorganismen, wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP7-A2 beurteilt. Es wurde keine Wechselwirkung mit dem Test beobachtet. Die Werte werden in Tabelle 26 und Tabelle 27 angegeben.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

In einer klinischen Studie wurden fäkale Calprotectinwerte von 344 symptomatischen Patienten mit endoskopischen Ergebnissen verglichen.

Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 264 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 80 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen) (Ref. 5).

Die ROC Analyse (AUC: 0.962) ergab einen optimalen klinischen Cut off von 50 µg/g Calprotectin. Bei Anwendung dieses Grenzwertes kann eine klinische Spezifität von 88.8 % und eine Sensitivität von 93.6 % erreicht werden. (siehe Tabelle 24).

Calprotectinwerte von Erwachsenen und Kindern sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 9).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Normalwerte unter 50 µg/g:

Calprotectinwerte <50 µg/g schliessen eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes weitgehend aus. Bei niedrigen Calprotectinwerten bedarf es in der Regel keiner invasiven Untersuchungen, um die Ursache der Erkrankung zu bestimmen (Ref. 5).

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 µg/g:

Calprotectinwerte zwischen 50 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Die geringe Entzündungsaktivität innerhalb dieses Bereiches, empfiehlt eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte über 200 µg/g:

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

Der für Erwachsene empfohlene Cut-off Wert von 50 µg/g kann auch für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden, unabhängig von deren Geschlecht (Ref. 8-10).

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

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

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.
- Testergebnisse sollten in Verbindung mit in einer klinischen Beurteilung des Patienten gewonnenen Informationen und sonstigen Diagnoseverfahren ausgewertet werden.
- Patienten, die regelmäßig NSAIDs einnehmen, haben möglicherweise erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl.

UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN fCAL® ELISA est un test diagnostique *in vitro* de dosage quantitatif de la calprotectine dans les échantillons de selles humaines. Son but est d'aider à évaluer l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale. Les résultats de l'essai peuvent contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer – chez les patients de plus de quatre ans souffrant de douleurs abdominales chroniques (réf. 8-9) – une maladie inflammatoire du tractus gastro-intestinal de type organique (maladie inflammatoire chronique de l'intestin MICI, par ex. maladie de Crohn ou recto-colite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome de l'intestin irritable, SII) (réf. 1-7) et, d'autre part, au suivi d'une MICI (réf. 10-12).

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

La trousse BÜHLMANN fCAL® ELISA permet de mesurer de façon sélective la calprotectine dans des extraits fécaux au moyen d'un dosage ELISA de type sandwich. La microplaque du test BÜHLMANN fCAL® ELISA est recouverte à l'aide d'un anticorps de capture monoclonal (Acm) hautement spécifique vis-à-vis des complexes hétérodimères et polymères de calprotectine (réf. 13). On dépose sur les puits de la microplaque les extraits d'échantillons fécaux du patient, les témoins permettant de déterminer l'acceptabilité du dosage ELISA ainsi que des calibrateurs. À l'issue d'une incubation de 30 minutes à température ambiante et d'étapes de lavage, un anticorps (Ac) de détection conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) met en évidence les molécules de calprotectine liées à l'anticorps de capture sur la microplaque. Après l'incubation et d'autres étapes de lavage, on ajoute le substrat chromogène de la HRP, la tétraméthylbenzidine (TMB) (formation d'une coloration bleue) puis une solution qui arrête la réaction (la coloration vire au jaune). On mesure l'absorption à 450 nm. À partir de la courbe d'étalonnage établie avec les valeurs de mesure des calibrateurs, on détermine la concentration finale de calprotectine, en µg/g de selles, dans les échantillons du patient.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité		Code	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampon d'extraction	3 flacons de 125 mL	6 flacons de 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Microplaque Coatée avec un Acm anti-calprotectine	12 x 8 puits	2 x 12 x 8 puits	B-CAL-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces	6 pièces	-	Prête à l'emploi
Tampon de lavage concentré 10x Avec conservateurs	1 flacon de 100 mL	2 flacons de 100 mL	B-CAL-WB	A reconstituer avec 900 mL d'eau déionisée (chacun)

Réactifs	Quantité		Code	Reconstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampon d'incubation Avec conservateurs	2 flacons de 125 mL	3 flacons de 125 mL	B-CAL-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A-E ^{1) 2)} Calprotectine dans un tampon protéique avec conservateurs	5 flacons de 1 mL	5 flacons de 1 mL	B-CAL-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé ³⁾ Sérum humain avec conservateurs	2 flacons de 1 mL	2 flacons de 1 mL	B-CAL-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-calprotectine conjugué à la HRP	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-CAL-EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB Solution de TMB dans un tampon citrate	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-TMB12	Prêt à l'emploi
Solution stop 0,25 M H ₂ SO ₄	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-ST512	Prête à l'emploi corrosif

Table 7

¹⁾ Les concentrations actuelles de calprotectine des calibrateurs A à E sont respectivement : 4, 12, 40, 120 et 240 ng/mL. Après extraction et dilution de l'échantillon, une dilution à 1:2500 est prise en compte pour la détermination des calibrateurs A à E. Dans le cas de la procédure ELISA sur la gamme la plus basse, les valeurs des calibrateurs doivent être les suivantes : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine.

²⁾ Si l'utilisateur choisit la procédure ELISA sur la gamme étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être les suivantes : 30, 90, 300, 900 et 1 800 µg/g de calprotectine.

³⁾ Les concentrations en calprotectine humaine native des contrôles varient en fonction des lots. Veuillez-vous référer à la fiche de contrôle qualité pour les concentrations effectives.

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

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

Table 8

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

Tubes d'extraction de selles

Les tubes d'extraction de selles décrits ci-après ne sont pas inclus dans le kit. Ils peuvent être commandés en même temps que le kit.

CALEX® Cap Device	Unités à 50, 200 ou 500 dispositifs ré-remplis avec 5 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubes, spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes comprenant chacun cône & embout du doseur, pré-remplis avec 1.3 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CAL-SO50

Table 9

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Procédure d'extraction

- Anses d'inoculation jetables de 10 µL
- Tubes de 15 mL en polypropylène avec bouchons à visser pour la procédure d'extraction standard ou tubes d'extraction (voir ci-dessus).
- Hotte à flux laminaire
- Agitateur Multi- tubes ou vortex
- Balance de précision (10-150 mg)
- Micro centrifugeuse (≥3000 x g)
- Centrifugeuse (≥500 x g)

Procédure de l' ELISA

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

PRÉCAUTIONS

Précautions de sécurité

- Les barrettes de la microplaque, les calibrateurs et les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler

conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), en prenant les précautions appropriées.

- **Solution Stop:** La Solution stop (B-STS12) contient de l'acide sulfurique (0,25 M). Le réactif est irritant pour les yeux, la peau et les membranes muqueuses. Éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact avec les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
- **Réactifs :** Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les membranes muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement avec beaucoup d'eau ; si cette mesure n'est pas suivie, une irritation / des brûlures peuvent survenir.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des déchets, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

Précautions techniques

Réactifs

- Les puits de la microplaque peuvent être recouverts de résidus formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Laisser les réactifs s'équilibrer à température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les puits de la microplaque sont à usage unique.

Extraction

- Dans le but d'obtenir des résultats quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'intégralité des selles pesées dans le tampon d'extraction. Il convient également d'éviter de contaminer le bouchon du tube. Les substances non dissoutes (non digérées) peuvent persister dans les tubes après l'extraction.

Procédure de l' ELISA

- Le lavage est un point important de l'ELISA. Pour garantir la reproductibilité des résultats il est nécessaire que le tampon de lavage incube à chaque fois au minimum 20 secondes dans les puits de la plaque.

- Les laboratoires BÜHLMANN recommandent, lors de l'utilisation d'un laveur de plaque automatique, le choix du mode "Plaque" avec lequel chaque étape (remplissage/aspiration) est effectuée de façon séquentielle par barrette avant de passer à l'étape suivante. De cette façon le temps d'incubation minimum est garanti.
- Il est obligatoire de respecter le nombre de cycles de lavage pour l'obtention de résultats fiables.
- L'agitateur de plaque doit être réglé à 450 rpm (<10 Hz). Une fréquence de rotation supérieure peut avoir pour conséquence une faible linéarité de dilution pour les valeurs comprises entre 300/900 et 600/1800 µg/g. Le mode orbital est préférable au mode réciproque.
- Le temps d'incubation de l'étape 5 ne doit pas être inférieur à 30 minutes pour assurer l'interaction complète entre l'antigène et l'anticorps. Des temps d'incubation un peu plus longs (jusqu'à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- L'enzyme (HRP) utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoture de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée.
- Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que celui du calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte pour le calcul de la concentration effective.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La mise en œuvre de la procédure nécessite moins que 1 g d'échantillon natif de selles pour chaque extraction.

Les échantillons de selles doivent être recueillis dans des tubes lisses.

Important : Les échantillons doivent être prélevés sans aucune addition chimique ou biologique.

Transport des échantillons

Les échantillons de selles doivent être réceptionnés au laboratoire jusqu'à 3 jours après leur recueil. Le transport peut être réalisé à température ambiante (23°C).

Conservation des échantillons

Les échantillons de selles réceptionnés doivent être conservés entre 2 et 8°C et extraits dans les 3 jours.

Conservation des extraits

La calprotectine présente dans les extraits obtenus à l'aide du dispositif d'extraction CALEX® Cap est stable à température ambiante pendant 3 jours, entre 2 et 8°C pendant 6 jours ou à -20°C pendant 18 mois.

La calprotectine présente dans les extraits obtenus par méthode de pesée ou à l'aide des dispositifs d'extraction BÜHLMANN Smart-Prep ou Schebo® Quick-Prep™, est stable entre 2 et 8°C pendant 6 jours ou à -20°C pendant 18 mois.

STANDARDISATION

Les valeurs des calibrateurs du test BÜHLMANN fCAL® ELISA sont déterminées au cours de mesures multiples effectuées selon la procédure de l'essai BÜHLMANN fCAL® ELISA sur un matériel de référence interne à base de sérum humain. La concentration de calprotectine dans ce matériel de référence a été établie à partir de MRP8/14 purifiée, le matériel de référence de base pour la purification de cette protéine étant constitué de granulocytes humains.

EXTRACTION DES ECHANTILLONS

Procédure d'extraction standard

1. Marquer et peser les tubes en polypropylène avec l'anse d'inoculation jetable.
2. Prélever 50 à 100 mg d'échantillon de selles décongelées au moyen de l'anse d'inoculation et transférer l'anse dans le tube pré-pesé.
3. Déterminer la quantité nette d'échantillon, casser l'anse et laisser sa partie inférieure dans le tube.
4. Ajouter le tampon d'extraction selon la formule
 $x \text{ mg de selles} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L de tampon d'extraction}$
 (par ex. 50 mg de selles + 2450 µL tampon d'extraction) dans le tube et le fermer.
5. Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un agitateur multi-tubes pendant 30 minutes à vitesse maximale.
6. Transférer l'extrait obtenu dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une micro centrifugeuse durant 5 minutes à 3000 x g.
7. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA.

Procédure d'extraction à l'aide des tubes d'extraction de selles

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

1. Tube d'extraction CALEX® Cap (réf. : B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500) : les tubes d'extraction sont pré-remplis avec le tampon d'extraction.

Important: À l'issue de l'extraction, centrifuger le dispositif CALEX® Cap pendant 5 minutes à 500-3 000 x g et procéder à l'essai.

2. Tubes d'extraction de selles (réf. 10745804322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (réf. : B-CAL-RD) .
3. ScheBo® Quick-Prep™ (réf. : B-CAL-SO50) : les tubes d'extraction sont pré-remplis avec le tampon d'extraction.

Important: Après extraction avec Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ centrifuger les tubes 5 minutes à 3000 x g. L'extrait peut aussi être transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et centrifugé à l'aide d'une micro-centrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA.

GAMME DE DOSAGE ELISA

Le dosage peut être mis en œuvre selon la procédure ELISA standard ou étendue. Le choix dépend de la concentration en calprotectine des échantillons. Pour les échantillons dont la concentration ne dépasse pas 600 µg/g, suivez la procédure ELISA standard (10-600 µg/g). Si la concentration des échantillons tend à dépasser 600 µg/g, suivez la procédure ELISA étendue (30-1800 µg/g).

PROCÉDURE D'ESSAI

Important: Les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (18-28 °C) avant utilisation. Seuls les échantillons de selles doivent être dilués. Calibrateurs et contrôles sont prêts à l'emploi.

1. Dilution de l'échantillon option 1 : Gamme de dosage 10-600 µg/g

1.1. Procédure de pesée manuelle, Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : diluer les surnageants au 1/50ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 20 µL d'extrait et 980 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28 °C) avant de réaliser l'étape 4c.

1.2. Dispositif CALEX® Cap : diluer les surnageants au 1/5ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 100 µL d'extrait et 400 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de réaliser l'étape 4c.

1. Dilution de l'échantillon option 2 : Gamme de dosage 30-1800 µg/g

La gamme de dosage peut être étendue d'un facteur 3, si les échantillons sont dilués au 1/7500ème au lieu de 1/2500ème. Cette procédure est recommandée lorsque des valeurs élevées de calprotectine fécale sont attendues. La fidélité, la linéarité et la sensibilité analytique du test ELISA gamme étendue ont été validées. Les résultats de la validation (voir la rubrique Caractéristiques de performance) sont favorables à une plage de mesures s'étendant de 30 à 1800 µg/g.

1.1 Procédure de pesée manuelle, Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : diluer les surnageants au 1/150ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 20 µL d'extrait et 2980 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28 °C) avant de réaliser l'étape 4c.

1.2 Dispositif CALEX® Cap : diluer les surnageants au 1/15ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 50 µL d'extrait et 700 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28 °C) avant de réaliser l'étape 4c.

2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du support et les placer immédiatement au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.

3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µL de tampon de lavage. Vider les puits et taper énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

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

4a. Distribuer 100 µL de tampon d'incubation (blanc) dans les puits respectif.

Distribuer 100 µL de calibrateur A-E dans les puits respectifs.

4b. Distribuer 100 µL de contrôles bas et élevé dans les puits respectifs.

4c. Distribuer 100 µL de chaque échantillon dilué dans les puits suivants.

5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un des films adhésifs fournis et incuber à 18-28 °C pendant 30 +5 min sur un agitateur de microplaque réglé à 450 rpm (se référer aux précautions techniques, procédure de l'ELISA).

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

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

8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber à 18-28 °C durant 30 ±5 min sur un agitateur de microplaques réglé à 450 rpm.

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

Important : laisser le substrat TMB s'équilibrer à une température de 18-28 °C.

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

11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber sur l'agitateur à 450 rpm pendant 15 ±2 min à 18-28 °C. Protéger la microplaque de la lumière directe.

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

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

RÉSULTATS ET CALCUL

Lire l'absorbance à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque, pour chaque calibrateur, contrôle et échantillon. Utiliser un modèle de régression logistique à 4 paramètres en soustrayant le blanc et calculer les concentrations en calprotectine fécale des échantillons.

Gamme de dosage 10-600 µg/g

Si vous optez pour la procédure domaine de valeurs basses, les concentrations des calibrateurs doivent être les suivantes : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par des facteurs de dilution supplémentaires (si vous utilisez une dilution finale autre que 1 :2500) en vue de l'obtention des résultats finaux.

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans la tableau 19 (résultats) et la figure 1 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau set d'échantillons à doser.

Gamme de dosage 30-1800 µg/g

Si vous optez pour la procédure plage de mesure étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être les suivantes : 30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par des facteurs de dilution supplémentaires (si vous utilisez une dilution finale autre que 1 :7 500) en vue de l'obtention des résultats finaux.

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans la tableau 21 (résultats) et la figure 5 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau set d'échantillons à doser.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Gamme de dosage : 10-600 µg/g

Répétabilité : CV entre 1,8 % et 5,9 %

Fidélité intra-laboratoire : CV entre 5,3 % et 10,0 %

La répétabilité et la fidélité intra-laboratoire ont été déterminées selon la ligne directrice EP5-A2 approuvée par le CLSI. Neuf échantillons d'extraits de selles ont été testés en double selon la procédure de dosage au cours d'une période de plus de 20 jours, à raison d'une analyse par jour. Les valeurs sont présentées dans la tableau 20.

Limite de blanc (LdB) : <10 µg/g. La limite de blanc a été déterminée selon la ligne directrice EP17-A approuvée par le CLSI. Vingt duplicatas de tampon d'incubation ont été dosés au cours d'une même analyse, avec 2 différents lots de réactifs. Les valeurs de DO se sont avérées beaucoup plus basses que celle du plus faible calibrateur A (10 µg/g). Une fonction spline cubique a été utilisée pour procéder à une extrapolation des valeurs de DO en concentrations de calprotectine, exprimées en µg/g.

Limite de détection (LdD): <10 µg/g. La limite de détection a été déterminée selon la ligne directrice EP17-A approuvée par le CLSI. Quatre extraits de selles dilués à des concentrations inférieures à 10 µg/g ont été testés en 20 duplicatas dans deux analyses indépendantes avec deux différents lots de réactifs.

Sensibilité fonctionnelle : <10 µg/g. Dix échantillons de selles présentant des valeurs comprises entre 5,2 et 1254 µg/g de calprotectine ont été dosés 20 fois en double au cours d'un seul essai. Pour chaque échantillon, ont été calculées la valeur de CV en % et la moyenne. La sensibilité fonctionnelle a été observée comme correspondant à un CV de 15 %. Le profil de fidélité résultant (figure 2) confirme que des mesures précises peuvent être réalisées à l'intérieur de la totalité de la plage standard comprise entre 10 et 600 µg/g. Les résultats sont présentés sur la figure 2.

Linéarité : 10-600 µg/g La linéarité de l'essai a été évaluée selon la ligne directrice EP6-A approuvée par le CLSI. Quatre échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations supérieures à 600 µg/g ont été dilués dans du tampon d'incubation. Pour chaque échantillon, jusqu'à 17 dilutions dans la plage 1:2500 (plus faible dilution recommandée) à 1:500000 ont été réalisées. Les résultats de linéarité pour l'un des échantillons d'extrait de selles sont présentés sur la figure 3.

Test de récupération. Biais total : -1.1 % ; Limite inférieure d'agrément : -17.5 % ; Limite supérieure d'agrément : 15.4 %. Quatre échantillons d'extraits de selles négatifs ont été artificiellement contaminés avec des quantités croissantes de calprotectine provenant de spécimens sériques. La figure 4 rassemble les résultats obtenus.

Gamme de dosage : 30-1800 µg/g

Fidélité intra-essai : CV entre 2.6 % et 10.5 %. La fidélité intra-essai a été validée par le test de 12 échantillons d'extraits de selles en 20 duplicatas au cours d'un même essai effectué selon la procédure de dosage. Les valeurs sont présentées dans la tableau 22.

Fidélité inter-essais : CV entre 7.8 % et 12.8 % La fidélité inter-essais du test ELISA a été calculée à partir de 5 échantillons d'extraits de selles. Trois techniciens ont testé les aliquotes en 10 analyses distinctes, en se conformant à la procédure de dosage et en utilisant 2 lots de trousse dans deux laboratoires différents. Les valeurs sont présentées dans la tableau 23.

Limite de blanc (LdB) : <30 µg/g.

Sensibilité fonctionnelle : <30 µg/g. Les valeurs de fidélité intra-essai obtenues dans le cas de 18 échantillons d'extraits de selles avec des valeurs comprises entre 10.8 et 2080 µg/g de calprotectine ont été représentées graphiquement en fonction des concentrations en calprotectine. Le profil de fidélité résultant confirme que des mesures précises peuvent être réalisées à l'intérieur de la totalité de la plage standard comprise entre 30 et 1800 µg/g. Les résultats apparaissent dans la figure 6.

Linéarité : 30-1800 µg/g. La linéarité de l'essai décrite pour la gamme de dosage 10-600 µg/g est valable pour la gamme 30-1800 µg/g. La gamme de dosage 30-1 800 µg/g est obtenue au moyen d'une dilution plus élevée (1:7500) des échantillons et d'une détermination différente des valeurs nominales des calibrateurs. La linéarité a été démontrée par l'utilisation de dilutions des échantillons dans la plage 1:2500-1:500000.

Test de récupération. Biais total : -1.6 % ; Limite inférieure d'agrément : -11.6 % ; Limite supérieure d'agrément : 8.5 %. Deux échantillons d'extraits de selles négatifs ont été artificiellement contaminés avec des quantités croissantes de calprotectine provenant de spécimens sériques. Les résultats apparaissent dans la figure 7.

Caractéristiques de performance générales

Effet crochet à haute concentration. Un échantillon d'extrait de selles présentant une concentration en calprotectine de 14000 µg/g ainsi qu'un échantillon de sérum présentant une concentration en calprotectine de 60000 µg/g, soit 100 fois plus élevée que celle du calibrateur le plus élevé (E, 600 µg/g), ont été testés sous forme non diluée et sous forme de dilutions en série. Aucun effet crochet à haute concentration n'a été observé. Les résultats de l'échantillon d'extrait de selles sont présentés sur la figure 8.

Réactions croisées : <0.1 %. Des échantillons de tampon d'incubation additionné de différentes concentrations de protéines recombinées MRP8 et MRP14 ont été mesurés selon la procédure de dosage. Les valeurs sont rassemblées dans la tableau 25.

Substances interférentes : La sensibilité du BÜHLMANN fCAL® ELISA aux substances interférentes telles que médicaments par voie orale, compléments nutritionnels, hémoglobine et micro-organismes entéropathologiques a été évaluée selon la ligne directrice EP7-A2 approuvée par le CLSI. Aucune interaction avec l'essai n'a été observée. Les valeurs sont présentées dans les tableau 26 et 27.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La méthode d'estimation de calprotectine dans les selles est fiable et facile à utiliser pour différencier les maladies gastro-intestinales organiques des maladies gastro-intestinales fonctionnelles.

Au cours d'une étude clinique, les valeurs de calprotectine fécale de 344 patients symptomatiques ont été comparées aux résultats des investigations endoscopiques.

L'examen endoscopique a montré que 264 patients présentent des maladies fonctionnelles alors que 80 patients présentent des maladies organiques diverses (colites, maladie de Crohn, ulcères, diverticules, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses) (réf. 5).

L'analyse de la courbe ROC (aire sous la courbe ASC : 0.962) montre une valeur seuil clinique optimale à 50 µg/g. En appliquant cette valeur seuil, une sensibilité clinique et une spécificité, respectivement, de 88.8 % et 93.6 %, ont été atteintes dans la différenciation des maladies organiques et fonctionnelles (voir tableau 24).

La concentration de calprotectine dans les selles est comparable chez les adultes et les enfants, tandis qu'elle peut augmenter de façon significative chez les nouveau-nés (réf. 9).

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

Valeurs normales inférieures à 50 µg/g:

Des valeurs de calprotectine <50 µg/g excluent une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les patients ayant une faible concentration de calprotectine fécale ne nécessitent donc pas d'intervention invasive pour déterminer la cause de l'inflammation (ref. 5).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g:

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

Valeurs élevées supérieures à 200 µg/g:

Des valeurs de calprotectine >200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires sous le suivi de médecins spécialistes.

La valeur seuil proposée pour les adultes (50 µg/g) peut également être utilisée comme référence chez les enfants âgés de 4 à 17 ans, quel que soit le sexe (ref. 8-10).

CONTROLE QUALITE

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

Comme il n'existe pas de contrôle pour la calprotectine commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool d'extraits positifs et négatifs comme référence interne et contrôle qualité.

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

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse BÜHLMANN fCAL® ELISA sont uniquement destinés à la détermination des taux de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les résultats des tests devraient être interprétés en lien avec les informations disponibles à partir de l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
- Les patients qui prennent des AINS de façon régulière peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés

USO PREVISTO

Il BÜHLMANN fCAL® ELISA è un test diagnostico in vitro per la determinazione quantitativa della calprotectina umana nei campioni di feci impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale.

I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto per la diagnosi nel distinguere delle malattie infiammatorie organico del tratto gastrointestinale (malattia infiammatoria intestinale, MII (IBD), ad es. Morbo di Crohn o colite ulcerosa, CU), da malattie funzionali (sindrome dell'intestino irritabile, SII (IBS)) (ref. 1-7); in pazienti con dolore addominale cronico di età superiore ai quattro anni (ref. 8-9) e contribuisce al monitoraggio dello stato della malattia IBD (ref. 10-12).

Solo per uso di laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il BÜHLMANN fCAL® ELISA consente la misurazione selettiva di calprotectina da estratti fecali mediante sandwich ELISA. La piastra di microtitolazione del BÜHLMANN fCAL® ELISA è rivestito con un anticorpo monoclonale a cattura (mAb) altamente specifico rispettivamente per i complessi eterodimerici di calprotectina polimerici complessi (ref. 13). Estratti di campioni fecali dei pazienti, controlli per la determinazione dell'accettabilità della seduta ELISA e calibratori sono caricati in pozzetti della piastra di microtitolazione. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e di una fase di lavaggio, un anticorpo di rilevazione (Ab) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) rileva le molecole di calprotectina legate all'anticorpo monoclonale coattato alla piastra. Dopo incubazione ed ulteriore lavaggio, viene aggiunto il substrato tetrametilbenzidina (TMB) con formazione di colore blu, seguito dall'aggiunta di soluzione di stop (virata del colore giallo). L'assorbanza viene misurata a 450 nm. La concentrazione finale di calprotectina in µg/g nei campioni fecali dei pazienti è determinate impiegando una curva di calibrazione generata dai valori del calibratore misurati.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampone per estrazione	3 flaconi da 125 mL	6 flaconi da 125 mL	B-CAL-EX	Pronto all'uso
Micropiastra Precoattata con anti-calprotectina mAb	Pozzetti da 12 x 8	Pozzetti da 2 x 12 x 8	B-CAL-MP	Pronto all'uso
Foglio Sigillante per la piastra	3 fogli	6 fogli	-	Pronto all'uso
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) con conservanti	1 flacone da 100 mL	2 flaconi da 100 mL	B-CAL-WB	Diluire ciascuno con 900 mL di acqua deionizzata

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampone di Incubazione Con conservanti	2 flaconi da x 125 mL	3 flaconi da x 125 mL	B-CAL-IB	Pronto all'uso
Calibratori dalla A-E¹⁾² Calprotectina in una matrice tampone con conservanti	5 provette da 1 mL	5 provette da 1 mL	B-CAL-CASET	Pronto all'uso
Controllo Basso / Alto³⁾ Matrice di siero umano con conservanti	2 provette da 1 mL	2 provette da 1 mL	B-CAL-CONSET	Pronto all'uso
Marcatore Enzimatico Anti-Calprotectina Ab coniugato con HRP	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-CAL-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in un tampone citrato	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-TMB12	Pronto all'uso
Soluzione di Stop Acido Solforico 0,25 M	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-ST512	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 10

¹⁾ La concentrazione effettiva degli standards da A ad E è rispettivamente di 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL di Calprotectina. Per l'estrazione e la successiva diluizione del campione è stata presa in considerazione una diluizione di 1:2500 per l'assegnazione dei calibratori da A ad E. Le seguenti concentrazioni di Calprotectina devono essere utilizzate per la procedura ELISA a basso range: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di Calprotectina.

²⁾ Se invece si utilizza la procedura ELISA a range esteso si dovranno utilizzare le seguenti concentrazioni: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g di calprotectina.

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

CONSERVAZIONE E DURATA

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

Table 11

REAGENTI E MATERIALI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di estrazione delle feci

I dispositivi di estrazione delle feci descritte di seguito non sono forniti nel kit e occorre ordinare l'uno o l'altro insieme al kit.

CALEX® Cap Device	Unità da 50, 200 o 500 dispositivi, ciascuno riempito con tampone di estrazione ; 5 mL / pronto all' uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 dispositivi, spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore, 1.3 mL / Pronto all' uso	B-CAL-SO50

Table 12

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Procedura di estrazione

- Anse per inoculazione da 10 µL
- Provette di polipropilene con tappi a vite da 15 mL necessarie per procedura di estrazione standard; dispositivi di estrazione (vedi sopra).
- Cappa a flusso laminare
- Vortex per provette
- Bilancia di Precisione (10-150 mg)
- Microcentrifuga (≥3000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)

Procedura del dosaggio ELISA

- Pipette di precisione da 10 µL, 100 µL e 1000 µL con puntali monouso.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene, per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro da 1000 mL per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.
- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il Tampone di Lavaggio (vedi Avvertenze Procedurali).
- Rotatore per micropiastra (vedi Avvertenze Procedurali)
- Carta da blotting
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

- Le strip, i Calibratori e i Controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio (BLP) utilizzando le dovute precauzioni.
- Soluzione di stop: La soluzione di stop (B-ST512) contiene acido solforico (0,25 M). Il reagente è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. In caso di contatto con gli occhi o la pelle lavarsi immediatamente con abbondante acqua.

- Reagenti: Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbe verificarsi irritazione / bruciori.
- La soluzione inutilizzata va smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Reagenti del kit

- Residui rimasti nei pozzetti causati dal processo di produzione, vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 della Procedura del Dosaggio Test).
- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Assicurarsi che non si verifichino cross contaminazioni tra reagenti, campioni o tra pozzetti.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Miscelare bene (agitare con il vortex) i reagenti prima dell'uso.
- Le strip non possono essere riutilizzate.

Estrazione

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

Procedura del dosaggio ELISA

- Nella procedura del dosaggio ELISA, i passaggi del lavaggio sono essenziali per garantire la riproducibilità dei risultati. Un tempo minimo di incubazione di almeno 20 secondi del tampone di lavaggio nei pozzetti, deve essere eseguito in ogni passaggio.
- Usando un lavatore automatico, Bühlmann suggerisce vivamente di usare il "PLATE MODE" ossia erogazione/aspirazione sequenziale su tutte le strip, così che il tempo minimo di incubazione sia garantito.
- E' importante che il numero di lavaggi consigliato sia rispettato per assicurare la riproducibilità dei risultati.
- L'agitatore per le micropiastre deve essere impostato ad una velocità di 450 rpm (<10 Hz). Una frequenza di rotazione superiore potrebbe causare una scarsa linearità nelle diluizioni per valori tra 300/900 e 600/1800 µg/g. Il movimento circolare dell'agitatore è preferibile a quello latero-laterale.
- Per assicurare la reazione completa antigene/anticorpo, il periodo d'incubazione al punto 5 della procedura, deve essere di almeno 30 min. Un'incubazione moderatamente più lunga (fino a 5 minuti) non influenza la procedura.

- Il marcatore enzimatico è inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarburi aromatici che spesso si trovano nei rifornimenti d'acqua di laboratorio. Di conseguenza usare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- Dal momento che le condizioni variano da saggio a saggio, si deve creare una nuova curva standard ogni volta che viene eseguito una nuova analisi. Si consiglia un allineamento verticale.
- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del Calibratore E, il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone d'Incubazione e dosato ancora secondo procedura. Il fattore di diluizione applicato dovrà essere preso in considerazione per i calcoli finali.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Se si utilizzano i dispositivi di estrazione, è necessario meno di 1 g di feci originali per la procedura di estrazione.

I campioni di feci devono essere raccolti in provette semplici.

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

Trasporto campioni

I campioni di feci devono essere ricevuti dal laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni possono essere trasportati a temperatura ambientale (23 °C).

Conservazione dei campioni

I campioni di feci ricevuti devono essere conservati a 2-8 °C ed estratti entro 3 giorni.

Conservazione degli estratti

Calprotectina in estratti ottenuti con BÜHLMANN CALEX® Cap è stabile a temperatura ambiente per 3 giorni, a 2-8 °C per 6 giorni e a -20 °C per 18 mesi.

Calprotectina in estratti ottenuti con metodo di pesatura manuale, con il BÜHLMANN Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ è stabile a 2-8 °C per 6 giorni e a -20 °C per 18 mesi.

STANDARDIZZAZIONE

I valori del calibratore BÜHLMANN fCAL® ELISA sono assegnati in sedute di misurazioni multiple impiegando materiali di riferimento interno basati su siero umano e sulle procedure di misurazione BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentrazione di calprotectina del materiale di riferimento interno è stata stabilita impiegando la MRP8/14 purificata, da granulociti umani come materiali di riferimento primari.

PROCEDURA DI ESTRAZIONE DI CAMPIONI DI FECI

Procedura d'estrazione standard

1. Etichettare e pesare (tarare) la provetta di polipropilene vuota insieme all'ansa per inoculazione.
2. Prelevare da 50 a 100 mg del campione di feci mediante l'ansa per inoculazione e metterlo nella provetta prepesata.
3. Calcolare il peso netto del campione, spezzare l'ansa per inoculazione e lasciare la parte finale dell'ansa nella provetta.

4. Aggiungere il Tampone d'estrazione corrispondente alla formula

$$x \text{ mg di feci} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L tampone d'estrazione}$$

(per es. 50 mg di feci + 2450 μ L tampone d'estrazione) alla provetta e chiuderla.

5. Omogenizzare il campione in un vortex per provette scuotendo vigorosamente (velocità massima) per 30 min.
6. Trasferire il composto omogeneizzato in una provetta eppendorf da 2 mL e centrifugare in una microcentrifuga per 5 min a 3000 x g
7. Trasferire il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire la procedura ELISA.

Procedure di estrazione con l'utilizzo di dispositivi di estrazione delle feci

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

1. Dispositivo CALEX® Cap (codice B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500): I tubi di estrazione sono già riempiti con tampone di estrazione.

Importante: Dopo l'estrazione, centrifugare il dispositivo CALEX® Cap per 5 minuti a 500-3000 x g e continuare con la procedura di dosaggio.

2. Sistema di estrazione delle feci Roche (Codice: 10745804322) o BÜHLMANN Smart-Prep (Codice: B-CAL-RD): È possibile ridurre il tempo di estrazione (con vortex) a 1 min.

3. ScheBo® Quick-Prep™ (Codice: B-CAL-SO50): Le provette di estrazione sono già riempite con tampone di estrazione.

Importante: Dopo l'estrazione con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ centrifugare le provette per 5 minuti a 3000 g. Alternativamente, trasferire l'omogenato in una provetta di Eppendorf da 2 mL e centrifugare in microcentrifuga per 5 minuti a 3000 x g. Decantare il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire con la procedura del test.

RANGE DI MISURAZIONE ELISA

Il dosaggio può essere effettuato con le seguenti procedure: procedura ELISA a basso range o a range esteso. La scelta dell'una o dell'altra procedura dipende dalla concentrazione di Calprotectina attesa dei campioni. Per campioni fino a 600 μ g/g scegliere la procedura a basso range (range di misurazione 10-600 μ g/g). Se le concentrazioni dei campioni tendono a superare i 600 μ g/g, scegliere la procedura a range esteso (range di misurazione 30-1800 μ g/g).

PROCEDURA DEL TEST

Importante: Lasciare equilibrare i reagenti a 18-28 °C prima dell'uso. Diluire solamente gli estratti di feci. Calibratori e controlli sono pronti all'uso.

**1. Opzione 1 diluizione del campione:
Range di misurazione 10-600 µg/g**

- 1.1 Procedura con pesatura manuale, con Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluire gli estratti 1:50 con il tampone di incubazione (es. 20 µL di estratto e 980 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 min a 18-28 °C prima di procedere al punto 4c.
- 1.2 Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti 1:5 con il tampone di incubazione (es. 100 µL di estratto e 400 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 min a 18-28 °C prima di procedere al punto 4c.

**1. Opzione 2 diluizione del campione:
Range di misurazione 30-1800 µg/g**

Il range di misurazione può essere esteso di un fattore 3, se si diluiscono i campioni 1:7500 invece di 1:2500. Questa procedura è raccomandata qualora si prevedano valori elevati di calprotectina. La precisione, la linearità e la sensibilità analitica di ELISA a range esteso sono stati validati. I risultati della validazione (si prega di fare riferimento alla sezione caratteristiche di prestazione) supportano l'estensione dell'intervallo di misurazione a 30-1800 µg/g.

- 1.1 Procedura con pesatura manuale, con Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluire gli estratti 1:150 con il tampone di incubazione (es. 20 µL di estratto e 2980 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere al punto 4c.
- 1.2 Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti 1:15 con il tampone di incubazione (es. 50 µL di estratto e il 700 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere al punto 4c.

2. Preparare una piastra con le strip sufficienti per il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Rimuovere le strip in eccesso dal contenitore e risigillarle immediatamente nella busta di alluminio con l'essiccante. Conservarle refrigerate.

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

Importante: per i tre passaggi di lavaggio con il tampone di lavaggio, deve essere assicurato un tempo di incubazione minimo di 20 secondi (vedi Precauzioni Tecniche – Procedura del dosaggio ELISA)

- 4a. Dispensare 100 µL di Tampone d'Incubazione (Bianco) e 100 µL del Calibratore A-E nei rispettivi pozzetti.
- 4b. Dispensare 100 µL di Controllo Basso e Alto nei rispettivi pozzetti.
- 4c. Dispensare 100 µL di ogni campione diluito nei successivi pozzetti.
5. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 30 +5 minuti massimo su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28 °C (vedi Precauzioni Tecniche - Procedura del dosaggio ELISA).

6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svotare i pozzetti e lavare 3 volte usando almeno 300 µL di Tampone di Lavaggio per pozzetto (vedi Precauzioni Tecniche - Procedura del dosaggio ELISA). Svotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

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

8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 30 ±5 minuti su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28 °C.

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

Importante: lasciare che la soluzione di substrato TMB sia equilibrata a 18-28 °C.

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

11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubarla per 15 ±2 minuti su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28 °C.

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

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

RISULTATI E CALCOLO

Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre per ognuno dei calibratori, controlli e campioni e con un modello di regressione logistica 4 parametri, calcolare la concentrazione di Calprotectina dei campioni.

Range di misurazione 10-600 µg/g

Se si sceglie la procedura ELISA a basso range, si dovrà fare riferimento alle seguenti concentrazioni di calibratori: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g di calprotectina. Ulteriori fattori di diluizione (se si sta usando una differente diluizione finale che 1:2500) devono essere moltiplicati con I risultati per ottenere I risultati finali.

Per dati di riferimento vedere tabella 19 e Figure 1 (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Una curva standard deve essere generata per ogni set di campioni.

Range di misurazione 30-1800 µg/g

Se si sceglie la procedura ELISA a range esteso, si dovrà fare riferimento alle seguenti concentrazioni nominali di calibratori: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g di calprotectina. Ulteriori fattori di diluizione (se impiegata una diluizione finale diversa da 1:7500) devono essere moltiplicati con I risultati per ottenere i risultati finali.

Per dati di riferimento vedere tabella 21 e figura 5 (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Una curva standard deve essere generata per ogni set di campioni..

PERFORMANCE CARATTERISTICHE

Range di misurazione: 10-600 µg/g

Ripetibilità: 1.8-5.9 % CV

Precisione intra-laboratorio: 5.3 %-10.0 % CV

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida approvate CLSI dell' EP5-A2. Nove campioni di estratto fecale sono stati analizzati in duplicato secondo la procedura di dosaggio in un periodo superiore a 20 giorni. Effettuato una volta al giorno. I valori sono presentati nella tabella 20.

Limite del Bianco (LoB): <10 µg/g. Il limite del Bianco è stato determinato in accordo con le linee guida CLSI dell' EP17-A. Venti duplicati di Tampone d'Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta con 2 differenti lotti di reagenti. I valori di OD erano molto inferiori a quelli del Calibratore A (10 µg/g). E' stata usata una funzione spline cubica per estrapolare i valori DO alle concentrazioni di calprotectina µg/g.

Limite di quantificazione (LoQ): <10 µg/g. Il limite di quantificazione è stato determinato in accordo con le linee guida approvate dal CLSI dell' EP17-A. Quattro estratti fecali diluiti alle concentrazioni in basso 10 µg/g sono state analizzate in 20 repliche in due sedute indipendenti con due differenti lotti.

Sensibilità funzionale: <10 µg/g. Dieci campioni fecali con valori di calprotectina compresi tra 5.2 e 1254 µg/g sono stati dosati 20 volte duplicati in un unico dosaggio. La % del CV e i valori medi sono stati calcolati per ciascuna campione. La sensibilità funzionale è stata osservata al 15 % del CV. Il profilo di precisione risultante (figura 2) conferma che le misure di precisione possono essere effettuate entro l'intera gamma standard da 10 a 600 µg/g. I risultati sono presentati nella figura 2.

Linearità: 10-600 µg/g. La linearità del dosaggio è stata valutata in accordo con le linee guida approvate CLSI dell'EP6-A. Quattro campioni di estratti fecali con concentrazioni più elevate di 600 µg/g sono stati diluiti in un tampone d'incubazione. E' stata effettuata per ciascun campione fino a 17 diluizioni nel range di 1:2500 (si raccomanda diluizione più bassa) fino a 1:500 000. I risultati di linearità per uno dei campioni di estratti fecali sono presentati nella figura 3.

Rilevazione da Inoculo. Bias totale: -1.1 %; Limite inferiore di riferimento: -17.5 %, Limite superiore di riferimento: 15.4 %. Quattro campioni di estratti fecali negativi sono inoculati con crescenti quantità di calprotectina da campioni di siero. I risultati sono presentati nella figura 4.

Range di misurazione: 30-1800 µg/g

Precisione Intra-Saggio: 2.6 %-10.5 % CV. La precisione intra-saggio è stata validata dai risultati di 12 campioni di estratto fecale in 20 duplicati in un'unica seduta secondo la procedura del saggio. I valori sono presentati in Table 22.

Precisione Inter-Saggio: 7.8-12.8 % CV. La precisione inter-saggio della procedura ELISA è stata calcolata su 5 campioni di estratti fecali. Le aliquote sono state dosate, con la procedura prevista per il dosaggio, in 10 diverse

sedute da tre tecnici, utilizzando 2 lotti del kit in due diversi laboratori. I valori sono presentati in tabella 23.

Limite del Bianco (LoB): <30 µg/g.

Sensibilità funzionale: <30 µg/g. La precisione intra-saggio è stata calcolata per 18 campioni estratti fecali con valori di calprotectina compresi tra 10.8 e 2080 µg/g sono stati tracciati con i valori di concentrazione di calprotectina. Il profilo di precisione osservato consente determinazioni precise entro l'intero range standard da 30 a 1800 µg/g. I risultati sono riportati nella figura 6.

Linearità: 30-1800 µg/g. Il test di linearità descritto per il range di misurazione 10-600 µg/g è valido per il range di misurazione 30-1800 µg/g. Il range di misurazione 30-1800 µg/g è stato raggiunto con un campione ad alta diluizione (1:7500) e una diversa assegnazione dei valori nominali del calibratore. La linearità è stata dimostrata impiegando una diluizione dei campioni nel range di 1:2500-1:500000.

Rilevazione da inoculo: Bias totale: -1.6 %; Limite inferiore di riferimento: -11.6 %, Limite superiore di riferimento: 8.5 %. Due campioni di estratti fecali negativi sono inoculati con crescenti quantità di calprotectina da campioni di siero. I risultati sono presentati nella figura 7.

Caratteristiche generali di prestazione

Effetto hook per dosi elevate. Un campione di estratto fecale con una concentrazione di calprotectina di 14000 µg/g e un campione di siero con una concentrazione di calprotectina di 60000 µg/g la quale è 100 volte superiore a del più elevato Calibratore E (600 µg/g), è stata analizzata, non diluita e in diluizioni seriali. Non è stato osservato nessun effetto hook per dosi elevate. I risultati per campioni estratti fecali sono presentati nella figura 8.

Cross-reattività: <0.1 %. I tamponi d'incubazione inoculati con diverse quantità di MRP8 e MRP14 ricombinate sono stati misurati secondo la procedura di dosaggio. I valori sono presenti nella tabella 25.

Sostanze interferenti: La suscettibilità del BÜHLMANN fCAL® ELISA ad interferire con sostanze come i prodotti farmaceutici ad uso orale, integratori alimentari, emoglobina e microrganismi di enteropatologie sono stati valutati secondo le linee guida approvate da CLSI dell' EP7-A2. Nessuna interazione con il dosaggio è stata osservata. I valori sono presentati nelle tabella 26 e tabella 27.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

In uno studio clinico condotto su 344 pazienti sintomatici, sono stati confrontati i valori calprotectina umana degli esami endoscopici.

L'esame endoscopico ha mostrato 264 pazienti con malattie gastrointestinali funzionali, mentre 80 pazienti con varie malattie organiche (colite, Crohn's, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, cancro o malattie infettive) (ref. 5).

Analisi di curve ROC (AUC 0.962) mostrano un cut-off clinico ottimale ad un valore di 50 µg/g. Applicando questo valore (cut-off), viene raggiunta una sensibilità di 88.8 % e specificità clinica di 93.6 %. Ciò rende possibile la differenziazione tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche (vedi tabella 24).

La concentrazione di Calprotectina nelle feci è comparabile in adulti e bambini, mentre nei neonati può essere significativamente più elevata (ref. 9).

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

Valori normali sotto i 50 µg/g:

I valori di Calprotectina <50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Per pazienti con bassi livelli di Calprotectina probabilmente non sono necessarie ulteriori procedure invasive per determinare le cause dell'infiammazione (ref. 5).

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

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

Valori elevati sopra i 200 µg/g:

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

Il cut-off suggerito per gli adulti (50 µg/g) può essere anche usato per i bambini con età compresa tra i 4 e i 17 anni senza differenziazione di sesso (ref. 8-10).

- I reagenti forniti con il kit BÜHLMANN fCAL® ELISA sono ottimizzati per la determinazione di livelli di calprotectina solamente in campioni fecali umani.
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- I pazienti che stanno assumendo regolarmente NSAIDs potrebbero evidenziare aumenti dei livelli di calprotectina nei campioni fecali.

CONTROLLO DI QUALITA'

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

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

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

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

INDICACIONES DE USO

El BÜHLMANN fCAL® ELISA es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas a fin de facilitar la valoración de una inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo se pueden utilizar para facilitar el diagnóstico, distinguiendo una enfermedad inflamatoria orgánica del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, por ejemplo la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa) de una enfermedad funcional (síndrome del intestino irritable, SII) (ref. 1-7), en pacientes con dolor abdominal crónico mayores de cuatro años (ref. 8-9), y para facilitar el control de la EII (ref. 10-12).

Para uso de laboratorio únicamente.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El BÜHLMANN fCAL® ELISA permite la determinación selectiva de calprotectina en extractos de heces mediante una prueba ELISA de tipo sándwich. La placa de microtitulación del BÜHLMANN fCAL® ELISA lleva un recubrimiento de un anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para los complejos heterodiméricos y poliméricos de calprotectina (ref. 13). En los pocillos de esa placa de microtitulación se cargan los extractos de muestras de heces de pacientes, controles para determinar la aceptabilidad de la ejecución de la prueba ELISA y calibradores. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y varios pasos de lavado, un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) detecta las moléculas de calprotectina unidas al anticuerpo de captura del recubrimiento de la placa. Tras una nueva incubación y pasos de lavado adicionales, se añade el sustrato cromogénico de HRP tetrametilbencidina (TMB) (formación de color azul) antes de llevar a cabo una reacción de parada (viraje de color al amarillo). Se mide la absorción a 450 nm. La concentración final de calprotectina en µg/g de heces de las muestras de pacientes se determina utilizando la curva de calibración generada a partir de los valores de calibrador medidos.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampón de extracción	3 botellas de 125 mL	6 botellas de 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Microplaca recubierta con AcMo anti-Calprotectina	12 x 8 pocillos	2 x 12 x 8 pocillos	B-CAL-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades	6 unidades	-	Listo para usar
Tampón de lavado concentrado (10x) concentrado con conserv.	1 botella 100 mL	2 botellas de 100 mL	B-CAL-WB	Diluir con 900 mL de agua desionizada

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampón de incubación con conservantes	2 botellas de 125 mL	3 botellas de 125 mL	B-CAL-IB	Listo para usar
Calibradores A a E¹⁾ 2) Calprotectina en una matriz de tampón con conserv.	5 viales de 1 mL	5 viales de 1 mL	B-CAL-CASET	Listo para usar
Control bajo/alto³⁾ Matriz de suero humano con conservantes	2 viales de 1 mL	2 viales de 1 mL	B-CAL-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático Ac anti-Calprotectina conjugado con HRP	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B-CAL-EL	Listo para usar
Substrato de TMB TMB en tampón Citrato	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B-TMB12	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido Sulfúrico 0,25 M	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B-ST512	Listo para usar Agente corrosivo

Table 13

- 1) Las concentraciones efectivas de los estándares A a E son 4, 12, 40, 120, 240 ng/mL de Calprotectina, respectivamente. Durante la extracción y dilución adicional de los extractos para la medición en el ELISA, se produce una dilución total de 1:2500. Para tener en cuenta esos pasos de dilución para los cálculos finales, las concentraciones de los calibradores A al E. Para el procedimiento ELISA en el rango inferior, se deben asignar los valores de calibrador siguientes: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de calprotectina.
- 2) Si se opta por el procedimiento ELISA de rango ampliado, se deben asignar los valores nominales de calibrador siguientes: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de calprotectina.
- 3) Los controles contienen cantidades específicas de lote de Calprotectina humana nativa. Ver la hoja de datos de QC adicional para las concentraciones reales.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

Table 14

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIO PEDIDO

Tubos de extracción de heces

Los dispositivos de extracción fecal que se describen a continuación no se incluyen en el kit y el que se elija debe ser pedido con el kit.

CALEX® Cap Device	Embalajes con 50, 200 o 500 dispositivos, cada uno relleno con tampón de extracción, 5 mL / listos para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, constituyendo di espátulas y fondos	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción constituyendo di tubo, cono & punta dosificadora contienen 1.3 mL de tampón de extracción / listos para usar.	B-CAL-SO50

Table 15

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

Procedimiento de extracción

- Asas de inoculación de 10 µL desechables
- Tubos de polipropileno de 15 mL con tapones de rosca necesarios para el procedimiento de extracción estándar o los dispositivos de extracción (véase anteriormente).
- Campana de flujo laminar
- Mezclador vortex multitubo
- Balanza de precisión (10-150 mg)
- Microcentrífuga (≥3000 x g)
- Centrífuga (≥500 x g)

Procedimiento de ELISA

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 10 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro graduado de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Papel secante.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Las filas de microtitulación, calibradores y controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque ha dado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tomando las precauciones adecuadas.
- Solución de interrupción: La solución de parada (B-ST512) contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tras un contacto con los ojos o la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con cantidades generosas de agua; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- En cuanto a las precauciones adecuadas que debe tomar para la correcta eliminación de los reactivos del kit, recomendamos encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país..

Precauciones técnicas

Componentes del kit

- Residuos pueden formarse en los pocillos durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.

- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-28 °C) y mézclelos bien (con agitador de vórtice) antes de ser utilizados.
- Los micropocillos no deben ser reutilizados

Extracción

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

Procedimiento del ELISA

- En el procedimiento de ELISA los pasos de lavado son esenciales para garantizar de resultados reproducibles. Asegúrese de incubar el tampón de lavado en los pozos un tiempo mínimo de 20 segundos.
- Usando una arandela automatizada, Bühlmann recomienda realizar el proceso de dispensado y aspiración secuencialmente (plate mode), antes de proceder al pasosiguiente. Así, el tiempo mínimo de la incubación está garantizado.
- Las repeticiones indicadas del lavado son obligatorias para asegurar resultados reproducibles.
- El Agitador de placas de microtitulación debe ser ajustado a 450 rpm (< 10 Hz). Una frecuencia de rotación más alta puede causar resultados pobres de dilución entre valores de 300/900 y 600/1800 µg/g. La rotación es preferible a la sacudida horizontal.
- Para asegurar una interacción completa de antígeno/ anticuerpo, el tiempo de la incubación en el paso 5 no debe ser menor de 30 minutos. Un tiempo moderado más largo de incubación (hasta 5 minutos) no tiene ninguna influencia en el resultado final.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a Azida Sódica, Timerosal, Ácido Hipocloroso y Clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador E), la muestra debe diluirse con tampón de incubación e incubarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 1 g de muestra de heces para cada extracción.

Las muestras de heces se deberán recoger en tubos lisos.

Importante: La muestra debe tomarse sin adiciones químicas o biológicas

Transporte de muestras

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces durante los 3 días posteriores a su recogida. Las muestras podrán transportarse a temperatura ambiente (23°C).

Almacenamiento de muestras

Las muestras de heces recibidas deberán ser almacenadas entre 2 – 8°C y extraídas en el transcurso de los siguientes 3 días.

Almacenamiento de extractos

Calprotectina en extractos obtenidos por BÜHLMANN CALEX® Cap es estable a temperatura ambiente durante 3 días, a 2-8°C durante 6 días y a -20°C durante 18 meses.

Calprotectina en extractos obtenidos por método de pesaje manual, por BÜHLMANN Smart-Prep o por ScheBo® Quick-Prep™ es estable a 2-8°C durante 6 días o a -20°C durante 18 meses.

ESTANDARIZACIÓN

Los valores de calibrador para BÜHLMANN fCAL® ELISA se asignan en múltiples determinaciones realizadas utilizando material de referencia interno basado en suero humano y el procedimiento de determinación BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentración de calprotectina del material de referencia interno se ha establecido utilizando MRP8/14 purificada procedente de granulocitos humanos como material de referencia primario.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Procedimiento de extracción estándar

1. Etiquetar y pesar (tarar) el tubo de polipropileno vacío junto con el asa de inoculación.
2. Extraer de 50 a 100 mg de la muestra de heces descongelada mediante el asa de inoculación y colocarlos en el tubo pesado previamente.
3. Calcular la cantidad neta de muestra, romper el asa de inoculación y dejar la parte inferior del asa en el tubo.
4. Añadir tampón de extracción según la fórmula
 $x \text{ mg de heces} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L tampon de extracción}$
 (i.e. 50 mg de heces + 2450 µL tampon de extracción) al tubo y cerrar el tubo:
5. Homogenizar la muestra en un mezclador vortex multitubo agitándolo vigorosamente (velocidad más alta) durante 30 minutos.
6. Transferir el homogenizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar en microcentrífuga durante 5 minutos a 3'000 x g
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado y continuar con el procedimiento ELISA.

Procedimientos de extracción utilizando dispositivos de extracción de heces

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

1. Dispositivo CALEX® Cap (código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500) : Los tubos contienen 5.0 mL de tampón de extracción.

Importante: Tras la extracción, centrifugar el dispositivo CALEX® Cap durante 5 minutos a 500-3000 x g y continuar con el procedimiento de ensayo.

2. Dispositivo de extracción de heces Roche (código 10745804322) o BÜHLMANN Smart-Prep (código B-CAL-RD): El tiempo de extracción (vórtex) puede reducirse a 1 minuto.
3. ScheBo® Quick-Prep™ (código B-CAL-SO50): Los tubos de extracción contienen tampón de extracción.

Importante: Tras la extracción con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™, centrifugue los extractos durante 5 minutos a 3000 x g. Alternativamente, transfiera el homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifuguelo en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000 x g. Decante el sobrenadante a un nuevo tubo etiquetado y prosiga con el Procedimiento.

INTERVALO DE MEDICION

El ensayo se puede realizar de acuerdo con los siguientes procedimientos, ELISA de rango bajo o de rango extendido. La elección del procedimiento depende de la concentración de Calprotectina esperada en las muestras. Para muestras de hasta 600 µg/g se elegirá el procedimiento rango bajo intervalo de medicion 10-600 µg/g. Si las muestras sobrepasan el nivel de 600 µg/g se debe elegir el procedimiento de rango extendido intervalo de medicion 30-1800 µg/g.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Importante: Dejar que los reactivos alcancen los 18-28 °C antes de su uso. Diluir sólo los extractos de heces. Calibradores y controles están listos para usar.

1. Dilución de las muestras, opción 1: Rango de trabajo de 10-600 µg/g

- 1.1. Procedimiento manual de pesado, Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir los sobrenadantes 1:50 con tampon de incubación (e.g. 20 µL extracto y 980 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes del pipeteado del paso 4c del procedimiento.
- 1.2. Dispositivo CALEX® Cap: Diluir los sobrenadantes 1:5 con tampon de incubación (e.g. 100 µL extracto y 400 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes del pipeteado del paso 4c del procedimiento.

1. Dilución de las muestras, opción 2: Rango de trabajo de 30-1800 µg/g

El intervalo de medición se puede extender en un factor de 3 si se diluyen las muestras a 1:7500 en lugar de 1:2500. Este procedimiento es el recomendado si se esperan concentraciones altas de Calprotectina. Se han validado la precisión, la linealidad y la sensibilidad analítica del procedimiento ELISA de rango ampliado. Los resultados de la validación (véase la sección de características del rendimiento) respaldan la ampliación del rango de medición a 30-1800 µg/g.

1.1` Procedimiento manual de pesado, Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir los sobrenadantes 1:150 con tampon de incubación (e.g. 20 µL extracto y 2980 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes del pipeteado del paso 4c.

1.2` Dispositivo CALEX® Cap: Diluir los sobrenadantes 1:15 con tampon de incubación (e.g. 50 µL extracto y 700 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes del pipeteado del paso 4c.

2. Prepare una placa con filas suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidas. Retire las filas sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa de aluminio junto con los sacos desecantes sin demora. Almacénelo a 2-8 °C.

3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Asegúrese de incubar el tampón de lavado en los pozos un tiempo mínimo de 20 segundos para cada de los tres pasos de lavado.

4a. Pipeteé 100 µL de tampón de incubación en el pocillo respectivo.

Pipeteé 100 µL de calibrador A-E en los pocillos respectivos.

4b. Pipeteé 100 µL del Control sérico bajo y alto en los pocillos respectivos.

4c. Pipeteé 100 µL de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.

5. Selle la microplaca con una alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm e incube durante 30 +5 minutos a 18-28 °C (vea las precauciones técnicas)

6. Retire y deseche la alfombrilla de sellado. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo (vea las precauciones técnicas - procedimiento de ELISA, página 24- 25). Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

7. Pipeteé 100 µL de marcador enzimático en todos los pocillos.

8. Cubra la placa con una alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm e incube durante 30 ±5 minutos a 18-28 °C.

9. Retire y deseche la alfombrilla de sellado. Vacíe los pocillos y lávelos cinco veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

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

10. Pipeteé 100 µL de solución sustrato de TMB en todos los pocillos.

11. Cubra la placa con la alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ±2 minutos a 18-28 °C.

12. Pipeteé 100 µL de solución de interrupción en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación para cada pocillo del calibrador y del blanco, para cada una de las muestras y de los controles, reste el pocillo del blanco y registre la absorbancia corregida. Lea la concentración de Calprotectina utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Intervalo de medición 10-600 µg/g

Si elige el procedimiento ELISA de rango inferior, se deben asignar las concentraciones de calibrador siguientes: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de calprotectina. Los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final distinta de 1:2500) deben multiplicarse por los resultados para obtener los resultados finales.

Véanse tabla 19 y figura 1 de datos característicos (resultados y curva de calibración). Atención: Estos resultados y la curva de calibración se proveen solamente parapropósitos de demostración. La curva de calibración debe ser confeccionada cada vez que se analizan nuevas muestras.

Intervalo de medición 30-1800 µg/g

Si elige el procedimiento ELISA de rango extendido, se deben asignar los valores nominales de calibrador siguientes: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de calprotectina. Los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final distinta de 1:7500) deben multiplicarse por los resultados para obtener los resultados finales.

Véanse tabla 21 y figura 5 de datos característicos (resultados y curva de calibración). Atención: Estos resultados y la curva de calibración se proveen solamente parapropósitos de demostración. La curva de calibración debe ser confeccionada cada vez que se analizan nuevas muestras.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Intervalo de medición: 10-600 µg/g

Repetibilidad: CV del 1,8-5,9 %

Precisión intralaboratorio: CV del 5,3-10,0 %

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se determinaron según la directriz aprobada por el CLSI EP5-A2. Se ensayaron por duplicado según el procedimiento de ensayo a lo largo de un período de 20 días nueve muestras de heces extraídas. Se realizó una ejecución por día. Los valores se presentan en la tabla 20.

Límite para el blanco (LoB): <10 µg/g. El límite para el blanco se determinó según la directriz aprobada por el CLSI EP17-A. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en una única ejecución con 2 lotes de reactivo diferentes. Los valores de DO estaban muy por debajo del valor del calibrador A más bajo (10 µg/g). Se

utilizó una función de spline cúbico para extrapolar los valores de DO a concentraciones de calprotectina en µg/g.

Límite de detección (LoD): <10 µg/g. El límite de detección se determinó según la directriz aprobada por el CLSI EP17-A. Se ensayaron cuatro extractos de heces diluidos a concentraciones inferiores a 10 µg/g en 20 réplicas en dos ejecuciones independientes con dos lotes de reactivo diferentes.

Sensibilidad funcional: <10 µg/g. Se ensayaron 20 veces por duplicado en un ensayo diez muestras de heces con valores de entre 5,2 y 1254 µg/g de calprotectina. Se calcularon para cada muestra los valores correspondientes al % de CV y la media. Se observó la sensibilidad funcional a un CV del 15 %. El perfil de precisión resultante (figura 2) confirma que es posible realizar determinaciones precisas en todo el rango estándar entre 10 y 600 µg/g. Los resultados se presentan en la figura 2.

Linealidad: 10-600 µg/g. La linealidad del ensayo se evaluó según la directriz aprobada por el CLSI EP6-A. Se diluyeron en tampón de incubación cuatro muestras de heces extraídas con concentraciones superiores a 600 µg/g. Para cada muestra se realizaron hasta 17 diluciones en el rango de entre 1:2500 (dilución más baja recomendada) y hasta 1:500000. Los resultados de linealidad correspondientes a una de las muestras de heces extraídas se presentan en la Figure 3.

Recuperación tras adición. Sesgo total: -1,1 %; límite inferior de acuerdo: -17,5 %; límite superior de acuerdo: 15,4 %. Se adicionaron con cantidades crecientes de calprotectina procedente de muestras de suero cuatro muestras de heces extraídas negativas. Los resultados se presentan en la figura 4.

Intervalo de medición: 30-1800 µg/g

Precisión intraensayo: CV del 2,6-10,5 %. La precisión intraensayo se validó ensayando 12 muestras de heces extraídas en 20 duplicados en una única ejecución según el procedimiento de ensayo. Los valores se presentan en la tabla 22.

Precisión interensayo: CV del 7,8-12,8 %. La precisión interensayo del procedimiento ELISA se calculó a partir de 5 muestras de heces extraídas. Tres técnicos ensayaron las alícuotas según el procedimiento de ensayo en 10 ejecuciones diferentes utilizando 2 lotes del kit en dos laboratorios diferentes. Los valores se presentan en la tabla 23.

Límite para el blanco (LoB): <30 µg/g.

Sensibilidad funcional: <30 µg/g. Los valores de precisión intraensayo obtenidos para 18 muestras de heces extraídas con valores de entre 10,8 y 2080 µg/g de calprotectina se representaron gráficamente frente a los valores de concentración de calprotectina. El perfil de precisión resultante confirma que es posible realizar determinaciones precisas en todo el rango estándar entre 30 y 1800 µg/g. Los resultados se presentan en la figura 6.

Linealidad: 30-1800 µg/g. La linealidad del ensayo descrita para el rango de trabajo de 10-600 µg/g es válida para el rango de trabajo de 30-1800 µg/g. El rango de trabajo de 30-1800 µg/g se consigue con una mayor dilución de las muestras (1:7500) y una asignación de valores nominales de calibrador diferente. La linealidad se demostró utilizando diluciones de las muestras en el rango de 1:2500-1:500000.

Recuperación tras adición: Sesgo total: -1,6 %; límite inferior de acuerdo: -11,6 %; límite superior de acuerdo: 8,5 %. Se adicionaron con cantidades crecientes de calprotectina procedente de muestras de suero dos muestras de heces extraídas negativas. Los resultados se presentan en la figura 7.

Características generales del rendimiento

Efecto gancho de dosis altas. Se ensayaron sin diluir y en diluciones seriadas una muestra de heces extraída con una concentración de calprotectina de 14000 µg/g y una muestra de suero con una concentración de calprotectina de 60000 µg/g, que es 100 veces superior a la del calibrador E más alto (600 µg/g). No se observó ningún efecto gancho de dosis altas. Los resultados correspondientes a la muestra de heces extraída se presentan en la figura 8.

Reactividad cruzada: <0,1 %. Se midió según el procedimiento de ensayo tampón de incubación adicionado con distintas cantidades de MRP8 y MRP14 recombinantes. Los valores se presentan en la tabla 25.

Sustancias interferentes: La susceptibilidad del ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA a sustancias interferentes como fármacos orales, suplementos nutricionales, hemoglobina y microorganismos enteropatológicos se evaluó según la directriz aprobada por el CLSI EP7-A2. No se observó ninguna interacción con el ensayo. Los valores se presentan en la tabla 26 y la Table 27.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de Calprotectina en heces es un método fiable, que posibilita la distinción entre enfermedades orgánicas y enfermedades gastrointestinales funcionales.

En un estudio clínico, se compararon con los hallazgos endoscópicos los valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos. La endoscopia confirmó que 264 pacientes sufrían de enfermedades funcionales mientras que 80 pacientes tenían varias enfermedades orgánicas (Colitis, Morbus Crohn, úlceras, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer, o enfermedades infecciosas) (ref. 5).

Una análisis de la curva ROC (AUC: 0.962) resulta en un valor límite óptimo de 50 µg/g. Aplicando este valor límite la sensibilidad y la especificidad clínica del método alcanzó 88.8 % y 93.6 % respectivamente (véanse tabla 24).

Esto demuestra que la Calprotectina fecal es un excelente biomarcador para discriminar entre enfermedades orgánicas y funcionales.

La concentración de Calprotectina en heces es comparable en niños y adultos. Las concentraciones de Calprotectina en recién nacidos son considerablemente elevadas.

Estos datos respaldan la siguiente interpretación de los resultados:

Valores normales por debajo de 50 µg/g:

Estos valores de calprotectina <50 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. No es probable que pacientes con niveles bajos de Calprotectina fecal precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (ref. 5).

Valores elevados entre 50 y 200 µg/g:

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

Valores elevados por encima de 200 µg/g:

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

El nivel de corte sugerido para adultos (50 µg/g) se puede utilizar también para niños de entre 4 y 17 años de edad con independencia del sexo (ref. 8-10).

CONTROL DE CALIDAD

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

Dado que no hay un control de extracción para Calprotectina disponible comercialmente, recomendamos el uso de un pool de extractos fecales que den positivo para Calprotectina para el control de calidad interno.

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

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

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit BÜHLMANN fCAL® ELISA son para la determinación de niveles de calprotectina en muestras de heces humanas únicamente.
- Los resultados de la prueba se deben interpretar conjuntamente con la información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener elevados los niveles de calprotectina fecal.

PORTUGUÊS

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O fCAL® ELISA BÜHLMANN é um teste de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DII; p. ex., doença de Chron ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7) em pacientes com dor abdominal crônica acima de quatro anos de idade (ref. 8-9), e como auxiliar no monitoramento das DII (ref. 10-12).

Somente para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

O fCAL® ELISA BÜHLMANN permite a medição seletiva da calprotectina em extratos fecais através do método ELISA Sandwich. A placa de microtitulação do fCAL® ELISA BÜHLMANN é revestida com um anticorpo monoclonal de captura (mAb) altamente específico para os complexos heterodiméricos e poliméricos da calprotectina (ref. 13). Os extratos das amostras fecais dos pacientes, os controles para determinação da aceitabilidade da corrida do ELISA e os calibradores são carregados nos poços da placa de microtitulação. Depois de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e de etapas de lavagem, um anticorpo de detecção (Ab) conjugado a peroxidase de raiz forte (HRP) detecta as moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo de captura na placa. Depois da incubação e de etapas adicionais de lavagem, o substrato cromogênico de HRP, tetrametilbenzina (TMB), é adicionado (formação da cor azul), seguido de uma solução de interrupção (mudança para a cor amarela). A absorção é medida em 450 nm. A concentração final da calprotectina (µg/g) nas amostras fecais dos pacientes é determinada usando-se a curva de calibração gerada a partir dos valores medidos dos calibradores.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Qtde		Código	Reconstituição
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampão de extração	3 tubos da 125 mL	6 tubos da 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Microplaca Prerecoberta com anti Calprotectina mAb	12 x 8 poços	2 x 12 x 8 poços	B-CAL-MP	Pronto para uso
Vedador de placa	3 peças	6 peças	-	Pronto para uso
Concentrado de tampão de lavagem (10x) com preservativos	1 tubo da 100 mL	2 tubos da 100 mL	B-CAL-WB	Diluir com 900 mL de H ₂ O deionizada

Reagentes	Qtde		Código	Reconstituição
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampão de incubação com conservantes	2 tubos da 125 mL	3 tubos da 125 mL	B-CAL-IB	Pronto para uso
Calibradores A - E ^{1) 2)} Calprotectina em uma matriz de tampão com conservantes	5 frascos da 1 mL	5 frascos da 1 mL	B-CAL-CASET	Pronto para uso
Controle baixo / alto ³⁾ soro humano com conservantes	2 frascos da 1 mL	2 frascos da 1 mL	B-CAL-CONSET	Pronto para uso
Marcador enzimático Anti-Calprotectina Ab conjugada com HRP	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-CAL-EL	Pronto para uso
Substrato TMB TMB em tampão de citrato	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-TMB12	Pronto para uso
Solução stop 0,25 M de ácido sulfúrico	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-ST512	Pronto para uso Agente corrosivo

Table 16

- 1) A concentração real de calprotectina nos padrões A a E é de 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL, respectivamente. Para extração e subsequente diluição da amostra, uma diluição de 1:2500 foi realizada para adesignação dos calibradores de A a E. Para o procedimento ELISA de faixa mais baixa, os valores dos calibradores devem ser definidos como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina.
- 2) Para o procedimento ELISA de faixa estendida, os valores dos calibradores devem ser definidos como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina.
- 3) Os controles contêm quantidades específicas de calprotectina humana no lote. Veja a folha de dados adicional QC para as concentrações reais.

ARMAZENAMENTO PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Armazenar a 2-8 °C. Não use depois da data de expiração do kit impresso nas etiquetas.	
Reagentes abertos / reconstituídos	
Tampão de extração	Armazene a 2-8 °C até a data de expiração.
Microplaca	Devolver imediatamente as fileiras não utilizadas para a bolsa metalizada contendo os sacos de dissecadores e selar novamente a beirada inteira do selo zip. Armazenar a 2-8 °C até a data de expiração..
Tampão de lavagem diluído.	Armazenar a 2-8 °C por um período máximo de 6 meses.
Tampão de incubação	Armazenar a 2-8 °C até a data de expiração.
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Substrato TMB	
Solução stop	

Table 17

REAGENTES E MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Dispositivos de extração fecal

Os tubos de extração de fezes descritos abaixo não são incluídos no kit, e devem ser encomendados separadamente.

CALEX® Cap Device	Embalagem com 50, 200 o 500 tubos com 5 mL de tampão de extração, pronto para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, espátulas e tampas	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos consistindo de tubo, suporte do doseador & doseador, 1,3 mL de tampão de extração pronto para uso	B-CAL-SO50

Table 18

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO INCLUÍDOS

Procedimento de extração

- 10 µL disposable inoculation loops
- Alças de inoculação descartáveis de 10 µL
- Tubos de polipropileno com tampas rosqueáveis de 15 mL necessários para o procedimento padrão de extração (veja acima).
- Estação de trabalho de fluxo laminar
- Misturador de vórtice multitubos
- Balança de precisão (10-150 mg)
- Microcentrifuga (≥3000 g)
- Centrifuga (≥500 g)

Procedimento ELISA

- Pipetas de precisão de 10, 100 e 1000 µL com pontas descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para preparação de diluição de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para diluir tampão de lavagem.
- Lavadora de placa e microtituladora (veja precauções técnicas) ou garrafa de apertar para tampão de lavagem.
- Rotador de microplaca (veja precauções técnicas).
- Papel mata-borrão.
- Leitor de placa e microplaca para medição de absorvência a 450 nm..

PRECAUÇÕES

Medidas de segurança

- A microplaca, os calibradores e os controles deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infecções e devem ser manipulados de acordo com as boas práticas do laboratório (BPL), usando as precauções apropriadas.

- **Solução stop:** A solução de interrupção (B-ST12) contém ácido sulfúrico (0,25 M). O reagente é um irritante dos olhos, pele e membranas mucosas. Evite o contato com os olhos, a pele ou a roupa. Após o contato com os olhos ou a pele, lavar imediatamente com água em abundância.

- **Reagentes:** Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, leve imediatamente com quantidades abundantes de água, caso contrário, irritação/queimaduras poderão ocorrer.

- Solução não utilizada deve ser descartada de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais.

Precauções técnicas

Componentes do kit

- **Resíduos nos poços da microplaca** vêm do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento de teste) e não afetam os resultados.
- Leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o teste. A eficiência do teste pode ser afetada se os reagentes estiverem incorretamente diluídos, modificados ou armazenados em condições que não as detalhadas nestas instruções de uso.
- Componentes não podem ser usados depois da data de expiração impressa nas etiquetas.
- Nunca misture lotes diferentes de reagentes.
- Todas as ações devem ser feitas de modo a garantir que nenhuma contaminação cruzada ocorra entre reagentes, amostras ou entre poços.
- Deixe que os reagentes se ajustem em cada temperatura ambiente. Misture bem (vortex) os reagentes antes de sua utilização.
- Micropoços não podem ser utilizados novamente.

Extração

- Para receber resultados quantitativos, é importante homogeneizar toda a amostra de fezes pesada no tampão de extração. Evitar a contaminação no topo do tubo - componentes insolúveis (não digeridos) podem estar ainda no tubo depois da extração.

Procedimento ELISA

- No procedimento ELISA, a etapa de lavagem é essencial para garantir a reprodução dos resultados. Um tempo mínimo de incubação do tampão de lavagem nos poços de pelo menos 20 segundos deve ser garantido a cada medição. O número de ciclos de lavagem é obrigatório para garantir resultados reprodutíveis.
- Na utilização do lavador automático, BÜHLMANN recomenda enfaticamente que se use o “Modo de placa”, isto é, que cada etapa do processo (dispensação/ aspiração) seja realizada em todas as ‘strips’ seqüencialmente, antes de passar para a próxima etapa de processo. Desta forma o tempo mínimo de incubação estará garantido.
- O número indicado de ciclos de lavagens é mandatório, para garantir resultados reprodutíveis.

- O rotador (agitador) de placa deve operar a 450 rpm (<10 Hz). Uma frequência de rotação mais elevada pode causar uma linearidade de diluição mais insatisfatória nos valores entre 300/900 e 600/1800 µg/g. A rotação orbital deve ser usada em vez da agitação recíproca.
- Para assegurar uma interação antígeno / anticorpo completa, o tempo de incubação no passo 5 deve ser de pelo menos 30 minutos. O tempo de incubação moderadamente mais longo (até 5 minutos) não influencia o resultado final.
- O Enzyme Label é inativado pelo oxigénio e é altamente sensível à azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso e hidrocarbonetos aromáticos frequentemente encontrados em água de laboratório. Portanto, use apenas água desionizada de alta qualidade.
- Uma nova curva padrão deve ser gerada todas às vezes em que o teste for realizado. O alinhamento vertical é recomendado.
- Se a concentração inicial de uma amostra desconhecida apresentar um valor mais alto que o calibrador, a amostra deve ser diluída com o tampão de incubação e testada novamente de acordo com o procedimento de teste. O fator de diluição resultante deve ser levado em conta no cálculo dos resultados.

COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

São necessários menos de 1g de amostra nativa de fezes para o procedimento de extração.

As amostras de fezes devem ser coletadas em tubos lisos.

Importante: A amostra deve ser coletada sem a adição de qualquer produto químico ou biológico no dispositivo de coleta.

Transporte da amostra

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório nos 3 dias seguintes à coleta. As amostras podem ser transportados à temperatura ambiente (23°C).

Armazenamento de amostras

As amostras de fezes recebidas devem ser armazenadas a 2-8°C e extraídas dentro de 3 dias.

Armazenamento do extratos

A calprotectina em extractos obtidos pelo tampão BÜHLMANN CALEX® é estável à temperatura ambiente durante 3 dias, a 2-8°C durante 6 dias e a -20°C durante 18 meses.

A calprotectina em extratos obtidos por método de pesagem manual, por BÜHLMANN Smart-Prep ou por ScheBo® Quick-Prep™ é estável a 2-8°C durante 6 dias ou a -20°C durante 18 meses.

ESTANDARDIZAÇÃO

Os valores dos calibradores do fCAL® ELISA BÜHLMANN são determinados em corridas de medições múltiplas usando material de referência interno com base em soro humano e no procedimento de medição do fCAL® ELISA BÜHLMANN. A concentração de calprotectina do material de referência interno foi determinada usando-se MRP8/14 purificado de granulócitos humanos como material de referência primário.

EXTRACÇÃO DE AMOSTRA DE FECAIS

Procedimento padrão de extração

1. Marque com uma etiqueta e pese o tubo vazio de polipropileno (tara) junto com a alça de inoculação.
2. Retire 50 a 100 mg da amostra das fezes com a alça de inoculação e insira-a no tubo previamente tarado.
3. Estime o valor líquido da amostra, quebre a alça de inoculação e deixe a parte inferior da alça no tubo.
4. Adicione o tampão de extração segundo a fórmula

$$x \text{ mg de fezes} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L tampão de extração}$$
 (p.e. 50 mg de fezes + 2450 µL tampão de extração) no tubo e feche-o.
5. Homogeneíze a amostra num vortex multitubos com uma agitação vigorosa (na maior velocidade) durante 30 minutos.
6. Transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue numa minicentrífuga durante 5 minutos a 3.000 x g.
7. Leve o sobrenadante para um tubo fresco etiquetado e continue com o procedimento ELISA.

Procedimentos de extração usando dispositivos de extração fecal

O procedimento de extração está descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o respectivo dispositivo de extração.

1. **Dispositivo CALEX® Cap** (Código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500): Os tubos de extração são previamente preenchido com 5 mL tampão de extração.

Importante: Após a extração, centrifugue o dispositivo CALEX® Cap por 5 minutos a 500-3000 g e dê continuidade ao procedimento do ensaio.

2. **Dispositivo de extração fecal da Roche** (Código 10745804322) ou o **BÜHLMANN Smart-Prep** (Código: B-CAL-RD).
3. **ScheBo® Quick-Prep™** (Código B-CAL-SO50): Os tubos de extração são cheios previamente com tampão de extração.

Importante: Depois da extração com Smart-Prep, o ScheBo® Quick-Prep™ centrifugue os tubos por 5 minutos a 3.000 g. Ou então, transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue-o por 5 minutos a 3.000 g. Decante o sobrenadante em um tubo novo e etiquetado, e continue com o procedimento ELISA.

FAIXA DE TRABALHO ELISA

O teste pode ser realizado de acordo com os seguintes procedimentos – faixa inferior ou estendida do procedimento ELISA. Qual procedimento a ser escolhido depende da concentração esperada de calprotectina das amostras. Para amostras até 600 µg/g escolha o faixa inferior do procedimento faixa de uso 10-600 µg/g. Se as amostras tendem a exceder 600 µg/g escolha o faixa estendida do procedimento faixa de uso 30-1800 µg/g.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Important: Importante: Permitir que os reagentes estejam entre 18-28 °C antes de usar.

Diluir apenas o extrato de fezes. Calibradores e controles estão prontos para o uso.

1. Opção 1 de diluição da amostra:

Faixa de trabalho de 10-600 µg/g

1.1. Procedura pesagem manual, Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Diluir os sobrenadantes 1:50 com tampão de incubação (por exemplo: 20 µL do extrato e 980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

1.2. Dispositivo CALEX® Cap: Diluir os sobrenadantes 1:5 com tampão de incubação (por exemplo: 100 µL do extrato e 400 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

1.' Opção 2 de diluição da amostra:

Faixa de trabalho de 30-1800 µg/g

A faixa de trabalho pode ser estendida em 3 vezes, se você diluir as amostras de 1:7500 em vez de 1:2500. Recomenda-se este procedimento, se altas concentrações de calprotectina forem esperadas. A precisão, linearidade e sensibilidade analítica do ELISA de faixa estendida foram validadas. Os resultados da validação (consulte a seção de características de desempenho) respaldam a extensão da faixa de medição para 30-1800 µg/g.

1.1' Procedura pesagem manual, com Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Diluir os sobrenadantes 1:150 com tampão de incubação (por exemplo: 20 µL do extrato e 2980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

1.2' Dispositivo CALEX® Cap: Diluir os sobrenadantes 1:15 com tampão de incubação (por exemplo: 50 µL do extrato e 700 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

2. Prepare uma placa com número suficiente de fileiras para testar o número necessário de calibradores, controles e amostras diluídas. Remova o excesso de fileiras do suporte e sele-as numa bolsa metalizada junto com pacotes desumidificadores sem demora. Armazene no refrigerador.

3. Lave duas vezes os poços recobertos usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa firmemente contra o papel absorvente.

Importante: Para cada uma das três etapas de lavagem, deve ser garantido um tempo mínimo de incubação de pelo menos 20s para o tampão de lavagem nos poços (Ver Cuidados Técnicos – Procedimento ELISA).

4a. Pipete 100 µL de tampão de incubação (bruto) e pipete 100 µL de calibrador A-E nos respectivos poços.

4b. Pipete 100 µL de controles baixo e alto nos respectivos poços.

4c. Pipete 100 µL de cada amostra diluída nos poços subsequentes.

5. Cubra a placa com um selador de placas e deixe incubar durante 30 +5 minutos em um rotador de placas a 450 rpm, a 18-28 °C (veja Cuidados Técnicos - Procedimento ELISA).

6. Remova e descarte o selador de placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço (veja Cuidados Técnicos – Procedimento ELISA). Esvazie os poços e bata a placa firmemente no papel absorvente.

7. Pipete 100 µL de Enzima em cada poço.

8. Cubra a placa com um selador de placas e deixe incubar por 30 ±5 minutos em um rotador de placa a 450 rpm, a 18-28 °C.

9. Remova e descarte o selador de placas. Esvazie os poços e lave cinco vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa firmemente contra o papel absorvente.

Importante: Dê tempo para que a solução de substrato TMB se equilibre a 18-28 °C.

10. Pipete 100 µL da solução de substrato TMB em todos os poços.

11. Cubra a placa com um selador de placas, proteja a placa da luz direta e deixe incubar por 15 ± 2 minutos em um rotador de placas a 450 rpm, a 18-28 °C.

12. Pipete 100 µL de solução stop em todos os poços. Remova as bolhas de ar com uma ponta de pipeta. Prossiga com a etapa 13 dentro de 30 minutos.

13. Leia a absorvência a 450 nm em um leitor de microtitulador de placa.

RESULTADOS E CÁLCULOS

Leia a absorvência de 450 nm no leitor da microplaca para cada calibrador e controle da amostra usando um 4 PL que se encaixa no substrato branco para obter a amostra de calprotectina calculada.

Faixa de uso 10-600 µg/g

Se você preferir o faixa inferior do procedimento ELISA, as concentrações dos calibradores devem ser definidas como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:2500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 19 e a figura 1 para obter dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e curva padrão são dados apenas para fins de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a serem testadas.

Faixa de uso 30-1800 µg/g

Se você preferir o procedimento ELISA de faixa inferior, os valores nominais de calibradores devem ser definidos como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:7500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 21 e a figura 5 para obter dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e curva padrão são dados apenas para fins de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a serem testadas.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

Faixa de uso: 10 - 600 µg/g

Repetibilidade: 1.8 – 5.9 % CV

Precisão intralaboratorial: 5.3 – 10.0 % CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP5-A2, aprovada pelo CLSI. Nove amostras fecais extraídas foram testadas em duplicata, de acordo com o procedimento do ensaio, em um período de mais de 20 dias. Realizou-se uma corrida por dia. Os valores podem ser encontrados na tabela 20.

Limite do branco (LoB): < 10 µg/g. O limite do branco foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A aprovada pelo CLSI. Vinte duplicatas do tampão de incubação foram testadas em uma única corrida com dois lotes de reagentes diferentes. Os valores de OD ficaram bem abaixo do valor mais baixo do Calibrador A (10 µg/g). Uma função paramétrica cúbica foi usada para extrapolar os valores de OD para concentrações de calprotectina em µg/g.

Limite de detecção (LoD): <10 µg/g. O limite de detecção foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A aprovada pelo CLSI. Quatro extratos fecais diluídos a concentrações abaixo de 10 µg/g foram testados em 20 amostras replicadas em duas corridas independentes, com dois lotes de reagentes diferentes.

Sensibilidade funcional: <10 µg/g Dez amostras fecais com valores entre 5.2 e 1254 µg/g de calprotectina foram testadas 20 vezes em duplicatas em um único ensaio. Os valores percentuais de CV e médios foram calculados para cada amostra. A sensibilidade funcional foi observada a 15 % do CV. O perfil de precisão resultante (figura 2) confirma que medições precisas podem ser feitas dentro da faixa padrão total entre 10 e 600 µg/g. Os resultados podem ser vistos na figura 2.

Linearidade: 10-600 µg/g. A linearidade do ensaio foi avaliada de acordo com a diretriz EP6-A, aprovada pelo CLSI. Quatro amostras fecais extraídas com concentrações superiores a 600 µg/g foram diluídas no tampão de incubação. Para cada amostra, foram realizadas até 17 diluições na faixa de 1:2500 (menor diluição recomendada) até 1:500000. Os resultados de linearidade para uma das amostras fecais extraídas estão apresentados na Figura 3.

Recuperação de traçador (spike). Desvio total: -1.1 %; Limite Inferior de Concordância: -17.5 %, Limite Superior de Concordância: 15.4 % Quatro amostras fecais extraídas negativas foram fortificadas com quantidades crescentes de calprotectina provenientes de amostras de soro. Os resultados podem ser vistos na figura 4.

Faixa de uso: 30-1800 µg/g

Precisão intraensaio: 2.6-10,5 % do CV. A precisão intraensaio foi validada através do teste de 12 amostra fecais extraídas em 20 duplicatas em uma única corrida, de acordo com o procedimento do ensaio. Os valores podem ser encontrados na tabela 22.

Precisão interensaio: 7.8-12.8 % do CV. A precisão interensaio do ELISA foi calculada a partir de 5 amostras fecais extraídas. As alíquotas foram testadas de acordo com o procedimento do ensaio em 10 corridas diferentes executadas por três técnicos, usando dois lotes de kits em dois laboratórios diferentes. Os valores podem ser encontrados na tabela 23.

Limite do branco (LoB): <30 µg/g.

Sensibilidade funcional: <30 µg/g Os valores de precisão intraensaio obtidos para 18 amostras fecais extraídas com valores entre 10,8 e 2080 µg/g de calprotectina foram plotados contra os valores de concentração de calprotectina. O perfil de precisão resultante confirma que medições precisas podem ser feitas dentro da faixa padrão total de 30 a 1800 µg/g. Os resultados podem ser vistos na figura 6.

Linearidade: 30-1800 µg/g. A linearidade do ensaio descrita para a faixa de trabalho de 10-600 µg/g é válida para a faixa de trabalho de 30-1800 µg/g. A faixa de trabalho de 30-1800 µg/g é obtida com uma diluição mais alta de amostras (1:7500) e uma diferente atribuição de valores nominais de calibradores. A linearidade foi demonstrada usando-se diluições de amostras na faixa de 1:2500-1:500000.

Recuperação de traçador (spike): Desvio total: -1.6 %; Limite Inferior de Concordância: -11.6 %, Limite Superior de Concordância: 8.5 % Duas amostras fecais extraídas negativas foram fortificadas com quantidades crescentes de calprotectina provenientes de amostras de soro. Os resultados podem ser vistos na figura 7.

Características gerais de desempenho

Efeito gancho com dose elevada. Uma amostra fecal extraída com uma concentração de calprotectina de 14000 µg/g e uma amostra de soro com uma concentração de calprotectina de 60000 µg/g, 100 vezes maior que o Calibrador E mais alto (600 µg/g), foram testadas não diluídas e em diluições seriadas. Nenhum efeito gancho com dose elevada foi observado. Os resultados para a amostra fecal extraída estão apresentados na figura 8.

Reatividade cruzada: <0.1 %. O tampão de incubação fortificado com quantidades diferentes de MRP8 e MRP14 recombinantes foi medido de acordo com o procedimento do ensaio. Os valores podem ser encontrados na tabela 25.

Substâncias interferentes: A suscetibilidade do fCAL® ELISA BÜHLMANN a substâncias interferentes, tais como produtos farmacêuticos orais, suplementos nutricionais, hemoglobina e micro-organismos enteropatológicos, foi avaliada de acordo com a diretriz EP7-A2, aprovada pelo CLSI. Não se observou nenhuma interação com o ensaio. Os valores podem ser encontrados na tabela 26 e na tabela 27.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A avaliação da calprotectina fecal é uma forma confiável e fácil de distinguir doença orgânico das gastrointestinais funcionais.

Em um estudo clínico, valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos foram comparados a resultados endoscópicos.

Exames endoscópicos mostraram que dos 264 pacientes com doenças funcionais, 80 pacientes tinham diversas doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, úlceras, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças infecciosas) (ref. 5).

A análise da curva (AUC: 0,962) característica de operação do receptor (COR) resultou em um corte clínico ótimo em 50 µg/g. Aplicando-se este corte, uma sensibilidade clínica e especificidade de 88.8 % e 93.6 % respectivamente podem ser obtidas na diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais (veja tabela 24).

Níveis de calprotectina fecal de adultos e crianças são comparáveis, ao passo que níveis de recém-nascidos podem ser significativamente maiores (ref. 9).

Esses dados apoiam a seguinte recomendação para interpretação de resultados :

Valores normais abaixo de 50 µg/g:

Valores de calprotectina <50 µg/g não são indicativos de inflamação no trato gastrointestinal. Pacientes com baixos níveis de calprotectina provavelmente não terão necessidade de procedimentos invasivos para determinar a causa da inflamação (ref. 5).

Valores elevados entre 50 e 200 µg/g:

Valores de calprotectina entre 50 e 200 µg/g podem indicar doenças orgânicas leves tais como inflamações causadas por AINEs (drogas anti-inflamatórias não esteroidais), diverticulite suave e IBD (doença inflamatória do intestino) em fase de remissão. A baixa resposta inflamatória mostrada dentro desta faixa pode sugerir que se repitam as medições em um curto prazo e seja realizado mais investigações.

Valores elevados acima de 200 µg/g:

Valores de calprotectina >200 µg/g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação no trato gastrointestinal. Sugere-se procedimentos investigativos apropriados por especialistas.

O nível de corte sugerido para adultos (50 µg/g) podem também ser usados por crianças de 4 a 17 anos, independente de sexo (ref. 8-10).

CONTROLE DE QUALIDADE

Compreensão exaustiva desta instrução torna-se necessária para a utilização bem sucedida do produto. Resultados confiáveis serão obtidos somente com as técnicas precisas de laboratório e a correta utilização de um (Guia de Boas Práticas) seguindo com exatidão esta instrução de uso.

Como não existe controle da extração de calprotectina disponível comercialmente, recomenda-se o uso de uma amostra de extrações fecais positivas para controle de qualidade interno.

A reprodutibilidade dos parâmetros de curva padrão e valores de controle devem estar dentro dos limites estabelecidos de aceitabilidade do laboratório. Os limites de confiança para os controles são específicos de um lote e impressos numa folha de dados QC adicional.

Se a precisão do teste não satisfaz os limites estabelecidos e a repetição excluir erros na técnica, verifique os seguintes pontos: i) uso da pipeta, controle de temperatura e dispositivos de temporização. ii) ajustes do leitor ELISA. iii) datas de expiração de reagentes. iv) condições de armazenamento e incubação. v) Solução de substrato TMB deve ser incolor. vi) pureza da água.

LIMITAÇÕES DE DESEMPENHO

- Os reagentes fornecidos com o kit fCAL® ELISA BÜHLMANN destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais humanas.
- Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e de outros procedimentos de diagnóstico.
- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) podem apresentar aumentos nos níveis de calprotectina fecal.

REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet **356**, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut **47**, 506-513 (2000).
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol **123**, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.. Tidsskr Nor Legeforen* **128**, 743–5 (2008)
5. Manz M et al. *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology **12**, 5 (2012).
6. Pavlidis P. et al. *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. **48**, 1048-54 (2013)
7. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr **40**, 450-5 (2005)
8. Qingling Zhu et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE **11** (3) (2016)
9. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis **12**(6), 524-34 (2006)
10. Lin JF et al. *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. **20**,1407-15, 2014
11. Wright E K et al., *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. **148**, 938-947 (2015).
12. Naismith GD et al. *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. **8**, 1022-9, 2014
13. Goebeler M et al.: *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation **58**(3), 355-361 (1994).

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/ TABLAS E FIGURAS
LOWER RANGE PROCEDURE 10-600 µg/g

Example of Results

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

Table 19

Example of a Standard Curve

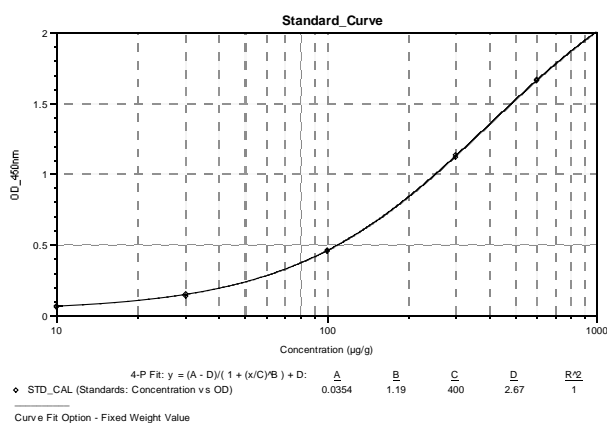


Figure 1

Within-laboratory precision

Sample No.	Concentration [mean µg/g]	Repeatability [%CV]	Between-day Precision [%CV]	Total Precision [%CV]
#1933	20.5	4.3	7.7	8.8
#1934	19.7	5.9	8.4	10.0
#1935	37.1	3.2	5.8	6.5
#1936	35.4	2.6	7.4	7.6
#1937	58.6	2.7	6.4	6.7
#1938	83.9	3.1	5.2	5.9
#1939	141.4	1.8	5.2	5.3
#1956	294.1	4.7	6.2	7.7
#1940	501.4	5.5	4.3	6.9

Table 20

Precision Profile

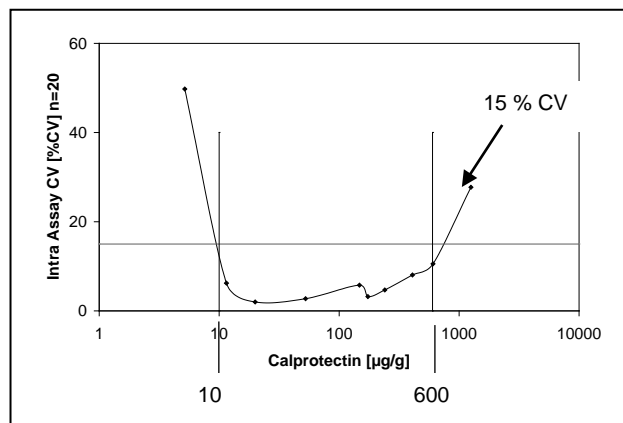


Figure 2

Linearity

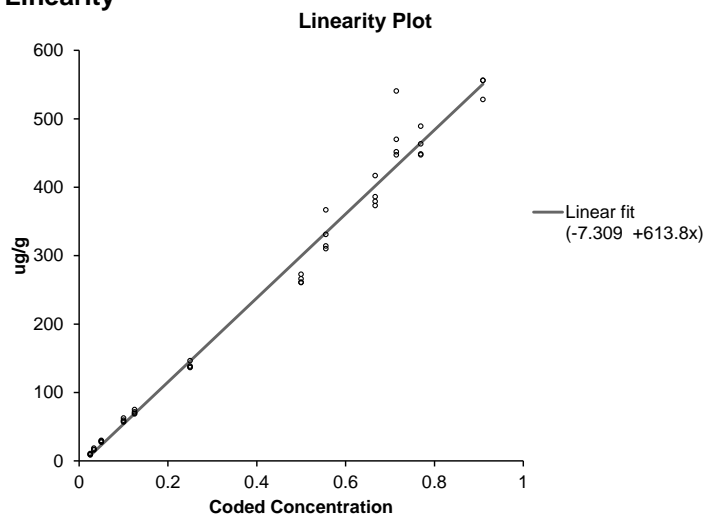


Figure 3

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/
TABLAS E FIGURAS

LOWER RANGE PROCEDURE 10-600 µg

Spiking recovery

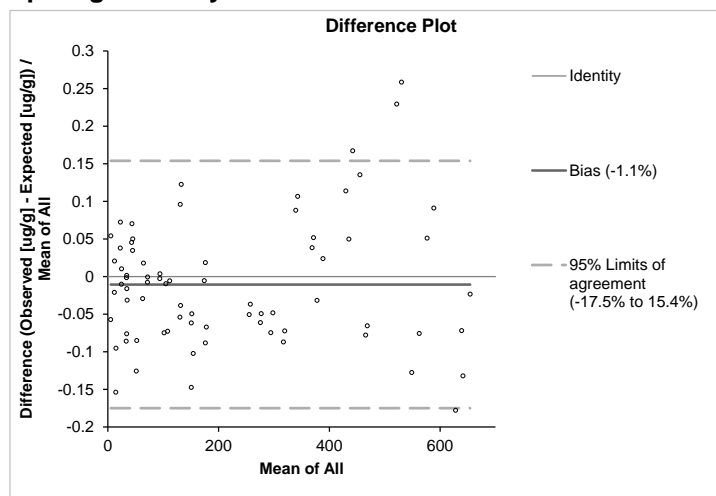


Figure 4

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/
TABLES / FIGURES
EXTENDED RANGE PROCEDURE 30-1800 µg/g

Example of Results

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

Table 21

Precision, intra-assay

Specimen	n	Mean Conc. [µg/g]	SD	% CV
S6	20	46.3	4.9	10.5
S7	20	88.7	4.8	5.4
S8	20	159.1	6.2	3.9
S9	20	298.2	9.9	3.3
S10	20	412.0	11.5	2.8
S11	20	555.5	16.5	3.0
S12	20	712.9	20.1	2.8
S13	20	764.5	22.6	3.0
S14	20	1082.6	50.1	4.6
S15	20	1108.9	72.0	6.5
S16	20	1246.0	32.4	2.6
S17	20	1454.3	130.0	8.9

Table 22

Precision, inter-assay

Specimen	n	Mean Conc. [µg/g]	SD	% CV
S1	10	75.5	9.7	12.8
S2	10	224.8	19.7	8.8
S3	10	788.4	61.7	7.8
S4	10	1000.7	110.7	11.1
S5	10	1764	221.4	12.6

Table 23

Example of a Standard Curve

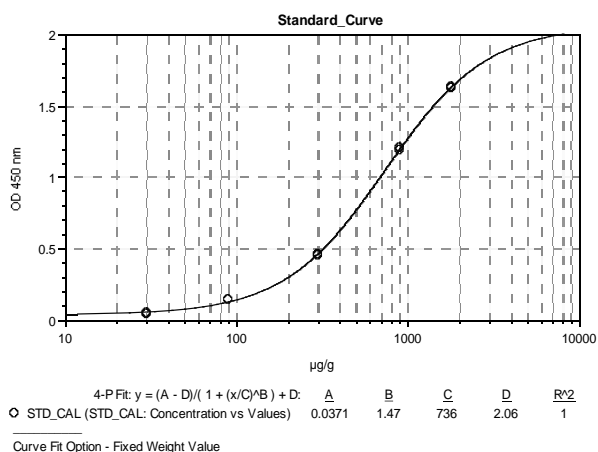


Figure 5

Precision Profile

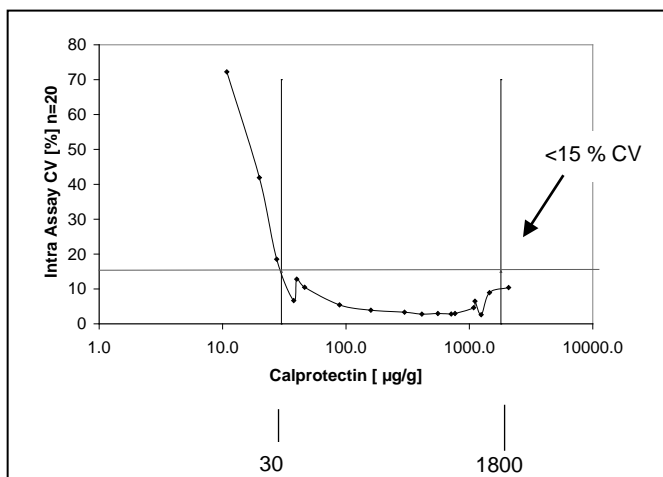


Figure 6

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/
TABLES / FIGURES

EXTENDED RANGE PROCEDURE 30-1800 µg/g

Spiking recovery

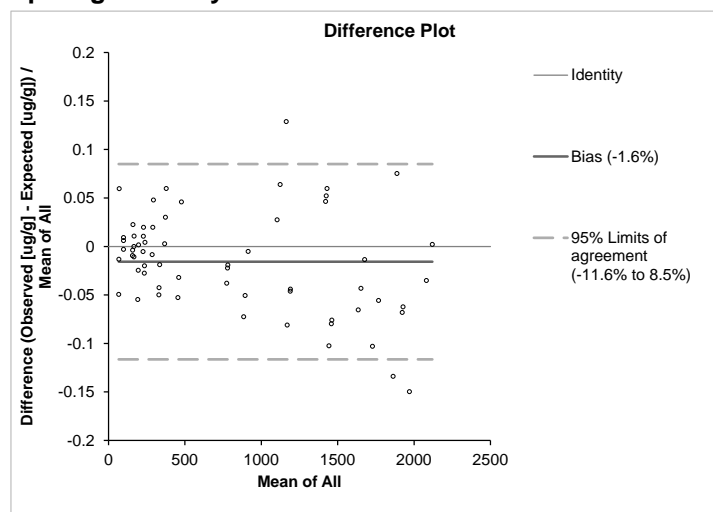


Figure 7

Clinical Study

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

Table 24 (ref.12)

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/
TABLES / FIGURES
GENERAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross Reactivity

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

Table 25

High dose hook effect

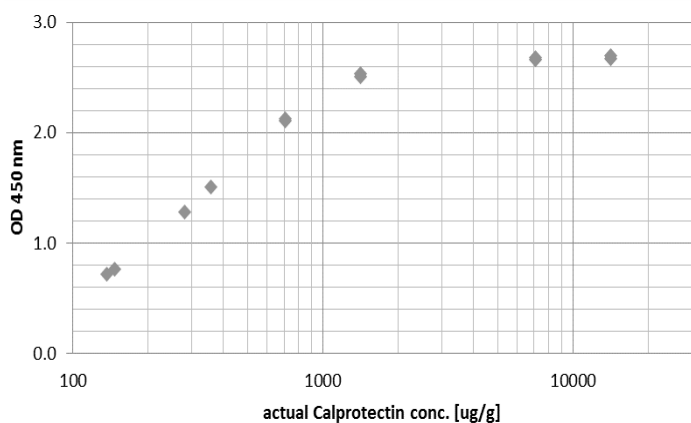


Figure 8: Stool extract with highly elevated Calprotectin concentration subsequently diluted and tested in the ELISA.

Interfering substances:

Oral pharmaceuticals, nutritional supplements and hemoglobin

Trade Name	Active component	Spiked conc.
Ferro-Gradumed	Iron (II) sulfate	0.04 mg/mL
Prednison	Prednisonum	0.13 mg/mL
Imurek	Azathioprinum	0.07 mg/mL
Pentasa	Mesalazinum; 5-ASA	2.00 mg/mL
Lansoprazol	Lansoprazolum	0.07 mg/mL
Asacol	Mesalazinum; 5-ASA	0.50 mg/mL
Zelnorm	Excluded from experiments due to market withdrawal in March 2007	
Vancomycin	Vancomycinum	0.80 mg/mL
Sulfametoxazol	Sulfametoxazol	0.64 mg/mL
Trimethoprim	Trimethoprim lactat	0.13 mg/mL
Ciprofloxacin	Ciprofloxacin	**0.08 mg/mL
Vitamin E	DL-Tocopherolacetat	0.12 mg/mL
Multiple Vitamin	A,B1,B2,B3,B5,B6,B8, B9,B12,C,D,E,+minerals	0.43 mg/mL
	Human hemoglobin	0.5 mg/mL

Table 26

*Daily maximum dose was given by the manufacturer. Spiked concentration of the compounds are based on daily volume of 150 g faeces and the possible amount in the extract resulting in a divisor of 1:7500. **Recovery of ciprofloxacin in stool was given by the manufacturer as 17.8 %.

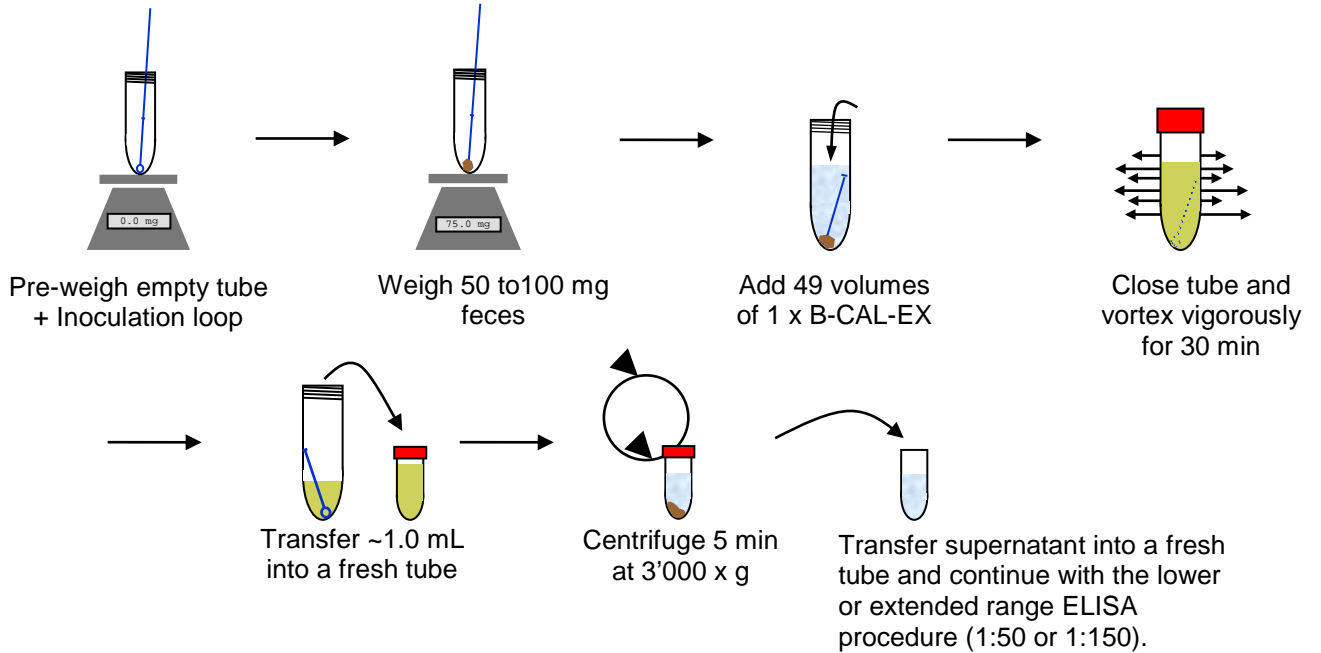
Interfering substances: Microorganisms

Name	OD (at 600 nm) of culture.
<i>Escherichia coli</i>	0.87
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1.81
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia</i>	1.33
<i>Citrobacter freundii</i>	0.64
<i>Shigella flexneri</i>	0.23
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	0.91

Table 27

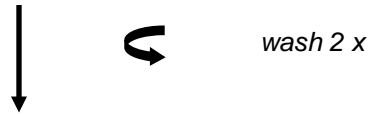
CALPROTECTIN EXTRACTION

Standard Extraction Procedure

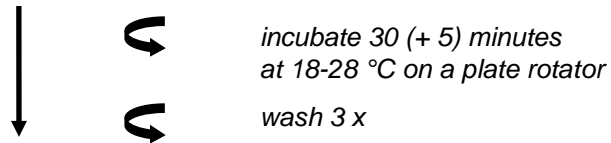


CALPROTECTIN ELISA

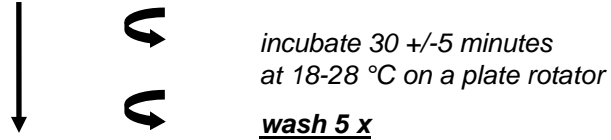
Precoated Microtiter Plate



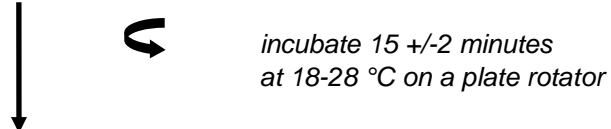
100 μ L Calibrators Controls
or diluted Samples



add 100 μ L Enzyme Label



add 100 μ L TMB Substrate







add 100 μ L Stop Solution

→ Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)

TIME TO RESULT: 75 MINUTES

APPENDIX IV
SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração	BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10) Concentrado de tampão de lavagem
REF	Order Code Bestellnummer Code Codice Código Código	BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación Tampão de incubação
LOT	Batch code Lotbezeichnung Code du lot Codice del lotto Código de lote Código lote	CAL A - CAL E	Calibrator A -E Kalibrator A -E Calibreur A -E Calibratore A - E Calibrador A – E Calibrador A – E
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitaro para diagnóstico <i>in vitro</i>	CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle baixo
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos Contenudo suficiente para <n> tests	CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções	EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático Marcador enzimático
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura	SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB Substrato TMB
MP	Microtiter plate Mikrotiterplatte Microplaque Micropiastra Microplaca Microplaca	SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada Solução stop

CALEX® is a registered trademark of BÜHLMANN in many countries of the world.

