

Calprotectin ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14) in Stuhl

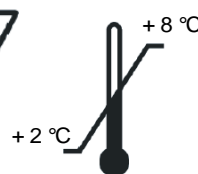
Calprotectin ELISA Kit

For the in vitro determination of Calprotectin (MRP 8/14) in stool

Gültig ab / valid from 19.04.2006



K 6930



[Not sold in the USA]



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Alternative Namen:

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

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

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

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

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

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

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6930MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6930WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6930EP	EXBUF	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 125 ml
K 6930A2	AB	Detektionsantikörper (monoklonaler anti-Calprotectin (MRP 8/14), biotinyliert), Konzentrat	50 µl
K 6930ST	STD	Calprotectin Standards, lyophilisiert (0; 3.9; 15.6; 62.5; 250 ng/ml)	5 vials
K 6930KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 6930K	CONJ	Konjugat (Extravidin Peroxidase markiert), Konzentrat	50 µl
K 6930TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6930AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

Auf Wunsch erhalten Sie bei Bedarf 3 weitere Standardsets kostenlos. Jedes weitere Standardset wird berechnet.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm
(Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen.
- Der **AB** (Detektionsantikörper) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl AB + 10 ml Waschpuffer pipettieren). Der **unverdünnte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das **100 mg Stuhlprobe** dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in **5 ml EXBUF** (Extraktionspuffer) suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

2. Alternativ kann eine Stuhlprobenmasse im Bereich von 80 - 120 mg manuell eingewogen werden. Bitte die exakte Menge für jede Probe notieren!
 - a. Jede einzelne Probe wird in **5 ml** Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Der Verdünnungsfaktor ändert sich entsprechend der Einwaage. Er kann der folgenden Tabelle entnommen werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. Die **Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension (**Verdünnung I**) in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm (= 13000 g) zentrifugiert.

Probenverdünnung

Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1:50 mit Waschpuffer** verdünnt. Zum Beispiel:

20 µl Überstand (Verdünnung I) + 80 µl Waschpuffer=1:50 (**Verdünnung II**)

100 µl der Verdünnung II im Test pro Vertiefung einsetzen.

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

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

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

Pipettierschema

1. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2. Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 100 µl AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**

10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
15. 10 - 20 Min. bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
16. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
17. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

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

**Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne schütteln.

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Die ermittelte Calprotectin Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

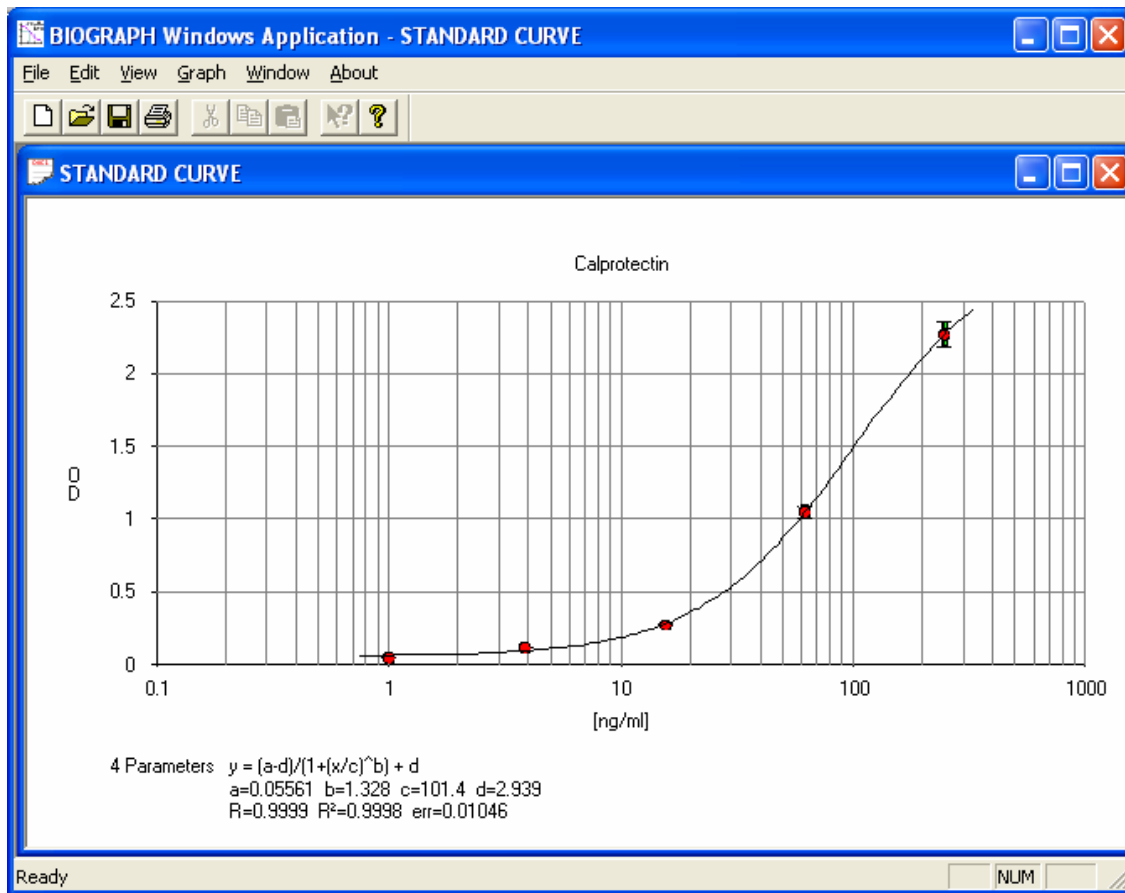
Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Zur Bestimmung der Konzentration im Stuhl wird die ermittelte Calprotectin Konzentration mit **2500** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II).

Probenvorbereitung 2a: Verdünnungsfaktor ist variabel.

Der entsprechende Verdünnungsfaktor jeder Probe wird der Tabelle entnommen und mit 50 (Verdünnungsstufe II) multipliziert und mit der ermittelten Calprotectin Konzentration multipliziert.

Mustereichkurve



STD	OD1	OD2	Mittlere OD	CV (%)	Konz. [ng/ml]
0	0.050	0.047	0.049	4.7	0
1	0.119	0.104	0.112	9.5	3.9
2	0.275	0.268	0.271	1.8	15.6
3	1.021	1.080	1.050	4.0	62.5
4	2.208	2.333	2.270	3.9	250

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des eigenen Tests verwendet werden.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Stuhlproben mit hohen Calprotectin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

(1g Stuhl entspricht 1ml)

Calprotectin im Stuhl	<15mg/l
Graubereich:	10 - 15 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=40)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	12.768	9.75
2	18.997	4.18
Inter-Assay (n=20)		
Probe	Calprotectin [ng/ml]	VK [%]
1	8.485	16.55
2	17.512	6.04

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit 4 unterschiedlichen Calprotectin Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
8.2	50.0	58.2	65.0
8.2	21.0	29.2	34.0
8.2	9.5	17.7	20.0
8.2	4.5	12.7	15.0
19.2	50.0	69.2	77.3
19.2	21.0	40.2	41.5
19.2	9.5	28.7	29.9
19.2	4.5	23.7	25.2

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 1 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 24 mal der Standard null.

Probe	Calprotectin Mittelwert [OD]	Standardab- weichung (SD)	Nachweis- grenze [ng/ml]
1	0.094	0.011	2.915

Linearität

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

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	10 000	223.0	223.0
	20 000	111.5	116.5
	40 000	55.75	61.0
B	10 000	135.0	137.0
	20 000	67.5	62.5
	40 000	33.75	36.125

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

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

13. TECHNISCHE MERKMALE

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

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

15. LITERATUR

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

Manual

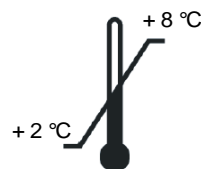
Calprotectin ELISA KIT

For the in vitro determination of Calprotectin (MRP 8/14) in stool

Valid from April 19, 2006



K 6930



[Not sold in the USA]

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Alternative names:

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

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

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

Calprotectin is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. Fecal Calprotectin is a marker for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases.

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

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

Indication

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6930MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6930WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6930EP	EXBUF	Extraction buffer, ready to use	2 x 125 ml
K 6930A2	AB	Detections antibody, (monoclonal anti-Calprotectin (MRP 8/14) antibody, biotinylated), concentrate	50 µl
K 6930ST	STD	Calprotectin standards, lyophilized (0; 3.9; 15.6; 62.5; 250 ng/ml)	5 vials
K 6930KO	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	1 vial
K 6930K	CONJ	Conjugate, (extravidin peroxidase labeled, concentrate)	50 µl
K 6930TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6930AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	7 ml

On request we will send you 3 calibrator sets free of charge. Any further calibrator sets will be charged.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution.
- The **AB** (detection antibody) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10 µl AB + 10 ml wash buffer). The antibody is stable at **2-8 °C** until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date given on the label when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the stool sample

We recommend the following sample preparation:

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing **100 mg of stool sample** (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample must be suspended in **5 ml EXBUF** (extraction buffer).

Constant buffer volume: 5 ml

Constant dilution factor: 1:50

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
 - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample not depending on the sample amount.

Constant buffer volume: 5 ml

The dilution factor varies depending on the sample amount which has to be considered in the subsequent calculations. Please have a look at the table for the correction factors below:

Weight [mg]	Dilution factor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Weight [mg]	Dilution factor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. **The buffer volume** for the individual samples varies depending on the sample amount (see table). The dilution factor remains constant.

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1:50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results .

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.

Transfer ca. 1 ml stool suspension (**dilution step I**) to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm (= 13000 g).

Dilution of samples

Stool samples

The supernatant of the extraction (dilution step I) is diluted **1:50 with wash buffer**. For example:

20 µl supernatant (dilution I) + 980 µl wash buffer = 1:50 (**dilution step II**)

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

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

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human Calprotectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human Calprotectin antibody. During the first incubation step, Calprotectin in the samples is bound by the immobilized antibody. In a next incubation step, a biotinylated monoclonal anti-human Calprotectin antibody is added to each microtiter well. Then a peroxidase labeled extravidin conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Calprotectin – biotinylated detection antibody - Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Calprotectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Calprotectin present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate on a protocol sheet
3. Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
7. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
8. Add 100 µl AB (detection antibody) into each well
9. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**

10. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11. Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well
12. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer**
13. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
14. Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
15. Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
16. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
17. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

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

**The above incubation steps at 37 °C on a horizontal mixer are recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 37 °C, while shaking, we recommend to incubate at 37 °C without any shaking.

8. RESULTS

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

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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

Stool samples

To obtain the calprotectin concentration in stool samples, multiply the estimated value by the dilution factor according to the sample preparation:

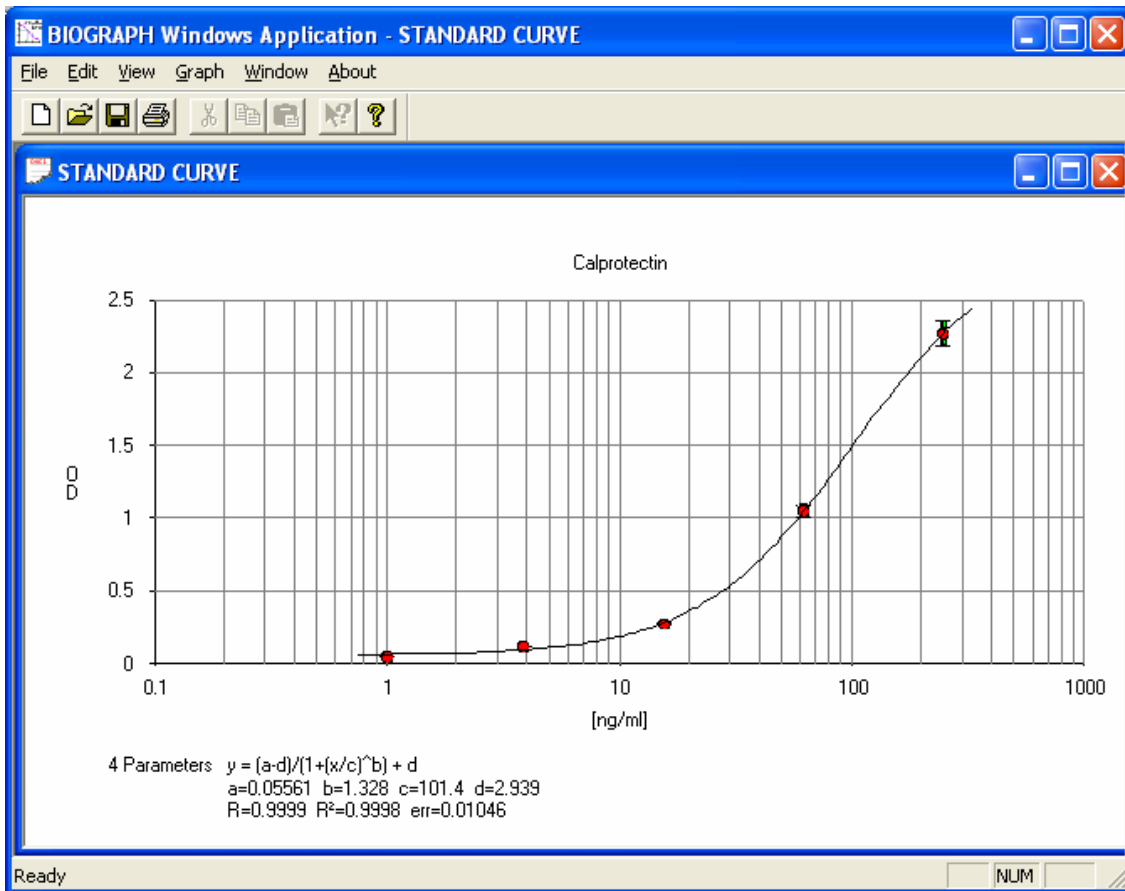
Sample preparation 1 and 2b: dilution factor constant : 1 : 50

Multiply the obtained result by 2500 (dilution step I x dilution step II) to get the final concentration.

Sample preparation 2a: dilution factor is variable.

The corresponding dilution factor is taken from the table and should be multiplied by 50 (dilution step II) to get the final concentration.

Typical calibration curve



STD	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
0	0.050	0.047	0.049	4.7	0
1	0.119	0.104	0.112	9.5	3.9
2	0.275	0.268	0.271	1.8	15.6
3	1.021	1.080	1.050	4.0	62.5
4	2.208	2.333	2.270	3.9	250

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

9. LIMITATIONS

Stool samples with Calprotectin levels greater than the highest standard value, should be diluted with wash buffer, and be re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

Expected values

Normal ranges

(1 g stool is equivalent to 1ml)

Calprotectin in stool: < 15 mg/l

Grey area: 10 - 15 mg/l

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=40)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	CV [%]
1	12.768	9.75
2	18.997	4.18

Inter-Assay (n=20)		
Sample	Calprotectin [ng/ml]	CV [%]
1	8.485	16.55
2	17.512	6.04

Recovery

Two samples were spiked with 4 different Calprotectin standards and measured using this assay.

n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin expected [ng/ml]	Calprotectin measured [ng/ml]
8.2	50.0	58.2	65.0
8.2	21.0	29.2	34.0
8.2	9.5	17.7	20.0
8.2	4.5	12.7	15.0
19.2	50.0	69.2	77.3
19.2	21.0	40.2	41.5
19.2	9.5	28.7	29.9
19.2	4.5	23.7	25.2

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 1SD$. The zero-standard was measured 24 times.

Sample	Calprotectin mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0.094	0.011	2.915

Linearity

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

n= 2

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	10 000	223.0	223.0
	20 000	111.5	116.5
	40 000	55.75	61.0
B	10 000	135.0	137.0
	20 000	67.5	62.5
	40 000	33.75	36.125

12. PRECAUTIONS

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

13. TECHNICAL HINTS

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

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

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

15. REFERENCES

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