

# 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 01.10.2008



K 6937



[Not sold in the USA]



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

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

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



# Inhalt

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

## 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 6937MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6937WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6937EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	2 x 90 ml
K 6937ST	STD	Calprotectin Standards, lyophilisiert (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6937KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6937K	CONJ	Konjugat	200 µl
K 6937TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6937AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

#### 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 Probenauftreten 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 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.
- Der **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch 1:2.5 mit aqua bidest. verdünnt werden (90 ml EXBUF + 135 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist **3 Monate** in einem geschlossenen Gefäß bei **2-8 °C** haltbar.

- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) sind bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrolle können 4 Wochen bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 9,9 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 Firma Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das **100 mg Stuhlprobe** dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in **5 ml** 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]	Verdünnungs-faktor
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
<b>100</b>	<b>50</b>

Einwaage [mg]	Verdünnungs-faktor
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
<b>100</b>	<b>5.0</b>

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 der Suspension (**Verdünnung I**) in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 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) + 980 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 Patientenproben, die auf Calprotectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Calprotectin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Calprotectin – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch 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 <b>Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C)</b> bringen, gut mischen
2. Positionen für <b>STD/SAMPLE/CTRL</b> (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung im Protokollblatt <b>markieren</b>
3. <b>Benötigte Mikrotiterstreifen</b> aus dem Kit <b>nehmen</b> . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. <b>100 µl STD /SAMPLE/CTRL</b> in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei 37 °C</b> unter Schütteln inkubieren**. Alternativ kann der Assay <b>über Nacht bei Raumtemperatur</b> unter Schütteln inkubiert werden
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. <b>100 µl CONJ</b> (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei 37 °C</b> unter Schütteln inkubieren**
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. <b>10–20 min.</b> bei <b>Raumtemperatur (18-26°C)</b> im Dunkeln inkubieren*
13. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
14. <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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. 0.001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

### Stuhlproben

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.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

### Normwerte

1g Stuhl entspricht 1ml

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 21)		
Probe	Calprotectin [mg/l]	VK [%]
1	71.874	7.61
2	580.15	10.81

Inter-Assay (n = 23)		
Probe	Calprotectin [mg/l]	VK [%]
1	103.47	10.28
2	473.13	7.49

## Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit 3 unterschiedlichen Calprotectin Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Calprotectin erwartet [ng/ml]	Calprotectin gemessen [ng/ml]
1	15	14 715	14 713
1	50	14 750	14 737
1	200	14 900	14 887
2	15	15 315	15 313
2	50	15 350	15 350
2	200	15 500	15 506

## Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 3 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 22 mal der Standard null.

Probe	Calprotectin Mittelwert [OD]	Standardabweichung [SD]	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.015	0.021	2.785 *

\* Entspricht bei Berücksichtigung der Stuhlprobenverdünnung (1 : 2500) einer Konzentration von 6.895 mg/l

## Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Plasmaproteinen gefunden:

Lysozym - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Laktoferrin - 0%

## Linearität

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

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [mg/l]	Gemessen [mg/l]
A	1 000	33.95	39.2
	2 000	16.97	22.5
	4 000	8.48	10.6
B	5 000	222.0	210.0
	10 000	110.0	121.0
	20 000	55.0	49.7
	40 000	27.5	29.9

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

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

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

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

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

## 15. LITERATUR

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

### Publikationen mit dem Immundiagnostik Calprotectin-ELISA:

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

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

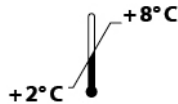
# Calprotectin ELISA Kit

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

Valid from 01.10.2008



K 6937



[Not sold in the USA]

# Content

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>6. SAMPLE PREPARATION</b>	<b>20</b>
Extraction of the stool sample	20
Dilution of samples	21
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>22</b>
Principle of the test	22
Test procedure	22
<b>8. RESULTS</b>	<b>23</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
Expected values	24
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
Precision and reproducibility	25
Recovery	25
Analytical Sensitivity	26
Linearity	26
Cross-reactivity	26
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>27</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>27</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>28</b>

## 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.

### **Indications**

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

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6937MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6937WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6937EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5x	2 x 90 ml
K 6937ST	STD	Calprotectin standards, lyophilized (0; 13; 52; 210; 840 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6937KO	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6937K	CONJ	Conjugate	200 µl
K 6937TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6937AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

### 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 bidist. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) must be diluted with aqua bidist. **1:2.5** before use (90 ml EXBUF + 135 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37°C in a water bath. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2–8°C for three months**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidist. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control can be stored at 2-8°C for four weeks.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl CONJ + 9,9 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** 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
<b>100</b>	<b>50</b>

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
<b>100</b>	<b>5.0</b>

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 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. Then a peroxidase labeled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Calprotectin – Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Calprotectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD 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 <b>positions of STD /SAMPLE/CTRL</b> (Standards/Sample/Control) in duplicate on a protocol sheet
3. <b>Take as many microtiter strips as needed</b> from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4. Wash each well <b>5 times</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add <b>100 µl of STD/SAMPLE/CTRL</b> (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and <b>incubate for 1 hour at 37 °C</b> on a horizontal mixer**. Alternatively, incubate <b>overnight at room temperature</b> on a horizontal mixer
7. Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
8. Add <b>100 µl CONJ</b> (conjugate) into each well

9. Cover plate tightly and <b>incubate for 1 hour at 37 °C</b> on a horizontal mixer**
10. Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 times with 250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11. Add <b>100 µl of SUB</b> (substrate) into each well
12. Incubate for <b>10–20 minutes at room temperature</b> (18–26°C) in the dark*
13. Add <b>50 µl of STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly
14. Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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. 0.001).

### 2. Point-to-point-calculation

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

### 3. Spline-algorithm

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

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

**Stool samples**

To obtain the calprotectin concentration in 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.

## 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

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

Expected values

**Normal ranges**

1 g stool is equivalent to 1ml

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

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

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 21)		
Sample	Calprotectin [mg/L]	CV [%]
1	71.874	7.61
2	580.15	10.81

Inter-Assay (n = 23)		
Sample	Calprotectin [mg/L]	CV [%]
1	103.47	10.28
2	473.13	7.49

### Recovery

Two samples were spiked with 3 different Calprotectin standards and measured using this assay.

n=2

Sample [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Calprotectin expected [ng/mL]	Calprotectin measured [ng/mL]
1	15	14 715	14 713
1	50	14 750	14 737
1	200	14 900	14 887
2	15	15 315	15 313
2	50	15 350	15 350
2	200	15 500	15 506

## Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as  $B0 + 3SD$ . The zero-standard was measured 22 times.

Sample	Calprotectin mean value [OD]	Standard variation [SD]	Detection limit [ng/mL]
1	0.015	0.021	2.785 *

\* Converted according to the dilution of the stool sample (1:2500), 2.785 ng/mL is the same as 6.895 mg/L

## Linearity

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

n= 2

Sample	Dilution	Expected [mg/L]	Measured [mg/L]
A	1 000	33.95	39.2
	2 000	16.97	22.5
	4 000	8.48	10.6
B	5 000	222.0	210.0
	10 000	110.0	121.0
	20 000	55.0	49.7
	40 000	27.5	29.9

## Cross-reactivity

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

Lysozyme - 0%

PMN-Elastase - 0%

Myeloperoxidase - 0%

Lactoferrin - 0%

## 12. PRECAUTIONS

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

## 13. TECHNICAL HINTS

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

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components

are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

## 15. REFERENCES

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

### **Publications based on Immundiagnostik´s calprotectin ELISA**

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

## Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
D-64625 Bensheim

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

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

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)