

Calpro[®] Calprotectin ELISA Test (HRP)



1. VERWENDUNGSZWECK

Der **Calpro[®] Calprotectin ELISA Test (HRP)** ist eine quantitative Methode zur Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben. Sowohl anfängliche, kleinere Entzündung des Darms, als auch schwere Darmerkrankung oder ein Rezidiv können durch den Calprotectin ELISA Test diagnostiziert werden. Der Gehalt an Calprotectin spiegelt die Aktivität der Erkrankung wieder und eignet sich daher besonders zum Monitoren von chronisch Erkrankten CED Patienten wie z.B.: Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn.

In der Literatur wurden Calprotectin Bestimmungen auch mit anderen Körperflüssigkeiten, z.B. Serum, Plasma oder Urin durchgeführt (Johns et al., 1997). Der **Calpro[®] Calprotectin ELISA Test (HRP)** ist nur für die Analyse von Stuhlproben validiert worden.

Bei Patienten in Behandlung ist ein normaler Calprotectin Wert ein objektiver Indikator dafür, dass eine Heilung der Schleimhaut erzielt. Darüber hinaus ist die Bestimmung von Calprotectin geeignet ein entzündliches Rezidiv bei Patienten, die sich in Remission befanden, anzuzeigen. Bei Patienten mit Reizdarm (Colon irritable) ist der Calprotectin Wert unauffällig, so dass hier die Messung von Calprotectin als Ausschlussdiagnostik genutzt werden kann.

Nur zur In vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Verschiedene organische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts schädigen die Darmschleimhaut. Diese Schäden können zu einer erhöhten Permeabilität der Schleimhaut bis zu Entzündungen oder Bildung von Geschwüren führen.

Der Darm enthält viele Bakterien und andere Mikroorganismen, die toxische oder chemotaktisch wirkende Substanzen freisetzen. Diese Substanzen stimulieren bei Leukozyten, insbesondere polymorphkernige Granulozyten (PMN), den Eintritt in das Darmlumen. Dort entleeren sie ihren Inhalt der antimikrobielle Substanzen wie Calprotectin. Dieses Protein macht ungefähr 60% der Gesamtproteine in dem Cytoplasma aus (Fagerhol et al., 1990) und kann verlässlich in Stuhlproben bestimmt werden, die für sieben Tage bei Raumtemperatur gelagert werden können (Røseth et al. 1992).

Calprotectin ist ein Kalzium- und Zink- bindendes Protein (Dale et al, 1983), das von PMN, Monozyten und Plattenepithelzellen (ausgenommen in der gesunden Haut vorkommende Zellen) gebildet wird (Dale et al.,1985, Brandtzaeg et al.,1987). Die Bindung von Kalzium schützt möglicherweise das Protein vor dem Abbau durch leukozytäre und bakterielle Enzyme (Røseth et al., 1992, Fagerhol, 1996). Beobachtungen in der Zellkultur zeigten: Im Wettstreit mit verschiedenen Enzymen um die vorhandenen Zinkmoleküle kann Calprotectin Enzyme, die zinkabhängig sind, hemmen (Isaksen und Fagerhol, 2001) und dadurch Mikroorganismen sowie Zellen menschlichen oder tierischen Ursprungs abtöten (Steinbakk et al.,1991, Yui et al., 1995). Verschiedene Krankheitsbilder, beispielsweise bakterielle Infektionen, rheumatoide Arthritis oder Krebs, können zu einer Aktivierung der PMN und somit zu einer erhöhten Calprotectin Konzentration in Plasma, Zerobrospinalflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Urin oder anderen humanen Flüssigkeiten führen (Johns et al., 1997).

Man sollte hervorheben, dass die Konzentration von Calprotectin im Stuhl mit der Anzahl der PMN, die in das Darmlumen wandern (Røseth et al., 1999), korreliert und das selbst in kleinen Stuhlmengen (weniger als 1 g) zuverlässig Calprotectin nachgewiesen werden kann (Røseth et al., 1992 Tøn et al., 2000). Hohe Konzentrationen von Calprotectin im Stuhl sprechen für eine organische Darmerkrankung. Bei einer Darmentzündung ist der Anstieg um den Faktors fünf bis zu einigen Tausend im Vergleich zum oberen Referenzwert bei Gesunden erhöht (Røseth et al.,1992,Tibble et al.,2000, Bunn et al.,2001, Bjarnason und Sherwood, 2001).

Organische und funktionelle Darmerkrankungen können trotz ähnlicher Symptome nicht immer ausreichend klinisch abgeklärt werden. Da weitergehende klinische Untersuchungen aufwendig und teuer sind oder der Patient Schmerzen, ionisierenden Strahlen oder anderen Risiken ausgesetzt wird, besteht hier der Bedarf an einer einfachen, nicht-invasiven, objektiven und kostengünstigen Methoden, um Patienten für weiterführende Untersuchungen (z.B. Endoskopie) auszuwählen. Für eine Endoskopie ist bei Kindern im Allgemeinen eine Anästhesie notwendig. Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass der Calprotectin ELISA Test für die oben beschriebene Selektion geeignet ist. Da abdominale Beschwerden sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen auftreten, kann ein negatives **Calpro[®] Calprotectin ELISA Test (HRP)** Ergebnis viele Endoskopien und dadurch auch Kosten einsparen.

Entzündliche Darmerkrankungen, wie z. B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, können sowohl im frühesten Kindesalter als auch im fortgeschrittenen Alter auftreten. Calprotectin kann einerseits mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht-entzündliche Darmerkrankungen ausschließen (Tibble et al., 2000) und andererseits als früher Prognosemarker für aktive entzündliche Darmerkrankungen dienen, da diese generell ein positives Ergebnis liefern. Die Bestimmung der Calprotectin-Konzentration in Stuhl ist eine nicht-invasive, objektive Methode, mit der die Krankheitsaktivität und das Ansprechen auf eine Therapie sowie eine wirkliche Heilung festgestellt werden kann. Viele Patienten mit klinischen und normalen Indizes für Darmerkrankungen besitzen eine erhöhte Konzentration an fäkalem Calprotectin, welches mit einer leichten Entzündung und einem erhöhten Risiko für ein klinisches Rezidiv assoziiert ist. Es ist bekannt, dass auch diese geringen Entzündungen zu Darmverengungen führen, welche wiederholte Resektionen notwendig machen können.

3. TESTPRINZIP

Der **Calpro® Calprotectin ELISA Test (HRP)** geht von einem Extraktionsschritt aus bei dem 100 mg Stuhlprobe mit 5 ml Extraktionspuffer gemischt wird. Nach einem Zentrifugationsschritt kann die Probe spezifisch im Assay auf Calprotectin analysiert werden.

Im ersten Inkubationsschritt bindet das Calprotectin aus den Standards und Proben an den auf der Mikrotiterplatte fixierten polyklonalen Antikörper. Durch einen Waschschrift werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes Calprotectin reagiert mit Immunitäts-aufgereinigtem Enzym markierten Anti-Calprotectin Antikörpern. Der Gehalt an gebundenem Enzym ist proportional dem Gehalt an Calprotectin aus den Standards und aus den Proben, welcher durch eine Substratinkubation detektiert wird.

Die Kaninchen Antikörper die im **Calpro® Calprotectin ELISA Test (HRP)** eingesetzt werden, reagieren mit einer Anzahl verschiedener Epitope von Calprotectin. Selbst bei einer Zerstörung von Epitopen oder durch Blockierung von Komplexbindungen mit anderen Substanzen in der Stuhlprobe wird hier eine Bindung von Calprotectin sicher angezeigt. Der patentierte Fäkalextraktionspuffer, der im **Calpro® Calprotectin ELISA Test (HRP)** eingesetzt wird, bringt das Calprotectin in Lösung in eine molekulare Beschaffenheit, die Leukozytenextrakt oder Plasma ähnlich ist. Somit haben die Proteine in den Standards und in den Proben die gleiche Konfiguration, für einen quantitativen Immunoassay ist das notwendig.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit immunitäts-aufgereinigte, polyklonalen Calprotectin-Antikörpern; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer (5x konz.):** 1 Flasche mit 20 ml, 5-fach Konzentrat zur Probenverdünnung; Verdünnung mit Aqua dest., pH 8.0 ± 0.2; gelb gefärbte Lösung, Flasche mit blauer Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.)**:** 2 Flaschen mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; Verdünnung mit Aqua dest., pH 8.0 ± 0.2; klare Lösung, Flaschen mit weißen Verschlusskappen.
- **Fäkalextraktionspuffer (2,5x konz.)***:** 2 Flaschen mit 90 ml eines 2,5-fachen Konzentrats zur Extraktion, Verdünnung mit Aqua dest., pH 8.0 ± 0.2; klare Lösung, Flaschen mit weißen Verschlusskappen.
- **Enzym Konjugat****:** 1 Flasche mit 8 ml Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugierten Immunitäts-aufgereinigten Antikörpern gegen Calprotectin; rot gefärbte Lösung; lichtundurchlässige Flasche mit schwarzer Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 13 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; klare leicht bläuliche Lösung mit gelber Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 13 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/L, gebrauchsfertig; Flasche mit roter Verschlusskappe.

- **Calprotectin Standards***: 8 Fläschchen, je 0,6 ml, gebrauchsfertig; gelbe Lösungen mit roter Verschlusskappe:

Standard A:	7.8	ng/ml
Standard B:	15.6	ng/ml
Standard C:	31.3	ng/ml
Standard D:	62.5	ng/ml
Standard E:	125	ng/ml
Standard F:	250	ng/ml
Standard G:	500	ng/ml
Standard H:	1000	ng/ml
- **Calprotectin Kontrollen***: zwei Konzentrationen Calprotectins, Positivkontrollen, high control und low control, je 0,6 ml, gebrauchsfertig, gelbe Lösungen mit grüner Verschlusskappe:
 - * enthält 0.1 % Kathon und <0,1% Natriumazid
 - ** enthält 0,1% Kathon
 - *** enthält <0.1 % Natriumazid
 - **** enthält 0.02 % Methylisothiazolone, 0,02% Bromonitrodioxane und 0,002% andere Isothiazolone

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Stuhlnahmeröhrchen und Transportmittel
- Impfösen zur Stuhlprobenentnahme
- Eppendorfgefäße, verschließbar, 1,0 bis 1,5 ml
- Sensitive Waage, (40 – 150 mg)
- Plattenschüttler (500 – 700 rpm)
- Mikrozentrifuge (10.000xG)
- Gefrierschrank (-20°C oder niedriger)
- Mehrkanalpipette oder Multipipette
- Timer
- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- automatische Waschvorrichtung oder Multikanalpipette für manuelles waschen
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Die Reagenzien sind haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum auf den Etiketten bei einer Lagerung bei 2 – 8°C. Geöffnete Platten, Reagenzien und konzentrierte Puffer sind bei Lagerung bei 2 – 8 °C für 3 Monate haltbar.

Die gebrauchsfertigen Waschpuffer, Probenverdünnungspuffer und Extraktionspufferlösung sind in einem geschlossenen, sauberen Gefäß bei 2 – 8°C einen Monat haltbar. Vor Licht und hohen Temperaturen geschützt aufzubewahren.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur(18...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit Immunaффinitäts-aufgereinigtem, polyklonalen Calprotectin-Antikörpern beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 – 8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.

6.2. Anti-Calprotectin Antikörper Konjugat

Das Fläschchen enthält 8 ml einer Lösung von Meerrettichperoxidase (HRP) markiertem, Immunaффinitäts-aufgereinigtem Kaninchen Antikörper gegen Calprotectin in einem Puffer mit Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einem inerten roten Farbstoff. Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

6.3. Standards + Kontrollen

Die Fläschchen mit den Standards A - H und zwei Kontrollen enthalten 0,6 ml gebrauchsfertige Lösung. Die Konzentration ist auf den Etiketten der Fläschchen angegeben.

6.4. Extraktionspuffer

Der Extraktionspuffer wird vor Gebrauch 1:2,5 mit Aqua dest. in einer sauberen Flasche verdünnt (90 ml Extraktionspufferkonzentrat + 135 ml Aqua dest.). Gut mischen! Den verdünnten Puffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

6.5. Waschlösung

Die Waschlösung wird vor Gebrauch 1:20 mit Aqua dest. in einer sauberen Flasche verdünnt (50 ml Waschlösungskonzentrat + 950 ml Aqua dest.). Gut mischen! Den verdünnten Waschlösungspuffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

6.6. Probenverdünnungspuffer:

Der Probenverdünnungspuffer wird vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. in einer sauberen Flasche verdünnt (20 ml Probenverdünnungskonzentrat + 80 ml Aqua dest.) Gut mischen! Den verdünnten Probenverdünnungspuffer in einer verschlossenen Flasche bei 2 – 8°C lagern.

6.7. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 13 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2 – 8°C vor Licht geschützt in seiner originalen lichtundurchlässigen Flasche aufzubewahren.

6.8. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 13 ml 0,2 mol/L Schwefelsäure (R36/38, S26).

7. TRANSPORT UND VORBEREITUNG DER STUHLPROBEN

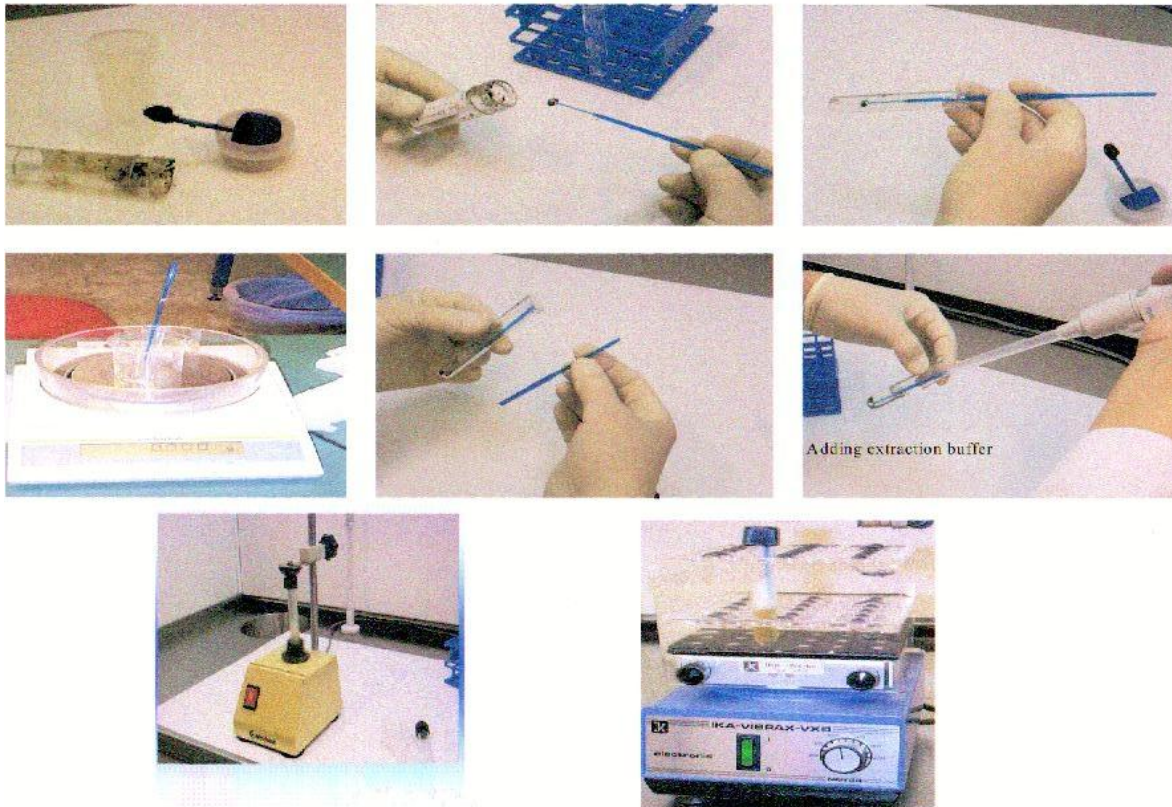
Calprotectin ist im Stuhl über mehrere Tage stabil, Patienten können zu Hause kleine Stuhlproben sammeln. Es sollen 1 – 5 g (ca. 1 Teelöffel) in einen entsprechenden sauberen Behälter überführt und innerhalb von 4 Tagen in das Labor gesendet werden. Der Transport sollte in einem Transportgefäß stattfinden, so ist es nicht notwendig, dass die Probe gekühlt transportiert wird. Temperaturen über 30°C sollten vermieden werden. Die Proben können vor dem Versand bei – 20°C oder niedriger eingefroren werden. Eingefrorene Proben müssen aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden, bevor die Extraktion durchgeführt wird.

Mehrfaches Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Arbeitsschritte

1. Wiegen (Tara) des leeren Röhrchens mit der Impföse.
2. Es sollten ca. 100 mg Stuhlprobe (zwischen 40 und 120 mg) Stuhlprobe mit der Impföse abgewogen und in das Röhrchen überführt werden. Die Entnahme von festem unverdaulichem Material, wie Fasern und Samen ist zu vermeiden.
3. Wiegen des Röhrchen mit Öse und Stuhlprobe zur Bestimmung des genauen Gewichtes der Stuhlprobe.
4. Abbrechen der oberen Hälfte der Öse, der untere Teil der Öse bleibt in dem Röhrchen.
5. Vorverdünnten Extraktionspuffer im Verhältnis 1:50 auf die abgewogene Stuhlprobe pipettieren.
z.B. 100 mg Stuhlprobe + 4,9 ml Extraktionspufferlösung
Das Probenröhrchen verschließen.
6. 30 Sekunden stark vortexen.
7. Die Proben sollten auf einem Schüttler über 1000 rpm weitere 30 +/- 5 Minuten gemischt werden, die Öse im Röhrchen fungiert als Rührer.
8. Der Extrakt entspricht eine 1:50 Verdünnung der Stuhlprobe und ist nun bereit für die Verdünnung bzw. den Test. Das Röhrchen für einige Minuten auf der Arbeitsfläche stehenlassen, damit vorhandene Partikel sich absetzen können und vorsichtig vom oberen Bereich des Röhrchen pipettieren. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt ist nicht notwendig, aber eine kurze Zentrifugation (z.B. bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge) hilft eine partikelfreie Lösung zu erhalten.
9. Ungefähr 0,5 ml in ein neues Gefäß für die Testabarbeitung oder die Lagerung überführen. Extrakte können bei 2 -8°C für mindestens fünf Tage und im gefrorenen Zustand bei mindestens -20°C für bis zu sechs Monate gelagert werden ¹⁵⁾.

Als eine Alternative zu der oben beschriebenen Abarbeitung zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials können verschiedene Stuhlextraktionssysteme verwendet werden. Zum Beispiel kann der Faecal Sample Preparation kit von Calpro AS Norwegen (Art. CAL0500) separat gekauft werden oder das Probenvorbereitungssystem der Firma Roche Diagnostics in Mannheim (Art. Nr.: 745804) verwendet werden.



Entnahme und Extraktion von Stuhlproben für den Calprotectin ELISA Test

8. Mikrotiterplattenbelegung

	1	2	3	4	5	6
A	Standard H 1000 ng/ml*	Standard H 1000 ng/ml*	Kontrolle 1	Kontrolle 1	Probe 7	Probe 7
B	Standard G 500 ng/ml	Standard G 500 ng/ml	Kontrolle 2	Kontrolle 2	Probe 8	Probe 8
C	Standard F 250 ng/ml	Standard F 250 ng/ml	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9
D	Standard E 125 ng/ml	Standard E 125 ng/ml	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10
E	Standard D 62.5 ng/ml	Standard D 62.5 ng/ml	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11
F	Standard C 31.3 ng/ml	Standard C 31.3 ng/ml	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12
G	Standard B 15.6 ng/ml	Standard B 15.6 ng/ml	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13
H	Standard A 7.8 ng/ml*	Standard A 7.8 ng/ml*	Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14

*optionaler Standard (als Verwendung für eine Qualitätskontrollmessung für den Assay): siehe Punkt 9 und 10

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Verfahrenstechnische Anweisungen:

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Vor Testbeginn die Proben, Standards und zwei Kontrollen auf das Plattenlayout, wie in Punkt 8 vorgeschlagen, in das mitgelieferten Ergebnisblatt eintragen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sollten Vorschriftsmäßig, wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, gelagert werden.

Standard H (1000 ng/ml) ist Bestandteil des Testkits, wird aber nur dazu verwendet, um zu gewährleisten, dass die höchsten OD-Werte des Tests nach 20 – 30 min Inkubation mit dem Substrat erreicht werden. Die höchste Präzision und Genauigkeit des Tests ist zwischen > 15,6 und < 500 ng/ml (dynamischer Bereich) aufgrund des hohen Maßes an Linearität in diesem Bereich. Standards B bis G müssen in jedem Lauf verwendet werden. Siehe Abschnitt 10, Qualitätskontrolle.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Es wird empfohlen die Kontrollen und Bestimmungen mindestens in Doppelbestimmungen durchzuführen.

Alle Reagenzien sollten mindestens 1 h vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18...25°C) gebracht werden.

ELISA Abarbeitung

1. Stuhlproben werden 1:50 verdünnt ((20 µl Probe + 980 µl Probenverdünnungspuffer) und gut gemischt. Proben mit einem Calprotectin Wert > 500 ng/ml sollten weiter verdünnt werden (z.B. 1:10) und erneut getestet werden, wenn ein präziser Wert benötigt wird.
2. 50 µl Standards, Kontrolle und vorverdünnte Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Siehe Mikrotiterplattenbelegung in Abschnitt 8.
3. Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie oder Platte abdecken und unter Schütteln bei Raumtemperatur bei 500 - 700 rpm 45 ± 5 Minuten inkubieren.
4. Nach der Inkubation Platteninhalt verwerfen und die Wells der Mikrotiterplatte 5 x mit 250 µl Waschlösung waschen. Die Absaug – und Waschköpfe regelmäßig kontrollieren, um das effiziente Waschen zu gewährleisten. Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Fließpapier ausschlagen, um verbleibende Waschlösung zu entfernen.
5. Die Konjugatflasche vorsichtig vor Gebrauch mischen (nicht schütteln) 50 µl Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6. Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie oder Platte abdecken und unter Schütteln bei Raumtemperatur bei 500 - 700 rpm 45 ± 5 Minuten inkubieren.
7. Der Waschvorgang wird wie oben beschrieben wiederholt (Punkt 4, 5 x 250 µl).
8. 100 µl Substrat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren, bevorzugt mit einer Multipette.
9. Mikrotiterplatte für 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. 100 µl 0,2 mol/L Stopplösung zusetzen.
11. Die Extinktion der Mikrotiterplatte wird im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen unter Durchführung einer Referenzmessung bei 620 nm.

10. Qualitätskontrolle

Eine neue Standardkurve muss bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Kontrolle muss bei jedem Lauf mitgeführt werden. Falls der Standard H verwendet wird, sollte der O.D. Wert \geq zwischen 2,0 und 3,0 sein. Der OD-Wert des Standard G (500 ng/ml) soll \geq 1,5 sein. Wenn ein Blank oder 0 Standard verwendet wird, sollte dieser unter 0,2 liegen.

11. AUSWERTUNG

Die Konzentration von Calprotectin in Stuhl sollte in mg/kg angegeben werden.

Die Bestimmung der Konzentration in Patientenproben kann mittels eines angeschlossenen Computers am ELISA Photometers oder Manuell wie folgt bestimmt werden:

Der Mittelwert der optischen Dicht (O.D.) wird für alle Doppelbestimmungen ermittelt. Zur Auswertung des Tests empfiehlt sich log/lin (Konzentration / Extinktion) von Standards mit 4-Parameter Funktion, eine Punkt- zu- Punkt-Auswertung oder eine Spline-Funktion. Mit der ermittelten Spline-Funktion werden die Konzentrationen der verdünnten Proben bestimmt. Der ermittelte Wert der Kontrolle soll in dem Bereich liegen, der auf dem Etikett angegeben ist.

Die Werte der Stuhlproben werden mit einer Verdünnung von 1:2500 umgerechnet (1:50 bei Extraktion und 1:50 bei Verdünnung des Überstandes). Beim Multiplizieren mit 2,5 erhält man die Konzentration im Stuhl in mg/kg (z.B. eine verdünnte Probe hat einen Wert von 100 ng/ml, die Konzentration in der Stuhlprobe beträgt somit $100 \times 2,5 = 250$ mg/kg). Wurden die Proben weiter verdünnt, muß dieser Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt werden.

12. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Folgende Calprotectin Werte in Stuhlproben wurden mittels **Calpro® Calprotectin ELISA Test (HRP)** in Veröffentlichungen (Johne et al., 2001; Røseth et al., 1992) ermittelt:

Normalwert:	5 – 50 mg/kg
Positiver Wert	> 50 mg/kg
Der Mittelwert bei Patienten mit symptomatischen Colonicarcinom	350 mg/kg
Patienten mit aktiven symptomatischen entzündlichen Darmerkrankungen	200 – 40 000 mg/kg

13. PRÄZISION

Interassay Präzision

Die Variation zwischen den wiederholten Analysen mit Stuhlproben wurde im dynamischen Bereich des Tests in einem Zeitraum über 5 Tagen mit 2 Testläufen am Tag bestimmt.

Bereich der getesteten Proben	Niedrig	Mittel	Hoch
Mittelwert (ng/ml)	27	179	481
VK (%)	6.4	4.5	4.0
Bereich (ng/ml)	24-29	170-193	453-500
N	10	10	10

Intraassay Präzision

Die Variation zwischen wiederholten Messungen von Stuhlproben wurde im dynamischen Bereich des Tests mittels eines Assays bestimmt.

Bereich der getesteten Proben	Niedrig	Mittel	Hoch
Mittelwert (ng/m)	25	177	475
VK (%)	11	3.4	1.5
Bereich (ng/m)	21-29	168-188	462-486
N	20	20	20

Bereich der Kontrollen	Niedrig	Hoch
Mittelwert (ng/ml)	69,36	235,23
VK (%)	7,08	7,36
N	56	36

14. KLINISCHE BEWERTUNG

Bei einem Vergleich mit der Referenzmethode gemessen in der Universitätsklinik Ullevaal, Oslo, Norwegen, ergab sich eine Übereinstimmung von $r^2 = 0,976$.

15. GRENZEN DES VERFAHRENS

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten des Patienten müssen zusätzlich zu den Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

16. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden oder nach 1 Monat nach Ansetzen der gebrauchsfertigen Lösungen aus den konzentrierten Komponenten.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Die Reagenzien enthalten antimikrobielle Substanzen in kleiner Konzentrationen.
- Der **Calpro® Calprotectin ELISA Test** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

16.1. Entsorgungshinweise








Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

17. LITERATUR

1. Bjarnason and Sherwood, Fecal calprotectin: A significant step in the non-invasive assessment of intestinal inflammation. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 11-13
2. Brandtzaeg P et al.: Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *American J of Clin Pathology* 1987; 87: 700-707.
3. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 14-22.
4. Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983; 134: 1-6.
5. Dale I et al.: Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. *American J of Clin Pathology* 1985; 84:24-34
6. Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): *Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins*. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210.
7. Fagerhol MK: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49:M74-M79.
8. Isaksen B and Fagerhol MK: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54:289-292.
9. Johne B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50:113-123.
10. Johne et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia, *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 291-296.
11. Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798.
12. Røseth et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54
13. Steinbakk M et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336:763-765.
14. Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47:506-513.
15. Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292: 41-54.
16. Yui S et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukaemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudates cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58: 650-658.

18. ORDER INFORMATION

Produktnummer: CAL0300 Calprotectin ELISA Test (HRP) (96 Bestimmungen)

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

Produktion:

NovaTec Immundiagnostica GmbH
 Waldstraße 23 A6
 D-63128 Dietzenbach
 Germany
 Tel.: + 49 6074 4876-0
 Fax: + 49 6074 4876-29
Info@novatec-id.com
www.novatec-id.com

Vertrieb:

CALPRO AS
 Arnstein Arnebergs vei 30
 N-1366 Lysaker, Norway
mail@calpro.no
www.calpro.no

CAL0300-ger-14092011-MW