



IVD

CE

Quantitative Fecal Calprotectin ELISA

KAPEPKT849



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230313

Date of issue : 13/03/2023

Revision date: 13/03/2023

History

Summary of change :

Current Version:
230313
New logo



Quantitative Fecal Calprotectin ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the Quantitative Measurement of Human Calprotectin Level in Stool

KAPEPKT849

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

INTENDED USE

This test kit is intended for use in the quantitative determination of human calprotectin (neutrophil cytoplasmic protein S100A8/A9) levels in stool samples. The test is useful for detecting inflammatory bowel disease (IBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease.

INTRODUCTION

Quantitative determination of fecal calprotectin is an indication of the severity of bowel inflammation. Also, higher levels of calprotectin in the stool are associated with an increased risk of relapse in patients with inflammatory bowel disease (IBD).¹ Low stool calprotectin levels correlate well with a low risk for intestinal allograft rejection. This assay uses specific monoclonal antibodies to ensure only calprotectin is detected.

ASSAY PRINCIPLE

This ELISA is designed, developed and produced for the quantitative measurement of human calprotectin in stool samples. The assay utilizes the two-site "sandwich" technique with two selected antibodies that bind to different epitopes of human calprotectin.

Assay calibrators, controls and patient samples are added directly to wells of a microtiter plate that is coated with antibody to calprotectin. After a short incubation period, the plate is washed and horseradish peroxidase (HRP) conjugated human calprotectin specific monoclonal antibody is added to each well. After the second incubation period, a "sandwich" of solid-phase antibody - human calprotectin - HRP conjugated monoclonal antibody" is formed. The unbound monoclonal antibodies and buffer matrix are removed in the subsequent washing step. For the detection of this immunocomplex, the well is then incubated with a substrate solution in a timed reaction and then measured in a spectrophotometric microplate reader. The enzymatic activity of the immunocomplex bound to the wall of each microtiter well is directly proportional to the amount of human calprotectin in the test sample. A calibrator curve is generated by plotting the absorbance versus the respective human calprotectin concentration for each calibrator on a point-to-point or 4-parameter curve fitting. The concentration of fecal human calprotectin in test samples is determined directly from this standard curve.

REAGENTS: Preparation and Storage

This test kit must be stored at 2 – 8 °C upon receipt. For the expiration date of the kit refer to the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

Prior to use allow all reagents to come to room temperature.

Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.

1. Calprotectin Antibody Coated Microplate

One microplate with twelve by eight strips (96 wells total) coated with calprotectin antibody. The plate is framed and sealed in a foil zipper bag with a desiccant. This reagent should be stored at 2 – 8 °C and is stable until the expiration date on the kit box.

2. Calprotectin Tracer Antibody

One vial containing 0.6 mL HRP labeled anti-human calprotectin antibody in a stabilized protein matrix. This reagent must be diluted with Tracer Antibody Diluent before use. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

3. Wash Concentrate

One bottle contains 30 mL of 30-fold concentrate. Before use the contents must be diluted with **870 mL** of demineralized water and mixed well. Upon dilution, this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide, non-mercury preservative. The diluted wash solution may be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

CHROM	TMB
-------	-----

4. TMB Substrate

One bottle contains 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

STOP	SOLN
------	------

5. Stop Solution

One bottle contains 12 mL of 2N Hydrochloric Acid (HCl). This reagent may be stored at 2 – 8°C or room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

Caution: this component contains potentially hazardous material

CAL	N
-----	---

6. Calprotectin Calibrators

Seven vials containing human calprotectin in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide, non-mercury preservative. **Refer to vials for exact concentration for each calibrator.** These reagents should be stored at 2 – 8 °C and are stable until the expiration date on the kit box.

CONTROL	N
---------	---

7. Calprotectin Controls

Three vials containing human calprotectin in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide, non-mercury preservative. **Refer to vials for exact concentration range for each control.** Both controls should be stored at 2 – 8 °C and are stable until the expiration date on the kit box.

DIL	BUF
-----	-----

8. Tracer Antibody diluent

One vial containing 12 mL ready to use buffer. It should be used only for Tracer Antibody dilution according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

ASS	BUF
-----	-----

9. Assay Buffer

One bottle containing 12 mL ready to use buffer. It should be used according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

EXTR	SOLN	CONC
------	------	------

10. Extraction Buffer Concentrate

One bottle containing 120 mL of 5-fold concentrate. Before use the contents must be diluted with 480 mL of demineralized water and mixed well. Upon dilution, this yields a ready-to-use Extraction Buffer for fecal sample extraction and dilution. The diluted Extraction Buffer may be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

SAFETY PRECAUTIONS

The reagents must be used in a professional laboratory. The source material for reagents containing bovine serum was derived in the contiguous 48 United States. It was obtained only from healthy donor animals maintained under veterinary supervision and found free of contagious diseases. Wear gloves while performing this assay and handle these reagents as if they are potentially infectious. Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide, or hydrochloric acid. TMB may cause irritation to skin and mucous membranes and cause an allergic skin reaction. TMB is a suspected carcinogen. Hydrochloric acid may cause severe irritation on contact with skin. Provide good ventilation in process area to prevent formation of vapor. Do not breathe mist, vapors, spray. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Do not ingest or inhale fumes. On contact, flush with copious amounts of water for at least 15 minutes. Use Good Laboratory Practices.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. **Fecal sample collection tube**
2. Precision single channel pipettes capable of delivering 50 µL, 100 µL, 500 µL, etc.
3. Disposable pipette tips suitable for above volume dispensing.
4. Disposable plastic 100 mL and 1000 mL bottle with caps.
5. Aluminum foil.
6. Deionized or distilled water.
7. Plastic microtiter well cover or polyethylene film.
8. ELISA multichannel wash bottle or automatic (semi-automatic) washing system.
9. Spectrophotometric microplate reader capable of reading absorbance at 450 nm and 650 or 630

SPECIMEN COLLECTION

1. Only one fecal sample is required. Fresh fecal sample must be collected by using DIAsource Fecal Sample Collection Tube. This tube is specially designed for easy collection of a substantially small amount of fecal sample into the tube pre-filled with sample extraction buffer. The collected fecal sample may be transported at ambient temperature, stored at 2-8 °C and tested within 3 days. Fecal sample may be stored below -20 °C for a longer storage period. Avoid more than three freeze - thaw cycles for each specimen. Before measuring for fecal Calprotectin, vortex to dissolve stool sample.

Note: The validation data of this test was generated by using Fecal Sample Collection Tube! To order this tube, please order Fecal Calprotectin Sample Collection kit. Each kit contains 50 tubes filled with extraction buffer. A different Calprotectin test result may be obtained by using a different type of fecal sample collection tube.

2. It is an alternative to collect fecal sample with a commercial stool sample collection device. The collected sample can be stored at 2-8 °C for up to 6 days. The collected sample should be diluted in two steps with 1:40 and 1:9 before measurement. Following is a detailed sample extraction process.

- (a) Label and tare an empty polypropylene tube together with an inoculation loop.
- (b) Weigh 50 – 100 mg of stool using the inoculation loop by placing it into the pre-tarred tube.
- (c) Record the net amount of sample and break the inoculation loop; leave the lower part of the loop in the tube.
- (d) Add Extraction Buffer (39 parts of the stool volume, 1 g stool = 1 ml) into the tube:

Fecal Sample Weight (mg)	Extraction Buffer Volume (ml)
50-54	2.0
55-59	2.2
60-64	2.4
65-69	2.6
70-74	2.8
75-79	3.0
80-84	3.2
85-89	3.4
90-94	3.6
95-99	3.8
100-104	4.0

(e) Vortex to dissolve stool sample. Let the sample set at room temperature vertically for 30 min for sedimentation or centrifuge the sample at 3000 x g for 5 minutes.

(f) Transfer 0.15 mL clear supernatant (no particles) to a clean tube with 1.2 ml Extraction Buffer. Mix the sample by gently vortexing. This extracted sample is ready to be measured for fecal Calprotectin.

ASSAY PROCEDURE

1. Reagent Preparation

- (1) Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.
- (2) Wash Concentrate must be diluted to working solution prior to use. Please see REAGENTS section for details.
- (3) Reconstitute all assay calibrator level 1 to level 7 and controls by adding **0.5 mL** of demineralized water to each vial. Allow the calibrators and controls to sit undisturbed for 5 minutes, and then mix well by inversions or gentle vortexing. One must make sure that all solid is dissolved completely prior to use. These reconstituted calibrators and controls may be stored at 2 – 8 °C for up to 3 days or at -10 °C or below for long-term storage. Do not exceed 3 freeze-thaw cycles.

(4) Test Configuration

ROW	STRIP 1	STRIP 2	STRIP 3	STRIP 4
A	CAL 0	CAL 4	C 2	SAMPLE 5
B	CAL 0	CAL 4	C 2	SAMPLE 6
C	CAL 1	CAL 5	C 3	SAMPLE 7
D	CAL 1	CAL 5	C 3	SAMPLE 8
E	CAL 2	CAL 6	SAMPLE 1	SAMPLE 9
F	CAL 2	CAL 6	SAMPLE 2	SAMPLE 10
G	CAL 3	C 1	SAMPLE 3	SAMPLE 11
H	CAL 3	C 1	SAMPLE 4	Etc.

- (5) Place a sufficient number of calprotectin coated microwell strips in a holder to run human calprotectin calibrators, controls and unknown samples in duplicate.
- (6) Prepare Tracer Antibody working solution by 1:21 fold dilution of the Calprotectin Tracer by adding the Tracer Antibody into the Tracer Antibody Diluent. Following is a table that outlines the relationship of strips used and antibody mixture prepared.

Strip no.	Tracer Antibody Diluent	Tracer Antibody
1	1 mL	50 µL
2	2 mL	100 µL
3	3 mL	150 µL
4	4 mL	200 µL
5	5 mL	250 µL
6	6 mL	300 µL
7	7 mL	350 µL
8	8 mL	400 µL
9	9 mL	450 µL
10	10 mL	500 µL
11	11 mL	550 µL
12	12 mL	600 µL

Note: this antibody working solution should be freshly prepared just before pipetting the tracer antibody to the washed wells.

2. Patient Sample Preparation

If the DIASource Fecal Sample Collection Tube is used, there is no sample preparation required.

3. Assay Procedure:

- (1) Add **50 µL** of Assay Buffer into the designated microwells. Gently tap the plate to coat the wells evenly.
- (2) Add **50 µL** of Calibrators, Controls and extracted patient samples into the designated microwells
- (3) Seal the plate wells securely, cover with foil or other material to protect from light, and rotate on an ELISA plate shaker (small orbit radius) for 1 hr. ± 5 minutes at 400 to 450 rpm.
- (4) Just prior to the end of the incubation time, dilute the proper amount of Tracer Antibody for the assay.
- (5) Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirating the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
- (6) Add **100 µL** of above diluted Tracer Antibody to each well.
- (7) Seal the plate wells securely, cover with foil or other material to protect from light, and rotate on an ELISA plate shaker (small orbit radius) for 45 minutes ± 5 minutes at 400 to 450 rpm.
- (8) Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirating the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
- (9) Add **100 µL** of TMB Substrate into each of the wells.
- (10) Cover the plate with aluminum foil to or other material to avoid exposure to light. Incubate plate static, at room temperature, for **12 minutes** (Optional 8 - 15 minutes).
- (11) Remove the aluminum foil. Read the absorbance at **620 nm** (optional wavelengths from 595 nm to 650 nm depending on available filters) **immediately**.
Note: please shake the plate to reach a homogenous blue color distribution in the well right before reading!
- (12) Immediately add **100 µL** of Stop Solution into each of the wells. Mix gently.
- (13) Read the absorbance at 450 nm with reference filter at 620 nm or 650 nm.

PROCEDURAL NOTES

1. It is recommended that all calibrators, controls and unknown samples be assayed in duplicate. The average absorbance reading of each duplicate should be used for data reduction and the calculation of results.
2. Keep light sensitive reagents in the original amber bottles.
3. Store any unused antibody coated strips in the foil zipper bag with desiccant to protect from moisture.

4. Careful technique and use of properly calibrated pipetting devices are necessary to ensure reproducibility of the test.
5. Incubation times or temperatures other than those stated in this insert may affect the results.
6. An orbital mixer with a larger orbit radius (e.g. > 1 cm) may be used at speeds of 150 to 200 rpm.
7. Avoid air bubbles in the microwell as this could result in lower binding efficiency and higher CV% of duplicate reading.
8. All reagents should be mixed gently and thoroughly prior to use. Avoid foaming.
9. If adapting this assay to automated ELISA system such as DS-2, a procedural validation is necessary if there is any modification of the assay procedure.

INTERPRETATION OF RESULTS

It is recommended to use a point-to-point or 4-parameter standard curve fitting.

1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate test results.
2. Subtract the average absorbance of the level 1 calibrator (0 ng/mL) from the average absorbance of all other readings to obtain corrected absorbance.
3. The standard curve is generated by the corrected absorbance of all calibrator levels on the ordinate against the standard concentration on the abscissa using point-to-point or log-log paper. Appropriate computer assisted data reduction programs may also be used for the calculation of results.

The fecal human calprotectin concentrations for the controls and the patient samples are read directly from the standard curve using their respective corrected absorbance.

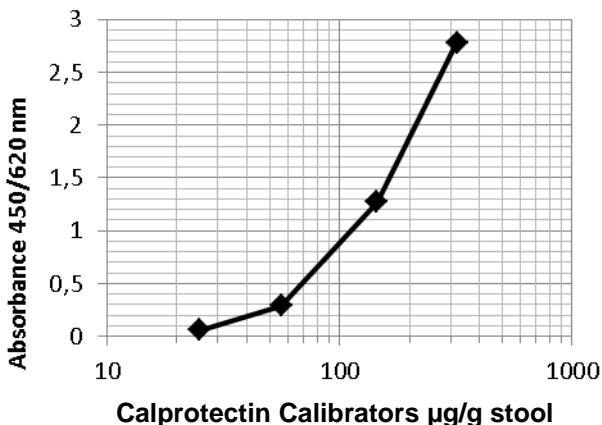
The use of the two absorbance wavelength at A 620 nm and A450/620 nm allows for two ways to calculate sample results. It is recommended to get sample results by using the primary standard curve at A 450/620 nm for samples with value below standard level 5. For samples with Calprotectin value above standard level 5, it is recommended to use the secondary standard curve at A 620 nm.

EXAMPLE DATA AND STANDARD CURVE (low)

A typical absorbance data and the resulting standard curve from this fecal human calprotectin ELISA are represented. **This curve should not be used in lieu of standard curve run with each assay.**

Well I.D.	OD 450 nm Absorbance			Results
	Readings	Average	Corrected	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/mL)	0.026 0.027	0.027	0.000	
Cal-1: 25 µg/g (69.5 ng/mL)	0.061 0.058	0.059	0.032	
Cal-2: 56.2 µg/g (156 ng/mL)	0.305 0.279	0.292	0.265	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/mL)	1.388 1.156	1.272	1.245	
Cal-4: 321 µg/g (892 ng/mL)	2.760 2.802	2.781	2.754	
Control 1	0.148 0.121	0.134	0.107	36.1 µg/g (100 ng/ml)
Control 2	2.601 2.614	2.607	2.580	291.4 µg/g (810 ng/ml)

Calprotectin ELISA – Standard Curve



EXPECTED VALUES

Stool samples from normal healthy adults with age of 24 – 58 were collected and measured with this ELISA. The recommended **normal cut-off** for fecal Calprotectin concentration by using this ELISA and sample collection system is **120 ng/mL or 43.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ directly read from assay standard curve**. We strongly recommend that each clinical laboratory to establish its own normal cut-off level by measuring normal stool samples with this ELISA and sample collection system.

Please be aware that patients with recent diarrhea would give a much higher level of fecal Calprotectin. Taking spicy food or alcohol may also cause intestinal irritation resulting in an abnormal fecal Calprotectin level.

Note: $\text{Calprotectin ng/mL} \times 0.36 = \text{Calprotectin } \mu\text{g/g}$

$\text{Calprotectin } \mu\text{g/g} \times 2.78 = \text{Calprotectin ng/mL}$

Please program ELISA reader by selecting assay calibrators concentration either in " $\mu\text{g}/\text{g}$ " or "ng/mL" to avoid manual calculation!

LIMITATION OF THE PROCEDURE

1. A strong positive of fecal calprotectin is likely to indicate a more significant clinical pathological condition of a patient. However, a low positive of fecal calprotectin does not indicate a lesser possibility of inflammation.
2. A normal fecal calprotectin level does not rule out the presence of any gastrointestinal diseases such as IBD.
3. For sample values reading greater than the highest calibrator, it is recommended to re-assay samples with dilution (i.e. 1:10 or 1:100 with Extraction Buffer).
4. Water deionized with polyester resins may inactivate the horseradish peroxidase enzyme.

QUALITY CONTROL

To assure the validity of the results each assay should include adequate controls.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The analytical sensitivity (LLOD) of the human calprotectin ELISA as determined by the 95% confidence limit on 12 duplicate determination of zero calibrator is approximately 2.5 ng/mL. A LLOQ was determined by dilution of assay calibrators and it is about 5 ng/mL.

High Dose "hook" effect

This assay has showed that it did not have any high dose "hook" for calprotectin level up to 40,000 ng/mL in extraction buffer.

Precision

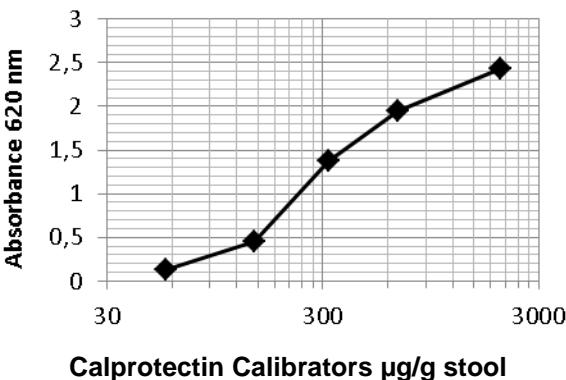
The intra-assay precision was validated by measuring three sample extracts in a single assay with 12 replicate determinations.

Mean Calprotectin Value ($\mu\text{g}/\text{g}$)	CV (%)
5.74	2.9
26.59	3.5
54.70	2.5

The inter-assay precision was validated by measuring two samples in duplicate in 4 individual assays.

Mean Calprotectin Value ($\mu\text{g}/\text{g}$)	CV (%)
21.64	8.6
70.31	2.0

Calprotectin ELISA – Standard Curve



The precision of inter-sample collection was performed by collecting five specimens from one bowel movement. These grouped samples are measured in an assay according to the assay procedure. The results of Calprotectin concentration in the value of ng/mL indicate that there are very satisfactory agreements of the five samples collected from one bowel movement.

Donor	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	CV%
A	57.0	65.0	59.2	56.2	49.8	9.5
B	60.4	55.3	58.8	71.7	81.1	16.3
C	72.3	69.3	51.5	65.7	65.6	12.3

Linearity

One sample was diluted with assay Buffer and tested. The results of Calprotectin concentration in the value of ng/mL are as follows:

DILUTION	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	RECOVERY %
Neat	195.84	-	-
1:2	87.88	97.92	89.7
1:4	46.58	48.96	95.1
1:8	24.53	24.48	100.2
1:16	13.77	12.24	112.5

Spike Recovery

Three fecal extracts and three assay calibrators were spiked together in various volume combinations and tested. The results Calprotectin concentration in the value of ng/mL are as follows:

#	Orig. Value	Amount Spiked	Observed Value	Expected Value	Recovery %
1	30.0	37.1	61.9	67.1	92.2
2	73.0	12.7	85.7	89.3	104.2
3	217.7	30.3	248.0	256.9	96.5

WARRANTY

This product is warranted to perform as described in its labeling and literature when used in accordance with all instructions. DiaSource ImmunoAssays S.A. DISCLAIMS ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, and in no event shall DiaSource ImmunoAssays S.A. be liable for consequential damages. Replacement of the product or refund of the purchase price is the exclusive remedy for the purchaser. This warranty gives you specific legal rights and you may have other rights, which vary from state to state.

REFERENCES

1. Tibble et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut. 2000;47:506-513
2. Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. Gut. 2005;54:364-8.

Calprotectin ELISA: Condensed Assay Protocol

1. 50 µl Assay Buffer per well
2. 50 µl Calibrators, controls and extracted patient samples
Incubate @ RT for 60 min on ELISA plate shaker wash 5 x
3. 100 µl Tracer Antibody
Incubate @ RT for 45 min on ELISA plate shaker Wash 5 x
4. 100 µl TMB Substrate
Incubate @ RT for 12 min static
5. Read absorbance at 620 nm
Immediately
6. 100 µl Stop Solution
7. Read absorbance at 450/620 or 450/650 nm

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website:

<https://www.diasource-diagnostics.com/>



Kit ELISA de détermination quantitative de calprotectine fécale

Test de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) pour la détermination quantitative de la calprotectine fécale dans les selles

KAPEPKT849

DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique - Tél. : +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

UTILISATION PRÉVUE

Ce kit de test est destiné à la détermination quantitative des niveaux de calprotectine humaine (protéine cytoplasmique des neutrophiles S100A8/A9) dans les échantillons de selles. Le test est utile pour détecter les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn.

INTRODUCTION

La détermination quantitative de la calprotectine fécale est une indication de la gravité de l'inflammation intestinale. En outre, des niveaux plus élevés de calprotectine dans les selles sont associés à un risque accru de rechute chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MII).¹ De faibles niveaux de calprotectine dans les selles sont en corrélation avec un faible risque de rejet d'allogreffe intestinale. Ce test utilise des anticorps monoclonaux spécifiques pour garantir que seule la calprotectine est détectée.

PRINCIPE DU DOSAGE

Ce kit ELISA a été conçu, développé et produit afin de mesurer quantitativement la calprotectine humaine dans les échantillons de selles. Ce test de dosage utilise la technique « sandwich » à deux sites avec deux anticorps sélectionnés qui se lient à des épitopes différents de la calprotectine humaine.

Les calibrateurs du test de dosage, les contrôles et les échantillons de patients sont ajoutés directement aux puits d'une plaque pour microtitration recouverte d'un anticorps anti-calprotectine. Après une courte période d'incubation, la plaque est lavée et un anticorps monoclonal spécifique à la calprotectine humaine conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté à chaque puits. Après la deuxième période d'incubation, un « sandwich » anticorps en phase solide - calprotectine humaine - anticorps monoclonal conjugué à la HRP est formé. Les anticorps monoclonaux non liés et la matrice tampon sont retirés lors de l'étape de lavage suivante. Pour la détection de cet immunocomplexe, l'anticorps traceur marqué par la HRP fixé dans les puits est alors incubé en présence d'une solution de substrat pendant un certain temps, puis mesuré dans un spectrophotomètre lecteur de microplaques. L'activité enzymatique de l'immunocomplexe lié à la paroi de chaque puits de microtitration est directement proportionnelle à la quantité de calprotectine humaine dans l'échantillon à tester. Une courbe d'étalonnage est générée en traçant l'absorbance en fonction de la concentration respective de calprotectine humaine pour chaque calibrateur sur un ajustement de courbe point à point ou à 4 paramètres. La concentration de calprotectine humaine fécale dans les échantillons à tester est déterminée directement à partir de cette courbe standard.

RÉACTIFS : PRÉPARATION ET STOCKAGE

Conserver ce kit entre 2 – 8°C à réception. Se référer à l'étiquette de la trousse pour connaître sa date de péremption. Tous les composants sont stables jusqu'à cette date.

Avant utilisation, amener tous les réactifs à température ambiante.
Ne pas combiner ou échanger des réactifs ayant des numéros de lots différents.

1. Microplaquette revêtue d'anticorps anti-calprotectine

Une microplaquette avec douze x huit barrettes (96 puits au total) recouverte avec un anticorps anti-calprotectine. La plaque est

encadrée et scellée dans un sachet à glissière en aluminium avec un dessicateur. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

2. Ab HRP CONC Anticorps traceur de la calprotectine

Un flacon contenant 0,6 ml d'anticorps anti-calprotectine humaine marqué à la HRP dans une matrice protéique stabilisée. Ce réactif doit être dilué avec le diluant pour anticorps traceur avant utilisation. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

3. WASH SOLN CONC Concentré de lavage

Une bouteille contenant 30 ml d'un concentré 30 fois. Avant utilisation, le contenu doit être dilué avec **870 ml** d'eau déminéralisée et bien mélangé. Après dilution, on obtient une solution de lavage contenant un agent tensioactif dans une solution saline tamponnée au phosphate avec un agent de conservation sans azoture ni mercure. La solution de lavage diluée peut être conservée à température ambiante et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

4. CHROM TMB Substrat TMB

Une bouteille contenant 12 ml de tétrahydronaphtaline (TMB) avec du peroxyde d'hydrogène. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

5. STOP SOLN Solution d'arrêt

Une bouteille contenant 12 ml d'acide chlorhydrique (H Cl) 2N. Ce réactif peut être conservé entre 2 et 8°C ou à température ambiante, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

Attention : ce composant contient des matières potentiellement dangereuses.

6. CAL N Calibrateurs de calprotectine

Sept flacons contenant de la calprotectine humaine dans une matrice lyophilisée à base de sérum bovin avec un conservateur sans azoture ni mercure. **Se référer aux flacons pour connaître la concentration exacte de chaque calibrateur.** Ces réactifs doivent être conservés entre 2 et 8°C, et sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.

7. CONTROL N Contrôles de calprotectine

Trois flacons contenant de la calprotectine humaine dans une matrice lyophilisée à base de sérum bovin avec un conservateur sans azoture ni mercure. **Se référer aux flacons pour la gamme de concentration exacte de chaque contrôle.** Les deux contrôles doivent être conservés entre 2 et 8°C, et sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

8. DIL BUF Diluant pour anticorps traceur

Un flacon contenant 12 ml de tampon de dilution prêt à l'emploi. Il doit être utilisé pour la dilution de l'anticorps traceur conformément aux procédures de dosage. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

ASS BUF

Tampon de dosage

Une bouteille contenant 12 ml de tampon de dilution prêt à l'emploi. Il doit être utilisé conformément aux procédures de dosage. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C, et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

10.

EXTR SOLN CONC

Concentré de tampon d'extraction

Une bouteille contenant 120 ml d'un concentré 5 fois. Avant utilisation, le contenu doit être dilué avec 480 ml d'eau déminéralisée et bien mélangé. Après dilution, on obtient un tampon d'extraction prêt à l'emploi pour l'extraction et la dilution d'un échantillon fécal. Le tampon d'extraction dilué peut être conservé à température ambiante et est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur la boîte du kit.

MESURES DE SÉCURITÉ

Les réactifs doivent être utilisés dans un laboratoire professionnel. Le matériel source pour les réactifs contenant du sérum bovin provient des 48 États contigus des États-Unis. Il a été obtenu seulement à partir d'animaux donneurs sains (sous contrôle vétérinaire), qui n'étaient pas atteints de maladies contagieuses. Porter des gants en faisant ce test et manipuler les réactifs comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Éviter tout contact avec des réactifs contenant du TMB, du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide chlorhydrique. Le TMB peut provoquer une irritation de la peau et des membranes muqueuses ainsi qu'une réaction allergique cutanée. Il est aussi soupçonné d'être carcinogène. L'acide chlorhydrique peut provoquer une irritation sévère au contact de la peau. Assurer une bonne ventilation dans la zone de test afin d'éviter la formation de vapeur. Ne pas respirer les brouillards, les vapeurs, les pulvérisations. Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. Ne pas ingérer ou inhale des vapeurs. En cas de contact, laver abondamment à l'eau pendant au moins 15 minutes. Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI

1. **Tube de collecte de l'échantillon de selles :**
2. Pipettes de précision à monocanal permettant de pipeter 50 µL, 100 µL, 500 µL, etc.
3. Embouts de pipette jetables adaptés au dosage de volumes supérieurs.
4. Bouteilles en plastique à usage unique de 100 ml et de 1 000 ml avec bouchons.
5. Papier d'aluminium.
6. Eau désionisée ou distillée.
7. Couvercle de plaque en plastique ou film de polyéthylène.
8. Bouteille de lavage ELISA à multicanaux ou système de lavage automatique (semi-automatique).
9. Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire une absorption à 450 nm et 650 ou 630 nm.

RECUEIL DE L'ÉCHANTILLON

1. Un seul échantillon fécal est nécessaire. L'échantillon fécal frais doit être collecté à l'aide du tube de prélèvement d'échantillons fécaux DIAsource. Ce tube est spécialement conçu pour le recueil facile d'une très petite quantité d'échantillon fécal dans le tube prérempli avec un tampon d'extraction. L'échantillon fécal prélevé peut être transporté à température ambiante, conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C et analysé dans les 3 jours. L'échantillon fécal peut être conservé en dessous de -20 °C pour une période de conservation plus longue. Éviter plus de trois cycles de congélation - décongélation pour chaque échantillon. Avant de mesurer la calprotectine fécale, mélanger au vortex pour dissoudre l'échantillon de selles.

Remarque : Les données de validation de ce test ont été générées en utilisant les tubes de prélèvement d'échantillons fécaux ! Pour commander ces tubes, veuillez commander le Kit de prélèvement d'échantillon de calprotectine fécale. Chaque kit contient 50 tubes remplis de tampon d'extraction. L'utilisation d'un autre type de tube de prélèvement d'échantillon fécal peut donner un résultat différent pour le test de la calprotectine.

2. Il est aussi possible de recueillir un échantillon de selles à l'aide d'un dispositif commercial de prélèvement d'échantillons de selles.

L'échantillon recueilli peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant 6 jours au maximum. L'échantillon collecté doit être dilué en deux étapes avec 1:40 et 1:9 avant d'être mesuré. Le processus d'extraction de l'échantillon est détaillé ci-dessous

- a) Étiqueter et tarer un tube de polypropylène vide avec une boucle d'inoculation.
- b) Peler 50 à 100 mg de selles à l'aide de la boucle d'inoculation et les placer dans le tube préalablement taré.
- c) Noter la quantité nette d'échantillon et rompre la boucle d'inoculation ; laisser la partie inférieure de la boucle dans le tube.
- d) Ajouter le tampon d'extraction (39 parties du volume des selles, 1 g de selles = 1 ml) dans le tube :

Poids de l'échantillon fécal (mg)	Volume du tampon d'extraction (ml)
50-54	2,0
55-59	2,2
60-64	2,4
65-69	2,6
70-74	2,8
75-79	3,0
80-84	3,2
85-89	3,4
90-94	3,6
95-99	3,8
100-104	4,0

Mélangez au vortex afin de dissoudre l'échantillon de selles. Réservez l'échantillon à température ambiante en position verticale pendant 30 minutes pour la sédimentation ou centrifuger l'échantillon à 3 000 x g pendant 5 minutes.

(f)) Transférer 0,15 ml de surnageant clair (sans particules) dans un tube propre avec 1,2 ml de tampon d'extraction Mélanger l'échantillon en agitant doucement au vortex. L'échantillon ainsi extrait est prêt pour mesurer les concentrations de calprotectine fécale.

PROCÉDURE DE TEST

1. Préparation des réactifs

- (1) Avant utilisation, amener tous les réactifs à température ambiante. Ne pas combiner ou échanger des réactifs ayant des numéros de lots différents.
- (2) Avant utilisation, il convient de diluer le concentré de nettoyage pour obtenir la solution de travail. Veuillez-vous reporter à la section RÉACTIFS pour les détails.
- (3) Reconstituer tous les calibrateurs de niveau 1 à 7 et les contrôles en ajoutant **0,5 ml** d'eau déminéralisée à chaque flacon. Laisser reposer les calibrateurs et les contrôles pendant 5 minutes, puis mélanger correctement en les retournant ou en les agitant légèrement au vortex. Il convient de s'assurer que tous les solides sont complètement dissous avant l'utilisation. Ces calibrateurs et contrôles reconstitués peuvent être conservés à 2 - 8 °C pendant 3 jours au maximum ou à -10 °C ou moins pour une conservation à long terme. Ne pas dépasser 3 cycles de congélation-décongélation.

(4) Configuration du test

LIGNE	Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3	Barrette 4
A	CAL 0	CAL 4	2	ÉCHANTILLON 5
B	CAL 0	CAL 4	2	ÉCHANTILLON 6
C	CAL 1	CAL 5	3	ÉCHANTILLON 7

D	CAL 1	CAL 5	3	ÉCHANTILLON 8
E	CAL 2	CAL 6	ÉCHANTILLON 1	ÉCHANTILLON 9
F	CAL 2	CAL 6	ÉCHANTILLON 2	ÉCHANTILLON 10
G	CAL 3	1	ÉCHANTILLON 3	ÉCHANTILLON 11
H	CAL 3	1	ÉCHANTILLON 4	Etc.

- (5) Placer un nombre suffisant de barrettes de micropuits recouvertes de calprotectine dans un support pour lancer les calibrateurs de calprotectine humaine, les contrôles et les échantillons inconnus en double.
- (6) Préparer la solution de travail de l'anticorps traceur en diluant le traceur de calprotectine d'un facteur 1:21 en ajoutant l'anticorps traceur au diluant de l'anticorps traceur. Vous trouverez ci-dessous un tableau qui présente la relation entre les barrettes utilisées et le mélange d'anticorps préparé.

N° de barrette	Anticorps traceur Diluant	Anticorps traceur
1	1 ml	50 µl
2	2 ml	100 µl
3	3 ml	150 µl
4	4 ml	200 µl
5	12 ml	250 µl
6	6 ml	300 µl
7	7 ml	350 µl
8	8 ml	400 µl
9	9 ml	450 µl
10	10 ml	500 µl
11	11 ml	550 µl
12	12 ml	600 µl

Remarque : cette solution de travail d'anticorps doit être fraîchement préparée juste avant de pipeter l'anticorps traceur dans les puits lavés.

2. A. Préparation des échantillons

Aucune préparation d'échantillon n'est nécessaire si le tube de prélèvement d'échantillons fécaux DIAsource est utilisé

3. Procédure de test

- (1) Ajouter 50 µl de tampon de dosage dans les micropuits prévus à cet effet. Tapoter doucement la plaque pour recouvrir uniformément les puits.
- (2) Ajouter 50 µl de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons prélevés sur les patients dans les micropuits prévus à cet effet.
- (3) Sceller solidement les puits de la plaque, les couvrir d'un film d'aluminium ou d'un autre matériau pour les protéger de la lumière et les faire tourner sur un agitateur de plaques ELISA (petit rayon orbital) pendant 1 h. ± 5 minutes à 400-450 tr/m
- (4) Juste avant la fin du temps d'incubation, diluer la quantité appropriée d'anticorps traceur pour le dosage.
- (5) Laver à 5 reprises chaque puits à l'aide de 350 µl de solution de lavage de travail, et aspirer complètement le contenu. On peut également utiliser un laveur automatique de microplaques.
- (6) Ajouter 100 µl de l'anticorps traceur dilué ci-dessus dans chaque puits.
- (7) Sceller solidement les puits de la plaque, les recouvrir d'une feuille d'aluminium ou d'un autre matériau pour les protéger de la lumière, et les faire tourner sur un agitateur de plaques ELISA (petit rayon orbital) pendant 45 minutes ± 5 minutes à 400-450 tr/m.
- (8) Laver à 5 reprises chaque puits à l'aide de 350 µl de solution de lavage de travail, et aspirer complètement le contenu. On

peut également utiliser un laveur automatique de microplaques.

- (9) Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chacun des puits.
- (10) Couvrir la plaque d'une feuille d'aluminium ou d'un autre matériau pour éviter l'exposition à la lumière. Incuber la plaque de façon statique, à température ambiante, pendant 12 minutes (8-15 minutes facultativement).
- (11) Retirer la feuille d'aluminium. Lire immédiatement l'absorbance à 620 nm (en option, longueurs d'onde de 595 à 650 nm selon les filtres disponibles). Remarque : agiter la plaque pour obtenir une distribution homogène de la couleur bleue dans le puits juste avant la lecture !
- (12) Ajouter immédiatement 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Mélanger doucement.
- (13) Lire l'absorbance à 450 nm par rapport au filtre de référence paramétré à 620 nm (ou 650 nm).

REMARQUES CONCERNANT LA PROCÉDURE

1. Il est recommandé de tester tous les calibrateurs, contrôles et échantillons inconnus en double. On utilisera la moyenne des valeurs d'absorption de chaque double pour réduire le nombre de données et calculer les résultats.
2. Conserver les réactifs sensibles à la lumière dans les flacons ambrés d'origine.
3. Stocker les barrettes de puits coatés inutilisées dans le sachet d'aluminium zipper contenant le dessiccateur pour les protéger de l'humidité.
4. Une technique rigoureuse et l'utilisation de systèmes de pipetage correctement calibrés sont nécessaires pour avoir une bonne reproductibilité du test.
5. Ne pas respecter les temps ou les températures d'incubation mentionnés dans ce mode d'emploi peut affecter les résultats.
6. Un mélangeur orbital avec un rayon orbital supérieur (par exemple > 1 cm) peut être utilisé à des vitesses de 150 à 200 tours par minute.
7. Éviter les bulles d'air dans les puits, ce qui pourrait entraîner une diminution de la fixation et des CV% de lecture de double plus élevés.
8. Tous les réactifs doivent être mélangés délicatement et soigneusement avant utilisation. Éviter la formation de mousse.
9. En cas d'adaptation de ce test de dosage à un système ELISA automatisé tel que le DS-2, une validation procédurale est nécessaire en cas de modification de la procédure de test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé d'utiliser un ajustement de courbe standard point à point ou à 4 paramètres.

1. Calculer l'absorbance moyenne pour chaque paire de résultats de test en double.
2. Soustraire l'absorbance moyenne du calibrateur 1 (0 ng/ml) de l'absorbance moyenne de toutes les autres lectures pour obtenir l'absorbance corrigée.
3. La courbe standard est générée par l'absorbance corrigée de tous les niveaux de calibrateur en ordonnée par rapport à la concentration des calibrateurs en abscisse en utilisant le papier point à point ou log-log. Des programmes appropriés de réduction des données assistée par ordinateur peuvent également être utilisés pour calculer les résultats.

Les concentrations de calprotectine humaine fécale pour les contrôles et les échantillons de patients sont lues directement à partir de la courbe standard en utilisant leur absorbance corrigée respective.

L'utilisation des deux longueurs d'onde d'absorbance (A 620 nm et A450/620 nm) permet de calculer les résultats des échantillons de deux manières différentes. Il est recommandé d'obtenir les résultats des échantillons en utilisant la courbe standard primaire à A 450/620 nm pour les échantillons dont la valeur est inférieure au niveau standard 5. Pour les échantillons dont la valeur de la calprotectine est supérieure au niveau standard 5, il est recommandé d'utiliser la courbe standard secondaire à A 620 nm.

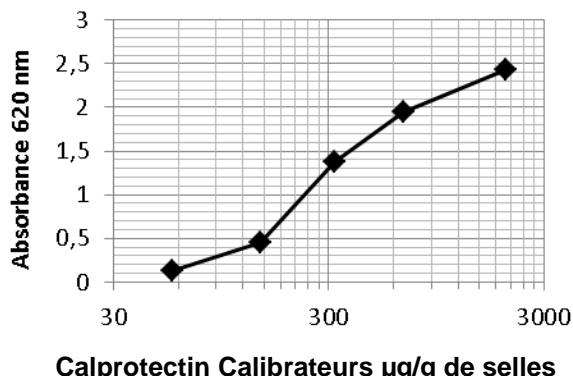
DONNÉES TYPES ET COURBE STANDARD (basse)

Les données d'absorbance caractéristiques et la courbe standard résultante de ce test ELISA de dosage de la calprotectine fécale sont représentées. **Cette courbe ne doit pas être utilisée à la place de la courbe standard exécutée lors de chaque test.**

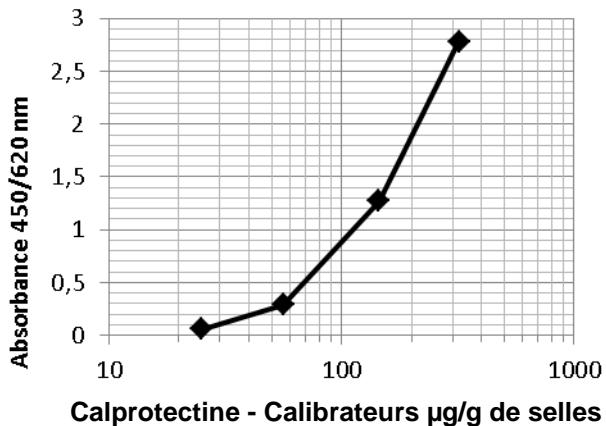
Puits I.D.	450> Absorbance			Résultats
	OD 450 nm Absorbance	Moyenne	Corrigée	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/mL)	0,026 0,027	0,027	0,000	
Cal-1: 25 µg/g (69,5 ng/mL)	0,061 0,058	0,059	0,032	
Cal-2: 56,2 µg/g (156 ng/mL)	0,305 0,279	0,292	0,265	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/mL)	1,388 1,156	1,272	1,245	
Cal-4: 321 µg/g (892 ng/mL)	2,760 2,802	2,781	2,754	
Contrôle 1	0,148 0,121	0,134	0,107	36,1 µg/g (100 ng/ml)
Contrôle 2	2,601 2,614	2,607	2,580	291,4 µg/g (810 ng/ml)

Cal-4: 321 µg/g (892 ng/mL)	1,368 1,380	1,374	1,332	
Cal-5: 669 µg/g (1860 ng/mL)	1,945 1,950	1,948	1,906	
Cal-6: 2000 µg/g (5560 ng/mL)	2,415 2,448	2,432	2,390	
Contrôle 2	1,145 1,149	1,147	1,105	266,3 µg/g
Contrôle 3	1,778 1,779	1,779	1,737	423,1 µg/g

Calprotectin ELISA – Courbe standard



Calprotectine - ELISA – Courbe



DONNÉES TYPES ET COURBE STANDARD (haut)

Les données d'absorbance caractéristiques et la courbe standard résultante de ce test ELISA de dosage de la calprotectine fécale sont représentées. **Cette courbe ne doit pas être utilisée à la place de la courbe standard exécutée lors de chaque test.**

Puits I.D.	620> Absorbance			Résultats
	OD 450 nm Absorbance	Moyenne	Corrigée	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/mL)	0,043 0,041	0,042	0,000	
Cal-2: 56,2 µg/g (156 ng/mL)	0,132 0,120	0,126	0,084	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/mL)	0,494 0,420	0,457	0,415	

VALEURS ATTENDUES

Des échantillons de selles d'adultes en bonne santé, âgés de 24 à 58 ans, ont été prélevés et mesurés à l'aide de ce test ELISA. Le seuil normal recommandé pour la concentration de calprotectine fécale en utilisant ce test ELISA et le système de prélèvement d'échantillons est de 120 ng/mL ou 43,2 µg/g, il est directement lu à partir de la courbe standard du test de dosage. Nous recommandons vivement à chaque laboratoire clinique d'établir son propre seuil normal en mesurant des échantillons de selles normaux à l'aide de ce test ELISA et de ce système de prélèvement d'échantillons.

Il convient de noter que les patients ayant récemment souffert de diarrhée présenteront un taux de calprotectine fécale beaucoup plus élevé. La consommation d'aliments épicés ou d'alcool peut également provoquer une irritation intestinale entraînant un taux anormal de calprotectine fécale.

Remarque : Calprotectine en ng/mL X 0,36 = Calprotectine en µg/g

Calprotectine en µg/g X 2,78 = Calprotectine en ng/mL

Veuillez programmer le lecteur ELISA en sélectionnant la concentration des calibrateurs d'essai en « µg/g » ou en « ng/mL » afin d'éviter tout calcul manuel !

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

1. Un résultat fortement positif de la calprotectine fécale indique très vraisemblablement un état pathologique clinique plus important chez un patient. Cependant, un faible taux positif de calprotectine fécale n'indique pas nécessairement une moindre possibilité d'inflammation.
2. Un taux normal de calprotectine fécale n'exclut pas la présence de maladies gastro-intestinales telles que les MII.
3. Pour les valeurs d'échantillon supérieures au calibrateur le plus élevé, il est recommandé de ré-analyser les échantillons avec une dilution (p. ex. 1:10 ou 1:100 avec le tampon d'extraction).
4. L'eau désionisée à l'aide de résines de polyesters peut inactiver la peroxydase du raifort.

CONTROLE QUALITÉ

Pour s'assurer de la validité des résultats, on devait inclure dans chaque test les contrôles adéquats.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité

La sensibilité analytique (LLOD ou limite inférieure de détection) du test ELISA de calprotectine telle que déterminée par la limite de confiance à 95 % sur 12 déterminations en double du calibrateur zéro, est d'environ 2,5 ng/mL. Une LLOQ (limite inférieure de quantification) a été déterminée par dilution des calibrateurs de l'essai et elle est d'environ 5 ng/mL.

Dose élevée (« effet crochet »)

Ce test a montré qu'il n'avait pas de « crochet » à haute dose pour le niveau de calprotectine jusqu'à 40 000 ng/mL dans le tampon d'extraction.

Précision

La précision intra-essai a été validée en mesurant trois extraits d'échantillons dans un seul essai avec 12 déterminations répétées.

Valeur moyenne de la calprotectine (µg/g)	CV (%)
5,74	2,9
26,59	3,5
54,70	2,5

La précision inter-essais a été validée en mesurant deux échantillons en double dans 4 tests individuels.

Valeur moyenne de la calprotectine (µg/g)	CV (%)
21,64	8,6
70,31	2,0

La précision du prélèvement inter-échantillons a été obtenue en collectant cinq échantillons à partir d'une selle. Ces échantillons groupés sont mesurés dans un test conformément à la procédure de test. Les résultats de la concentration en calprotectine en ng/mL indiquent qu'il y a une concordance très satisfaisante entre les cinq échantillons prélevés lors d'une défécation.

Donneur	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	% CV
A	57,0	65,0	59,2	56,2	49,8	9,5
B	60,4	55,3	58,8	71,7	81,1	16,3
C	72,3	69,3	51,5	65,7	65,6	12,3

Linéarité

Un échantillon a été dilué avec le tampon de dosage et testé. Les résultats de la concentration de calprotectine en ng/mL sont les suivants :

DILUTION	VALEUR OBSERVÉE	VALEUR ATTENDUE	RÉCUPÉRATION %
Non dilué	195,84	-	-
1:2	87,88	97,92	89,7
1:4	46,58	48,96	95,1
1:8	24,53	24,48	100,2
1:16	13,77	12,24	112,5

Récupération après un pic

Trois extraits fécaux et trois calibrateurs d'essai ont été ajoutés ensemble dans différentes combinaisons de volumes et testés. Les résultats de calprotectine en ng/ml sont les suivants :

#	Val. orig.	Quantités ajoutées	Valeurs observées	Valeurs attendues	% récupération
1	30,0	37,1	61,9	67,1	92,2
2	73,0	12,7	85,7	89,3	104,2
3	217,7	30,3	248,0	256,9	96,5

GARANTIE

Le fonctionnement de ce produit est garanti tel que décrit dans sa notice et la littérature associée, lorsqu'il est utilisé conformément à l'ensemble des instructions. DIAsource ImmunoAssays S.A DÉCLINE EXPRESSÉMENT TOUTE RESPONSABILITÉ À L'ÉGARD D'UNE GARANTIE IMPLICITE DE LA QUALITÉ MARCHANDE DU PRODUIT OU DE SON ADÉQUATION À UNE FIN PARTICULIÈRE, et DIAsource ImmunoAssays SA. ne sera en aucun cas responsable des dommages consécutifs. Le remplacement du produit ou le remboursement de l'achat sont les uniques recours de l'acheteur. Cette garantie vous confère des droits légaux spécifiques et d'autres droits peuvent vous être accordés, ceux-ci variant d'un État à l'autre.

RÉFÉRENCES

1. Tibble et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut.2000;47:506-513
2. Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. Gut. 2005 54 364 8

Dosage de la calprotectine par ELISA : protocole d'essai condensé

1. 50 µl de tampon de dosage par puits
2. 50 µl de calibrateurs, contrôles et échantillons de patients
*Incuber @ TA pendant 60 min sur l'agitateur de la plaque
ELISA
Laver 5 x*
3. 100 µl d'anticorps traceur
*Incuber @ TA pendant 45 min sur l'agitateur de la plaque
ELISA
Laver 5 x*
4. 100 µl de substrat TMB
Incuber @ TA pendant 12 min en mode statique
5. Lire l'absorbance à 620 nm
Immédiatement
6. 100 µl de solution d'arrêt
7. Lire l'absorbance à 450/620 ou 450/650 nm



Quantitative Fecal Calprotectin ELISA

Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para la Determinación
Cuantitativa del Nivel de Calprotectina Humana en las Heces

KAPEPKT849

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

USO PREVISTO

Este kit está destinado para ser utilizado en la determinación cuantitativa de los niveles de calprotectina humana (proteína citoplasmática de neutrófilos S100A8/A9) en muestras fecales. La prueba sirve para detectar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) como la colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn.

INTRODUCCIÓN

La determinación cuantitativa de la calprotectina fecal es una indicación de la gravedad de la inflamación intestinal. Asimismo, niveles elevados de calprotectina fecal están asociados con un mayor riesgo de reincidencia en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII)¹. Niveles bajos de calprotectina se correlacionan bien con un bajo riesgo de rechazo de alojamientos intestinales. Este ensayo utiliza anticuerpos monoclonales específicos para garantizar que sólo se detecte calprotectina.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este ELISA está diseñado, desarrollado y producido para la determinación cuantitativa de la calprotectina humana en muestras fecales. El ensayo utiliza; la técnica de dos sitios en "sándwich" con dos anticuerpos seleccionados que se unen a epítopes distintos de la calprotectina humana.

Los calibradores, controles del ensayo y muestras de los pacientes se cargan directamente en los pocillos de una placa de microvaloración que están recubiertos con un anticuerpo contra la calprotectina. Luego de un corto periodo de incubación, la placa se lava y a cada pocillo se le agrega un anticuerpo monoclonal específico a la calprotectina humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Despues de un segundo periodo de incubación, se forma un "sándwich" de anticuerpo en fase sólida – calprotectina humana - anticuerpo monoclonal conjugado con HRP. Los anticuerpos monoclonales libres y la matriz del tampón se eliminan en el siguiente paso de lavados. Para detectar este complejo inmune, se incuba el pocillo con una solución de sustrato en una reacción cronometrada y luego se mide en un espectrofotómetro lector de placas. La actividad enzimática del complejo inmune unido a la pared de cada pocillo de la placa de microvaloración es directamente proporcional a la concentración de calprotectina humana en la muestra del paciente. Se genera una curva de calibración y se traza la absorbancia versus la concentración de calprotectina humana respectiva para cada calibrador ajustando la curva punto a punto o con 4 parámetros. La concentración de la calprotectina fecal humana en las muestras se determina directamente a partir de esta curva estándar.

REACTIVOS: Preparación y Almacenaje

Este kit debe ser almacenado a 2 – 8 °C al recibirlo. Para la fecha de caducidad del kit, consulte la etiqueta en la caja del kit. Todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad.

Antes de utilizar, deje que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente.

Los reactivos de kits con números de lote diferentes no se deben combinar o intercambiar.

1. Placas de microvaloración recubiertas con anticuerpo anti Calprotectina

Una placa de microvaloración con doce por ocho pocillos (96 pocillos en total) recubiertos con anticuerpo anti calprotectina. La placa está enmarcada y contenida en una bolsa de aluminio sellable con un desecante. Este reactivo debe ser almacenado a 2 – 8 °C y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

2. Ab HRP CONC Anticuerpo de Calprotectina marcado

Un vial con 0,6 ml de HRP etiquetado anticuerpo anti calprotectina humana en una matriz proteica estabilizada. Este reactivo debe ser diluido con diluyente del anticuerpo marcado antes de su uso. Este reactivo debe ser almacenado a 2 – 8°C y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

3. WASH SOLN CONC Solución de lavado concentrada

Una botella contiene 30 ml de tampón concentrado 30 veces. Antes de utilizar el contenido debe ser diluido y bien mezclado con **870 ml** de agua desmineralizada. Al diluirlo se obtiene una solución de lavado de trabajo que contiene un surfactante en tampón salino fosfatado con un conservante sin azida y sin mercurio. La solución de lavado diluida puede almacenarse a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

4. CHROM TMB Sustrato

Una botella contiene 12 ml de tetrametilbenzidina (TMB) con peróxido de hidrógeno. Este reactivo debe almacenarse a 2 – 8°C y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

5. STOP SOLN Solución de parada

Una botella contiene 12 ml de ácido clorhídrico (HCl) 2N. Este reactivo puede almacenarse a 2 – 8°C o a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

Precaución: este componente contiene material potencialmente peligroso

6. CAL N Calibradores de Calprotectina

Siete viales que contienen calprotectina humana en una matriz liofilizada en base a suero bovino con un conservante sin azida y sin mercurio. **Consulte los viales para la concentración exacta de cada calibrador.** Estos reactivos deben almacenarse a 2 – 8°C y son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

7. CONTROL N Controles de Calprotectina

Tres viales con calprotectina humana en una matriz liofilizada en base a suero bovino con un conservante sin azida y sin mercurio. **Consulte los viales para el rango de concentración exacto de cada control.** Ambos controles deben almacenarse a 2 – 8 °C y son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

DIL BUF

Diluyente del anticuerpo maracdo

Un vial con 12 ml de tampón listo para usar. Debe utilizarse solo para diluir el anticuerpo de detección de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Este reactivo debe almacenarse a 2 - 8°C y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

ASS BUF

Tampón del ensayo

Una botella de tampón con 12 ml listo para usar. Debe utilizarse de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Este reactivo debe almacenarse a 2 - 8°C y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

EXTR SOLN CONC

Tampón concentrado de extracción

Una botella con 120 ml de tampón concentrado 5 veces. Antes de utilizar el contenido debe diluirse y mezclarse bien con 480 ml de agua desmineralizada. Una vez diluido se obtiene un tampón de extracción listo para su uso para la extracción y dilución de la muestra fecal. El tampón de extracción diluido puede almacenarse a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Los reactivos deben de ser utilizados en un laboratorio acreditado. El material utilizado para los reactivos contiene suero bovino obtenido en los Estados Unidos. Fue obtenido a partir de animales donantes sanos bajo la supervisión veterinaria y libres de enfermedades contagiosas. Utilizar guantes al realizar el ensayo y utilizar los reactivos como si fueran altamente contagiosos. Evitar el contacto con los reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno o ácido clorhídrico. La TMB puede provocar irritación en la piel o membranas mucosas y causar reacciones alérgicas cutáneas. La TMB es un supuesto cancerígeno. El ácido clorhídrico puede causar irritación severa en el contacto con la piel. Proporcionar de una buena ventilación en la zona del proceso para prevenir la no formación de vapores. No respirar las emisiones, vapores, aerosoles. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa. No ingerir o inhalar los vapores. Cualquier contacto debe de lavarse con abundante agua durante como mínimo 15 minutos. Utilizar las Buenas Prácticas del Laboratorio.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

1. **Tubo para toma de muestra fecal**
2. Pipeta de precisión de un solo canal capaz de dispensar 50 µl, 100 µl, 500 µl, etc.
3. Puntas de pipetas desechables adecuadas para dispensar los volúmenes mencionados.
4. Botellas plásticas desechables de 100 ml y 1000 ml con tapas.
5. Papel de aluminio.
6. Agua desionizada o destilada.
7. Cubierta plástica para placas de microvaloración o película de polietileno.
8. Botella de lavado multi canal para ELISA o sistema de lavado automático (semi automático).
9. Espectrofotómetro lector de placas de microvaloración capaz de leer absorbancias a 450 nm y 650 o 630

TOMA DE LA MUESTRA

1. Solo se requiere una muestra fecal. Se debe tomar una muestra fresca de heces utilizando el Fecal Calprotectin Sample Collection Tube de DIAsource. Este tubo está diseñado especialmente para tomar fácilmente una muestra fecal pequeña en el tubo que viene con un volumen de tampón de extracción de la muestra. La muestra fecal puede transportarse a temperatura ambiente, almacenada a 2-8 °C y analizada dentro de 3 días. La muestra fecal puede almacenarse bajo -20 °C por un periodo de almacenaje más largo. Evitar más de tres ciclos congelación-descongelación para cada muestra.

Antes de medir la Calprotectina fecal, vórtice para disolver la muestra de heces.

Nota: Los datos de validación para esta prueba fueron generados utilizando el Fecal Calprotectin Sample Collection Tube! Para hacer un pedido de este tubo, pida el Fecal Calprotectin Sample Collection Kit.

Cada kit contiene 50 tubos lleno de tampón de extracción. Podría obtenerse un resultado diferente de la prueba de Calprotectina si se utiliza un tubo para toma de muestra fecal diferente.

2. Una alternativa es tomar la muestra fecal con un aparato para toma de muestra de heces comercial. La muestra puede ser almacenada a 2-8 °C hasta 6 días. La muestra debe diluirse en dos etapas a 1:40 y 1:9 antes de medir. A continuación se detalla el proceso de extracción de la muestra.

(a) Etiquete y tire un tubo de polipropileno vacío junto con un bucle de inoculación.

(b) Pese entre 50 – 100 mg de heces utilizando el bucle de inoculación colocándolo en el tubo previamente tarado.

(c) Anote la cantidad neta de muestra y quiebre el bucle de inoculación; deje la mitad inferior del bucle en el tubo.

(d) Agregue tampón de extracción (39 partes del volumen de heces, 1 g heces = 1 ml) en el tubo:

Peso de la muestra fecal (mg)	Volumen del tampón de extracción (ml)
50-54	2,0
55-59	2,2
60-64	2,4
65-69	2,6
70-74	2,8
75-79	3,0
80-84	3,2
85-89	3,4
90-94	3,6
95-99	3,8
100-104	4,0

(e) Agite en un vortex para disolver la muestra de heces. Deje la muestra a temperatura ambiente en posición vertical por 30 min para que sedimente o centrifugue la muestra a 3000 x g por 5 minutos.

(f) Transfiera 0,15 mL del sobrenadante claro (sin partículas) a un tubo limpio con 1,2 ml de tampón de extracción. Mezcle la muestra suavemente en el Vortex. Esta muestra extraída está lista para determinar la calprotectina fecal.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.Preparación de reactivos

- (1) Antes de usar deje que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente. No se deben combinar o intercambiar reactivos de kits con distinto número de lote.
- (2) Solución de lavado concentrada debe ser diluido a una solución de trabajo antes de utilizar. Consulte la sección REACTIVOS para ver detalles.
- (3) Reconstituya todos los calibradores del ensayo del nivel 1 al 7 y los controles agregando 0,5 ml de agua desmineralizada a cada vial. Deje los calibradores y controles sin moverlos por 5 minutos, luego mézclelos bien por inversión o suavemente en el vortex . Debe asegurarse que todos los sólidos estén totalmente disueltos antes de utilizar. Los calibradores y controles reconstituidos pueden almacenarse a 2 – 8 °C hasta por 3 días o a -10 °C o menos para almacenaje a largo plazo. No congele y descongele más de tres veces.

(4) Configuración de la prueba

HILERA	TIRA 1	TIRA 2	TIRA 3	TIRA 4
A	CAL 1	CAL 5	C 2	MUESTRA 5
B	CAL 1	CAL 5	C 2	MUESTRA 6
C	CAL 2	CAL 6	C 3	MUESTRA 7
D	CAL 2	CAL 6	C 3	MUESTRA 8
E	CAL 3	CAL 7	MUESTRA 1	MUESTRA 9
F	CAL 3	CAL 7	MUESTRA 2	MUESTRA 10
G	CAL 4	C 1	MUESTRA 3	MUESTRA 11
H	CAL 4	C 1	MUESTRA 4	Etc.

- (5) Coloque una cantidad suficiente de tiras de micro pocillos recubiertos con calprotectina en un portador para incluir los calibradores de calprotectina, los controles, y las muestras desconocidas en duplicado.
- (6) Prepare la solución de trabajo del anticuerpo marcado diluyendo el anticuerpo de calprotectina marcado 1:21 veces, agregando el anticuerpo marcado al diluyente del anticuerpo marcado. A continuación hay una tabla que describe la relación de las tiras utilizadas con la cantidad de la mezcla de anticuerpos preparada.

Tira Nº	Diluyente del anticuerpo marcado	Anticuerpo marcado
1	1 ml	50 µl
2	2 ml	100 µl
3	3 ml	150 µl
4	4 ml	200 µl
5	5 ml	250 µl
6	6 ml	300 µl
7	7 ml	350 µL
8	8 ml	400 µl
9	9 ml	450 µl
10	10 ml	500 µl
11	11 ml	550 µl
12	12 ml	600 µl

Nota: esta solución de trabajo de anticuerpos debe ser preparada inmediatamente antes de pipetejar el anticuerpo marcado en los pocillos lavados.

2. Preparación de la muestra del paciente

Si utiliza el Fecal Calprotectin Sample Collection Tube de DIAsource no es necesario preparar la muestra.

3. Procedimiento del ensayo:

- (1) Agregue 50 µl de tampón del ensayo a los pocillos designados. Golpee suavemente la placa para recubrir los pocillos de forma pareja
- (2) Agregue 50 µl de calibradores, controles y muestras extraídas de los pacientes a los pocillos designados.
- (3) Selle los pocillos en la placa de forma segura con aluminio u otro material para proteger de la luz y colóquela en un agitador para placas de microvaloración (con radio orbital pequeño) por 1 hr. ± 5 minutos de 400 a 450 rpm.
- (4) Justo antes de terminar la incubación, diluya la cantidad adecuada del anticuerpo marcado para el ensayo.
- (5) Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µl de la solución de trabajo de lavado a cada pocillo y luego aspire el contenido completamente. Alternativamente se puede utilizar una lavadora automática para placas de microvaloración.
- (6) Agregue 100 µl del diluido anticuerpo marcado a cada pocillo.
- (7) Selle la placa de forma segura cubra con aluminio u otro material para proteger de la luz y colóquela en un agitador para placas de microvaloración ELISA (radio orbital pequeño) por 45 minutos ± 5 minutos de 400 a 450 rpm.
- (8) Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µl de la solución de trabajo de lavado a cada pocillo y luego aspire el contenido completamente. Alternativamente se puede utilizar una lavadora automática para placas de microvaloración.
- (9) Agregue 100 µl de TMB sustrato a cada uno de los pocillos.
- (10) Cubra la placa con papel de aluminio u otro material para evitar la exposición a la luz. Incube la placa estática, a temperatura ambiente por 12 minutos (Opcional 8 - 15 minutos).
- (11) Saque el papel de aluminio. Lea la absorbancia a 620 nm (longitudes de onda opcionales de 595 nm a 650 nm dependiendo de los filtros disponibles) **inmediatamente**.
Nota: Por favor, agite la placa para conseguir una distribución de color azul homogeneizada en el pocillo justo antes de la lectura
- (12) Inmediatamente agregue 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Mezcle suavemente.
- (13) Lea la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 620 nm o 650 nm.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Se recomienda que todos los calibradores, controles y muestras se analicen en duplicado. Se debe utilizar la lectura promedio de la absorbancia de cada duplicado para la reducción de datos y cálculo de los resultados.
2. Mantenga los reactivos que son sensibles a la luz en sus botellas marrón original.
3. Almacene todas las tiras recubiertas no utilizadas en las bolsas de aluminio sellables con desecante para protegerlas de la humedad.
4. Una técnica cuidadosa y el uso de dispositivos para pipetejar adecuadamente calibrados son necesarios para asegurar la reproducibilidad de la prueba.
5. Tiempos de incubación o temperaturas distintas a las establecidas en este prospecto, pueden afectar los resultados.
6. Un agitador orbital con un radio orbital más grande (p. ej. > 1 cm) puede ser usado a velocidades de 150 a 200 rpm.
7. Evite las burbujas de aire en los micro pocillos ya que esto podría resultar en una disminución de la eficiencia de la unión y un CV% de lecturas dobles más alto.
8. Todos los reactivos deben mezclarse suave y completamente antes de usarlos. Evite la formación de espuma.
9. Si adaptarse este ensayo para Sistema automatizado Elisa como DS-2, una validación de procedimiento es necesario si hay alguna modificación del procedimiento de ensayo

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se recomienda utilizar punto a punto o 4- parámetros para el ajuste de la curva estándar.

1. Calcule la absorbancia promedio para cada par de resultados de las pruebas en duplicado.
2. Reste la absorbancia promedio del calibrador nivel 1 (0 ng/ml) del promedio de la absorbancia de todas las otras lecturas para obtener la absorbancia corregida.
3. La curva estándar es generada por la absorbancia corregida de todos los niveles de calibradores en la ordenada contra la concentración estándar en la abscisa utilizando papel punto a punto o log-log. También se pueden utilizar programas de reducción de datos asistidos por un ordenador para calcular los resultados.

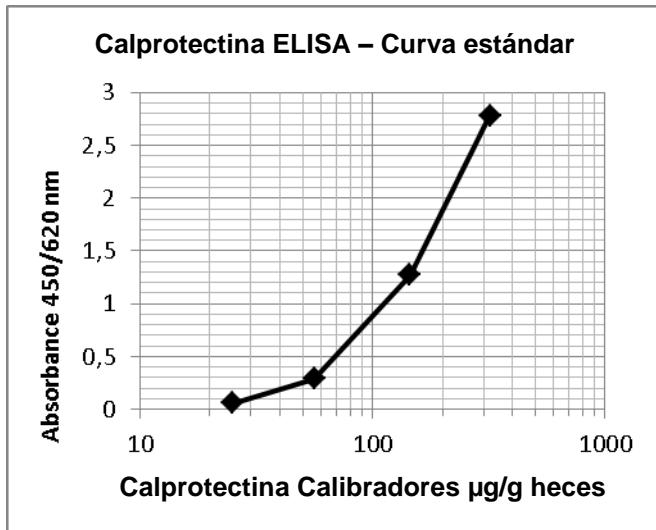
Las concentraciones de calprotectina humana fecal en los controles y las muestras de pacientes se leen directamente de la curva estándar utilizando las absorbancias respectivas corregidas.

El uso de dos longitudes de onda para la absorbancia a A 620 nm y A 450/620 nm permite calcular los resultados de las muestras de dos maneras. Se recomienda obtener los resultados de las muestras utilizando la curva estándar primaria a A 450/620 nm para muestras con valores bajo el estándar nivel 5. En tanto para muestras de calprotectina con valores sobre el estándar nivel 5, se recomienda utilizar la curva estándar secundaria a A 620 nm.

EJEMPLO DE DATOS Y CURVA ESTANDAR (bajo)

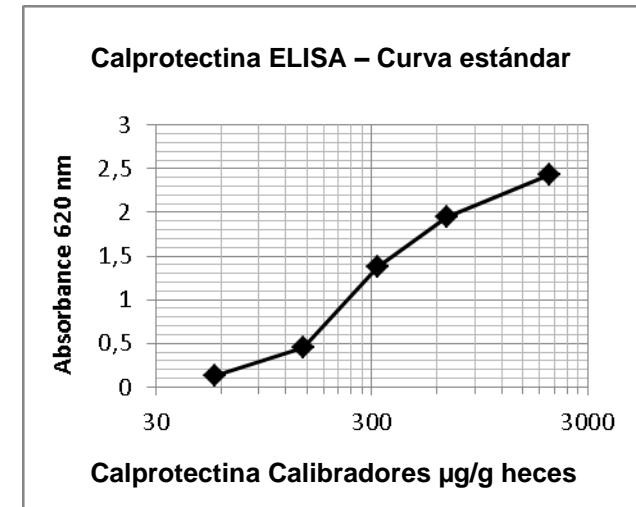
Se presentan datos de absorbancia típicos y la curva estándar resultante de este ELISA de calprotectina fecal humana. **No se debe utilizar esta curva en vez de la curva estándar producida en cada ensayo.**

Pocillo I.D.	DO 450 nm Absorbancia			Resultados
	Lecturas	Promedio	Corregido	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/ml)	0,026 0,027	0,027	0,000	
Cal-1: 25 µg/g (69.5 ng/ml)	0,061 0,058	0,059	0,032	
Cal-2: 56.2 µg/g (156 ng/ml)	0,305 0,279	0,292	0,265	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/ml)	1,388 1,156	1,272	1,245	
Cal-4: 321 µg/g (892 ng/ml)	2,760 2,802	2,781	2,754	
Control 1	0,148 0,121	0,134	0,107	36,1 µg/g (100 ng/ml)
Control 2	2,601 2,614	2,607	2,580	291,4 µg/g (810 ng/ml)



Se presentan datos de absorbancia típicos y la curva estándar resultante de este ELISA de Calprotectina fecal humana. **No se debe utilizar esta curva en vez de la curva estándar producida en cada ensayo.**

Pocillo I.D.	DO 620 nm Absorbancia			Resultados
	Lecturas	Promedio	Corregido	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/ml)	0,043 0,041	0,042	0,000	
Cal-2: 56.2 µg/g (156 ng/ml)	0,132 0,120	0,126	0,084	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/ml)	0,494 0,420	0,457	0,415	
Cal-4: 321 µg/g (892 ng/ml)	1,368 1,380	1,374	1,332	
Cal-5: 669 µg/g (1860 ng/ml)	1,945 1,950	1,948	1,906	
Cal-6: 2000 µg/g (5560 ng/ml)	2,415 2,448	2,432	2,390	
Control 2	1,145 1,149	1,147	1,105	266,3 µg/g (740 ng/ml)
Control 3	1,778 1,779	1,779	1,737	423,1 µg/g (1176 ng/ml)



VALORES ESPERADOS

Se tomaron muestras de heces de adultos normales sanos de entre 24 – 58 años de edad y se analizaron por ELISA. El **cut-off normal** recomendado para la concentración de calprotectina fecal utilizando este ELISA y el sistema de toma de muestra es de **120 ng/ml o 43,2 µg/g** leído directamente desde la curva estándar del ensayo. Recomendamos encarecidamente que cada laboratorio clínico establezca su propio nivel de cut-off normal midiendo heces normales con este ELISA y el sistema de toma de muestra.

Tenga en cuenta que pacientes con diarrea reciente presentarán un nivel de calprotectina fecal mucho más elevado. El ingerir alimentos muy aliñados o alcohol también puede causar irritación intestinal resultando en un nivel de calprotectina anormal.

Nota: $\text{Calprotectina ng/ml} \times 0,36 = \text{Calprotectina } \mu\text{g/g}$

$\text{Calprotectina } \mu\text{g/g} \times 2,78 = \text{Calprotectina ng/ml}$

Programe el lector de ELISA seleccionando las concentraciones de los calibradores del ensayo ya sea en "µg/g" o en "ng/ml" ¡para evitar el cálculo manual!

EJEMPLO DE DATOS Y CURVA ESTÁNDAR (alto)

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- Un resultado positivo fuerte de calprotectina fecal puede indicar que el paciente tiene una condición clínica patológica más significativa. Sin embargo un resultado positivo débil de calprotectina fecal no indica que haya una posibilidad menor de inflamación.
- Un nivel normal de calprotectina fecal no descarta la presencia de ninguna enfermedad gastrointestinal, como EII.
- Se recomienda que las muestras que dan resultados mayores que el calibrador más alto, sean repetidas diluidas (p. ej. 1:10 o 1:100 con tampón de extracción).
- El agua desionizada con resinas de poliéster puede inactivar la enzima peroxidasa de rábano picante.

CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la validez de los resultados, cada ensayo debe incluir controles adecuados.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Sensibilidad

La sensibilidad analítica (LLOD) del ELISA para la calprotectina humana determinada por el límite de confianza de 95% en 12 determinaciones en duplicado de calibrador cero, es aproximadamente 2,5 ng/ml. El límite de cuantificación (LLOQ) fue determinado diluyendo los calibradores del ensayo y es alrededor de 5 ng/ml.

Efecto de "gancho" por dosis alta

Se demostró que en este ensayo no hay "gancho" por dosis alta de los niveles de calprotectina de hasta 40,000 ng/ml en el tampón de extracción

Precisión

La precisión intra ensayo fue validada midiendo tres extractos de muestras en un único ensayo con 12 determinaciones repetidas.

Valor Promedio de Calprotectina ($\mu\text{g/g}$)	CV (%)
5,74	2,9
26,59	3,5
54,70	2,5

La precisión entre ensayos fue validada midiendo dos muestras en duplicado en 4 ensayos individuales.

Valor promedio de Calprotectina ($\mu\text{g/g}$)	CV (%)
21,64	8,6
70,31	2,0

La precisión entre muestras se realizó tomando cinco muestras de una defecación única. Estas muestras agrupadas se miden en un ensayo de acuerdo al procedimiento del ensayo. Los resultados de la concentración de la calprotectina en ng/ml indican que la coincidencia es muy satisfactoria en las cinco muestras tomadas de una defecación.

Donante	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	CV%
A	57,0	65,0	59,2	56,2	49,8	9,5
B	60,4	55,3	58,8	71,7	81,1	16,3
C	72,3	69,3	51,5	65,7	65,6	12,3

Linealidad

Una muestra fue diluida con tampón del ensayo y analizada. Los resultados de la concentración de calprotectina en ng/ml son los siguientes:

DILUCION	VALOR OBSERVADO	VALOR ESPERADO	RECUPERACION %
Sin diluir	195,84	-	-
1:2	87,88	97,92	89,7
1:4	46,58	48,96	95,1
1:8	24,53	24,48	100,2
1:16	13,77	12,24	112,5

Recuperación del refuerzo

Tres extractos fecales y tres calibradores del ensayo fueron reforzados juntos en varias combinaciones de volúmenes y luego analizados. Los resultados de las concentraciones de calprotectina en ng/ml son los siguientes:

#	Valor Original	Cantidad refuerzo	Valor observado	Valor esperado	Recuperación %
1	30,0	37,1	61,9	67,1	92,2
2	73,0	12,7	85,7	89,3	104,2
3	217,7	30,3	248,0	256,9	96,5

GARANTÍA

Este producto está garantizado para funcionar como esta descrito en la etiqueta y la literatura cuando se utiliza de acuerdo con todas las instrucciones. DIAsource ImmunoAssays S.A. RECHAZA CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIALIDAD O IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO EN PARTICULAR, y en ningún caso DIAsource ImmunoAssays S.A se hace responsable por daños consecuentes. Reemplazo del producto o reembolso del precio de compra es el único recurso para el comprador. Esta garantía le otorga derechos legales específicos y usted puede tener otros derechos, los cuales pueden variar de un estado a otro.

REFERENCIAS

- Tibble et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut.2000;47:506-513
- Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. Gut. 2005;54:364-8.

Calprotectina ELISA: Protocolo resumido del ensayo

1. 50 μ l de tampón del ensayo por pocillo
2. 50 μ l calibradores, controles y muestras extraídas de pacientes
*Incubar a TA por 60 min
en agitador de placas ELISA
lavar 5 x*
3. 100 μ l Anticuerpo marcado
*Incubar a TA por 45 min
en agitador de placas ELISA
lavar 5 x*
4. 100 μ l TMB Sustrato
*Incubar a TA por 12 min
no mover*
5. Leer absorbancia a 620 nm
Inmediatamente
6. 100 μ l Solución de parada
7. Leer absorbancia a 450/620 nm o 450/650nm