



Instructions for Use

Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA



REF EIA-5415



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	INTRODUCTION.....	2
3	MATERIAL SUPPLIED.....	2
4	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	3
5	STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	3
6	STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	4
7	ASSAY PROCEDURE	5
8	RESULTS.....	6
9	LIMITATIONS.....	6
10	QUALITY CONTROL	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
12	PRECAUTIONS	9
13	TECHNICAL HINTS	9
14	GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE.....	9
1	VERWENDUNGSZWECK.....	10
2	EINLEITUNG.....	10
3	INHALT DER TESTPACKUNG	10
4	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	11
5	LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	11
6	PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG.....	12
7	TESTDURCHFÜHRUNG	13
8	ERGEBNISSE	14
9	EINSCHRÄNKUNGEN.....	14
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	14
11	TESTCHARAKTERISTIKA.....	15
12	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	17
13	TECHNISCHE MERKMALE.....	17
14	ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	17
1	USO INTESO	18
2	INTRODUZIONE.....	18
3	MATERIALE FORNITO.....	18
4	MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO	19
5	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI.....	19
6	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	20
7	PROCEDIMENTO D'ANALISI	21
8	RISULTATI.....	22
9	LIMITI	22
10	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
11	CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO	24
12	PRECAUZIONI.....	25
13	CENNI TECNICI.....	25
14	NOTE GENERALI SUL TEST E SUL SUO PROCEDIMENTO	25
15	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA.....	26
	SYMBOLS USED.....	27

1 INTENDED USE

The assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of calprotectin (MRP (8/14, S100A8/A9) in stool.

For *in vitro* diagnostic use only.

2 INTRODUCTION

Alternative names:

- Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10 (in mouse)
- Calgranulin B: MRP14, S100A9,
- MRP8/14: L1, (p8,14), p34

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

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

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

Indications

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

3 MATERIAL SUPPLIED

Content	Kit Components	Quantity
PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
WASHBUF	Wash buffer concentrate 10x	2 x 100 mL
CONJ	Conjugate, ready to use, peroxidase-labelled	1 x 15 mL
STD	Standards, ready to use (0; 13; 52; 210; 840 ng/mL)	1 x 5 vials
CTRL 1	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 1 vial
CTRL 2	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 1 vial
SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 mL
SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 mL
STOP	Stop solution, ready to use	1 x 15 mL
IDK Extract[®]	Extraction buffer concentrate 2,5x	1 x 100 mL

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Stool sample application system such as Cat. No.: EIA-5674
- Calibrated precision pipettors and 10 - 1000 µL tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* DRG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

5 STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:**
The **wash buffer concentrate** (WASHBUF) has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 mL WASHBUF + 900 mL ultra pure water.), mix well.
Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C.
The **WASHBUF** is stable at **2 °C - 8 °C** until the expiry date stated on the label.
Wash buffer (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2 °C - 8 °C for 1 month.**
- **Preparation of the extraction buffer:**
The **extraction buffer concentrate** **IDK Extract®** has to be diluted with ultra pure water. **1:2.5** before use (100 mL IDK Extract® + 150 mL ultra pure water), mix well.
Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37 °C in a water bath.
The **IDK Extract®** is stable at **2 °C - 8 °C** until the expiry date stated on the label.
Extraction buffer (1:2.5 diluted **IDK Extract®**) can be stored in a closed flask at **2 °C - 8 °C for 4 months.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date given on the label when stored at **2 °C - 8 °C**.

6 STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

6.1 Stability and storage of samples

6.1.1 Raw stool

Calprotectin in stool is described to be stable for at least 3 days at room temperature (Tøn et al. (2000) Clin Chim Acta). Nevertheless, we recommend storing the samples for no more than 48 h at 2 °C - 8 °C and transporting the samples at room temperature for maximum 2 days. Long term storage up to 12 months is recommended at -20 °C. Allow frozen samples to thaw slowly, preferably at 2 °C - 8 °C, and warm the samples to room temperature before analysis. Avoid repeated freezing and thawing of the sample. Freezing can cause neutrophil granulocytes in the stool sample to burst and release calprotectin. Therefore frozen samples can be expected to contain slightly elevated concentrations of calprotectin compared to fresh samples.

Chemical or biological additives in stool sample tubes may interfere with the Calprotectin Stool ELISA (EIA-5415). Therefore **use only** empty tubes or tubes filled with the extraction buffer IDK Extract[®] supplied by DRG.

6.1.2 Stool extracts

Stool extract is stable for nine days at room temperature, 2 °C - 8 °C or -20 °C.

Avoid more than three freeze-thaw cycles.

6.2 Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted IDK Extract[®]) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: EIA-5674)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 mL sample extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 mL
Dilution Factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- Fill the empty sample tube with 1.5 mL extraction buffer** (1:2.5 diluted IDK Extract[®]) before using it with the sample.
Important: Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- Shake the tube well until no stool sample remains in the notches.
Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with sample extraction buffer for ~10 minutes improves the result.
- Allow the sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I 1:100

6.3 Dilution of samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:25 with sample dilution buffer (SAMPLEBUF)**. For example:

40 µL supernatant (dilution I) + 960 µL sample dilution buffer, mix well = 1:25 (dilution II)

This results in a final dilution of 1:2500.

100 µL of dilution II are used in the test.

7 ASSAY PROCEDURE

7.1 Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of calprotectin.

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

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human calprotectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human Calprotectin antibody. During the first incubation step, calprotectin in the samples is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase labelled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody – human calprotectin – peroxidase conjugate.

Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Calprotectin concentration of sample.

A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Calprotectin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

7.2 Test Procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15 °C - 30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips in the closed aluminium packaging at 2 °C - 8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or DRG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1. Add each **100 µL standards/controls/diluted samples** into respective well.
2. Cover the strips and incubate for **30 minutes at room temperature** (15 °C - 30 °C).
3. Discard the contents of each well and wash **5 times** with **250 µL of wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4. Add **100 µL conjugate** (CONJ) into each well.
5. Cover the strips and incubate for **30 minutes at room temperature** (15 °C - 30 °C).
6. Discard the contents of each well and wash **5 times** with **wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7. Add **100 µL substrate** (SUB) into each well.
8. Incubate for **10 - 20 minutes* at room temperature** (15 °C - 30 °C) in the **dark**.
9. Add **100 µL stop solution (STOP)** into each well and mix well.
10. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8 RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4-Parameter-algorithm”.

1. **4-parameter-algorithm**

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. **Point-to-point-calculation**

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

3. **Spline-algorithm**

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the dilution factor of **2500** (dilution I x dilution II) to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9 LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and reassayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter “Performance Characteristics”.

10 QUALITY CONTROL

DRG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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

10.1 Reference range

1 g stool is equivalent to 1 mL

- The median value in healthy adults is about 25 µg/g⁵ (mg/kg).
- Samples with a calprotectin concentration < 50 µg/g are regarded as negative.
- Samples with a calprotectin concentration between 50 µg/g and 100 µg/g are regarded as borderline positive. We recommend repeating the measurement at a later time point in order to confirm the result.
- Samples with a calprotectin concentration > 100 µg/g are regarded as positive.

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

Note:

Many confounding factors can cause increased levels of fecal calprotectin in the absence of IBD or IBD in a quiescent disease phase, e.g. use of NSAIDs (non steroidal anti inflammatory drugs), any intercurrent gastrointestinal infection, and the presence of malignancies. These factors should be considered in the interpretation of the test results and therapy of IBD^{1,10}.

10.2 Reference ranges for fecal calprotectin in children

Hestvik E et al. (2011) BMC Pediatrics 11:9 doi: 10.1186/1471-2431-11-9

Method: 302 apparently healthy children, age 0-12 years, in Kampala, Uganda, were tested for faecal Calprotectin concentration.

Table1:

Faecal calprotectin concentration in apparently healthy children by age. 95% confidence interval (95% CI) is indicated in brackets.

Age	Number (%)	Median faecal calprotectin [$\mu\text{g/g}$] (95% CI)
0 - 3 months	14 (4.6)	345 (195 - 621)
3 - 6 months	13 (4.3)	278 (85 - 988)
6 - 12 months	27 (8.9)	183 (109 - 418)
1 - 4 years	89 (29.5)	75 (53 - 119)
4 - 12 years	159 (52.6)	28 (25 - 35)

Conclusion:

Concentrations of faecal calprotectin among apparently healthy children in Uganda are comparable to those in healthy children living in high-income countries. In healthy infants faecal calprotectin is high; in children older than 4 years faecal calprotectin concentration is low.

Fagerberg UL et al. (2003) J Pediatr Gastroenterol Nutr 37:468-472

Method: 117 healthy children age 4-17 years were tested for faecal Calprotectin concentration.

Table. 2:

Faecal Calprotectin concentration in healthy children by age.

Age	Number	Median faecal Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]
4 - 6 years	27	28.2
7 - 10 years	30	13.5
11 - 14 years	27	9.9
15 - 17 years	33	14.6

Conclusion:

The suggested cut-off level for adults ($< 50 \mu\text{g/g}$) can be used for children aged 4 - 17 years.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Precision and Reproducibility

Intra-Assay (n=20)		
Sample	Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]	CV [%]
1	89.2	5.6
2	229.1	3.2

Inter-Assay (n=12)		
Sample	Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]	CV [%]
1	107.8	4.4
2	476.1	8.9

11.2 Spiking Recovery

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Two samples were spiked with three different calprotectin concentrations and measured using this assay. (n = 2)

Sample	Unspiked sample [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Calprotectin expected [ng/mL]	Calprotectin measured [ng/mL]
1	18	10.5	28.5	29.6
	18	17.5	35.5	35.6
	18	40.5	58.5	59.3
	18	63.3	81.3	83.2
	18	173.2	191.2	188.7
2	20.7	10.5	31.2	33.3
	20.7	17.5	38.2	41.0
	20.7	40.5	61.2	62.7
	20.7	63.3	84.0	90.8

11.3 Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 0.957 ng/mL

Limit of detection, LoD 1.023 ng/mL

Limit of quantitation, LoQ 7.161 ng/mL

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

11.4 Dilution Recovery

Three patient samples were diluted with sample dilution buffer and analyzed. The results are shown below: n=3

Sample	Dilution	Calprotectin expected [µg/g]	Calprotectin measured [µg/g]
A	1:2500		820
	1:5000	410	425
	1:10000	205	192
B	1:2500		1120
	1:5000	560	561
	1:10000	280	266.5
C	1:1250		643.0
	1:2500	321.5	344.0
	1:5000	160.8	157.8
	1:10000	80.4	80.0
	1:20000	40.2	39.7
	1:40000	20.1	17.6
	1:80000	10.0	9.5
	1:160000	5.0	5.0

11.5 Traceability

The standards of the Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA are based on recombinant human calprotectin which has been calibrated against purified MRP8/14 derived from human granulocytes.

11.6 Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to calprotectin. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of these compounds with calprotectin.

Lysozyme	0%
PMN-Elastase	0%
Myeloperoxidase	0%
Lactoferrin	0%

12 PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution consists of diluted sulfuric acid, which is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.

13 TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions as sealed ones.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14 GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. DRG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14, S100A8/A9) in Stuhl.

Nur zur in vitro Diagnostik.

2 EINLEITUNG

Alternative Namen:

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

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

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

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

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

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

Indikationen

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

3 INHALT DER TESTPACKUNG

Inhalt	Kitkomponenten	Menge
PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 mL
CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig, peroxidase markiert	15 mL
STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 13; 52; 210; 840 ng/mL)	1 x 5 Fläschchen
CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 Fläschchen
CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 Fläschchen
SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 mL
SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 mL
STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 mL
IDK Extract[®]	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	1 x 100 mL

4 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. EIA 5674
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µL
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* DRG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

5 LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:**
Der Waschpufferkonzentrat (**WASHBUF**) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 mL WASHBUF + 900 mL Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf.
Der **WASHBUF** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.
Die **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist **1 Monat** bei **2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:**
Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 mit Reinstwasser** verdünnt werden (100 mL IDK Extract® + 150 mL Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf.
Das **IDK Extract®** kann bei **2 °C - 8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.
Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes IDK Extract®) ist **4 Monate** bei **2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und bei **2 °C - 8 °C** gelagert bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6 PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

6.1 Probenstabilität und -lagerung

6.1.1 Rohstuhl

Laut Literatur ist Calprotectin im Stuhl bei Raumtemperatur mindestens 3 Tage stabil (Tøn et al. (2000) Clin Chim Acta). Trotzdem empfehlen wir, die Probe nicht länger als 48 Stunden bei 2 °C - 8 °C zu lagern und maximal 2 Tage bei Raumtemperatur zu transportieren. Bei längeren Aufbewahrungszeiten können die Proben bis zu 12 Monate bei -20 °C gelagert werden. Gefrorene Proben langsam, am besten bei 2 °C - 8 °C, auftauen und vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Während des Einfrierens können in der Probe enthaltene neutrophile Granulozyten platzen und Calprotectin freisetzen. In gefrorenen Proben ist daher im Vergleich zu frischen Proben mit einer leicht erhöhten Calprotectin-Konzentration zu rechnen.

Chemische oder biologische Zusätze in Stuhlprobenröhrchen können zu Interferenzen mit dem Calprotectin ELISA (EIA-5415) führen. Verwenden Sie daher **nur** leere oder mit dem von DRG bereitgestellten Extraktionspuffer befüllte Röhrchen.

6.1.2 Stuhlextrakt

Stuhlextrakt ist bei Raumtemperatur, 2 °C - 8 °C oder -20 °C für neun Tage haltbar.

Die Probe sollte maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

6.2 Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes IDK Extract®) wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. EIA-5674)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 mL Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 mL
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 mL Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes IDK Extract®) **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „Einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I: **1:100**

6.3 Probenverdünnung

Die Suspension aus Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:25 mit Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) weiterverdünnt. Zum Beispiel:

40 µL Überstand (Verdünnung I) + 960 µL Probenverdünnungspuffer, mischen = 1:25 (Verdünnung II)

Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:2500.

100 µL der Verdünnung II werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7 TESTDURCHFÜHRUNG

7.1 Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin.

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

Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Calprotectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Calprotectin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (peroxidasemarkiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Calprotectin – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

7.2 Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder DRG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µL Standards/Kontrollen/verdünnte Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen abdecken und **30 min** bei **Raumtemperatur** (15 °C - 30 °C) inkubieren.
3. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µL Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4. **100 µL Konjugat** (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
5. Streifen abdecken und **30 min** bei **Raumtemperatur** (15 °C - 30 °C) inkubieren.
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µL Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7. **100 µL Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
8. **10 - 20 min*** bei **Raumtemperatur** (15 °C - 30 °C) im **Dunkeln** inkubieren.
9. **100 µL Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
10. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

8 ERGEBNISSE

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

1. **4-Parameter-Funktion**

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

2. **Punkt-zu-Punkt-Auswertung**

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

3. **Gewichtete Spline-Funktion**

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

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

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 2 500** multipliziert (Verdünnung I × Verdünnung II), um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9 EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10 QUALITÄTSKONTROLLE

DRG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

10.1 Referenzwerte

1 g Stuhl entspricht 1 mL

- Der Medianwert von augenscheinlich gesunden Personen beträgt ca. 25 µg/g⁵ (mg/kg).
- Proben mit einer Calprotectinkonzentration < 50 µg/g werden als negativ betrachtet.
- Proben mit einer Calprotectinkonzentration zwischen 50 µg/g und 100 µg/g werden als grenzwertig positiv betrachtet. Wir empfehlen, zur Bestätigung des Ergebnisses die Messung zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen.
- Proben mit einer Calprotectinkonzentration > 100 µg/g werden als positiv betrachtet.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Achtung:

Zahlreiche Störfaktoren können erhöhte Werte des fäkalen Calprotectins in Abwesenheit von CED oder während einer Ruhephase der Erkrankung verursachen, z.B. Einnahme von NSAID (nicht-steroidale Entzündungshemmer), zwischenzeitlich auftretende gastrointestinale Infektionen oder bösartige Tumore.

Diese Faktoren müssen bei der Interpretation der Testergebnisse und der CED-Therapie berücksichtigt werden.^{1,10}

10.2 Referenzwerte für fäkales Calprotectin bei Kindern

Hestvik E et al. (2011) BMC Pediatrics 11:9 doi:10.1186/1471-2431-11-9

Methode: Bestimmung der Konzentration von fäkalem Calprotectin bei 302 augenscheinlich gesunden Kindern im Alter 0-12 Jahren in Kampala, Uganda.

Tab. 1:

Konzentrationen von fäkalem Calprotectin bei augenscheinlich gesunden Kindern nach Alter. In Klammern ist der 95%-Konfidenzintervall (95%-CI) angegeben.

Alter	Anzahl (%)	Calprotectin-Median [$\mu\text{g/g}$] (95 % CI)
0 - 3 Monate	14 (4,6)	345 (195-621)
3 - 6 Monate	13 (4,3)	278 (85-988)
6 - 12 Monate	27 (8,9)	183 (109-418)
1 - 4 Jahre	89 (29,5)	75 (53-119)
4 - 12 Jahre	159 (52,6)	28 (25-35)

Fazit:

Die Konzentrationen von fäkalem Calprotectin bei augenscheinlich gesunden Kindern in Uganda sind vergleichbar mit den Werten für gesunde Kinder in Ländern mit hohem Einkommen. Die Konzentration von fäkalem Calprotectin bei gesunden Kleinkindern ist hoch, bei Kindern älter als 4 Jahre niedrig.

Fagerberg UL et al. (2003) J Pediatr Gastroenterol Nutr 37:468-472

Methode: Bestimmung der Konzentration von fäkalem Calprotectin bei 117 gesunden Kindern im Alter 4 - 17 Jahren.

Tab. 2:

Konzentrationen von fäkalem Calprotectin bei gesunden Kindern nach Alter.

Alter	Zahl	Median von fäkalem Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]
4 - 6 Jahre	27	28,2
7 - 10 Jahre	30	13,5
11 - 14 Jahre	27	9,9
15 - 17 Jahre	33	14,6

Fazit:

Der vorgeschlagene Cut-off-Wert für Erwachsene ($< 50 \mu\text{g/g}$) kann für Kinder im Alter 4-17 Jahren verwendet werden.

11 TESTCHARAKTERISTIKA**11.1 Präzision und Reproduzierbarkeit**

Intra-Assay (n=20)		
Probe	Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]	VK [%]
1	89,2	5,6
2	229,1	3,2

Inter-Assay (n=12)		
Probe	Calprotectin [$\mu\text{g/g}$]	VK [%]
1	107,8	4,4
2	476,1	8,9

11.2 Spike-Wiederfindung

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Calprotectin Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe	Probe ungespiked [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Calprotectin erwartet [ng/mL]	Calprotectin gemessen [ng/mL]
1	18	10,5	28,5	29,6
	18	17,5	35,5	35,6
	18	40,5	58,5	59,3
	18	63,3	81,3	83,2
	18	173,2	191,2	188,7
2	20,7	10,5	31,2	33,3
	20,7	17,5	38,2	41,0
	20,7	40,5	61,2	62,7
	20,7	63,3	84,0	90,8

11.3 Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,957 ng/mL

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 1,023 ng/mL

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 7,161 ng/mL

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

11.4 Wiederfindung in der Verdünnung

Drei Patientenproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. n=3

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/g]	Gemessen [µg/g]
A	1:2500		820
	1:5000	410	425
	1:10000	205	192
B	1:2500		1120
	1:5000	560	561
	1:10000	280	266,5
C	1:1250		643,0
	1:2500	321,5	344,0
	1:5000	160,8	157,8
	1:10000	80,4	80,0
	1:20000	40,2	39,7
	1:40000	20,1	17,6
	1:80000	10,0	9,5
	1:160000	5,0	5,0

11.5 Rückführbarkeit

Die Standards des Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA basieren auf rekombinantem humanem Calprotectin, das gegen aufgereinigtes MRP8/14 aus humanen Granulozyten kalibriert wurde.

11.6 Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Calprotectin-Reaktivität:

Lysozym	0%
PMN-Elastase	0%
Myeloperoxidase	0%
Laktoferrin	0%

12 VORSICHTSMASSNAHMEN

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

13 TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14 ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma DRG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

1 USO INTESO

Il test kit Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA è inteso per la determinazione quantitative della calprotettina (MRP 8/14) nelle feci.

Questo test è unicamente per la diagnosi *in vitro*.

2 INTRODUZIONE

Nomi alternativi:

Calgranulina A: MRP8, S100A8, CP-10 (nel topo)

Calgranulina B: MRP14, S100A9,

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

Calprotettina è una proteina legante il calcio secreta prevalentemente dalle cellule neutrofili e dai monociti. La calprotettina fecale è un marker per malattie neoplastiche ed infiammatorie gastrointestinali.

Spesso è difficile distinguere tra la sindrome di irritazione intestinale e la malattia cronica d'infiammazione intestinale. Questo fatto porta in molti casi ad esami colonoscopici non necessari. Il test della calprotettina permette una chiara differenziazione tra i due gruppi di pazienti. I livelli di calprotettina fecale correlano significativamente con accertamenti istologici ed endoscopici di malattie come *Morbus Crohn* e la colite ulcerosa, ma anche con l'escrezione fecale di granulociti neutrofili marcati con indium-111, che è stato suggerito come lo "standard d'oro" dell'attività di malattia d'infiammazione intestinali. Comunque, la misura dei granulociti marcati con indium-111 è assai costosa (ospitalizzazione dei pazienti, analisi ed eliminazione di materiale isotopico) ed è connesso con l'esposizione radioattiva dei pazienti. Per questi motivi, una ripetuta applicazione per bambini e donne in cinta non è raccomandabile.

Livelli elevati di calprotettina sono un predittore molto migliore della ricaduta in confronto con altri marker standard dell'infiammazione (CRP, ESR HB). Comparando questo marker con il metodo di analisi del sangue occulto nelle feci in casi di cancro colonrettale, si dimostra chiaramente il vantaggio diagnostico del test della calprotettina fecale. Il parametro è di alto valore diagnostico: se il livello di calprotettina nelle feci è basso, la probabilità è alta che non esiste alcuna malattia intestinale organica.

Indicazioni

- Marker per l'infiammazione acuta
- Stima dell'entità della infiammazione gastrointestinale
- Parametro per il monitoring della malattia *Morbus Crohn*, della colite ulcerosa o dello stato di un paziente dopo la rimozione di polipi.
- Discriminazione tra pazienti con una malattia di infiammazione acuta (*Morbus Crohn* e colite ulcerosa) e una sindrome di intestino irritabile quando il sistema di test fecale è usato.

3 MATERIALE FORNITO

Contenuto	Componente del kit	Quantità
PLATE	Un sostegno con strisce ricoperte	12 x 8 pozzetti
WASHBUF	Tampone di lavaggio, concentrato 10x	2 x 100 mL
CONJ	Conjugato, tracciante enzimatico, pronto all'uso	15 mL
STD	Standards di calprotettina, pronto all'uso (0; 13; 52; 210; 840 ng/mL)	1 x 5 flaconi
CTRL 1	Controllo, pronto all'uso (vedi la specificazione per il campo)	1 x 1 flacone
CTRL 2	Controllo, pronto all'uso (vedi la specificazione per il campo)	1 x 1 flacone
SAMPLEBUF	Tampone di campioni	1 x 100 mL
SUB	Substrato (benzidine tetrametilico), pronto all'uso	1 x 15 mL
STOP	Soluzione d'arresto, pronto all'uso	1 x 15 mL
IDK Extract®	Tampone d'estrazione concentrato 2,5x	1 x 100 mL

4 MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Acqua ultra pura*
- Sistema di applicazione di campioni fecali (SAS) , p.es. Cat. No.: EIA 5674
- Pipette di precisione calibrate e punte monouso capaci da 10 - 1000 µL
- Foglio per coprire la piastra microtiter
- Una pipette multicanale o a ripetizione
- Vortex-Mixer
- Recipienti da laboratorio standard di vetro o plastica come flaconi, tubetti, ecc.
- Spettrofotometro per piastre

* DRG raccomanda l'uso di acqua ultra pura (Water Type 1; ISO 3696), che è priva di ioni non dissolti e colloidali e molecole organiche (priva di particelle > 0.2 µm) con una conduttività elettrica di 0.055 µS/cm a 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

- Per eseguire il test assay più di una volta, assicurarsi che i reagenti sono conservati alle condizioni indicate sull'etichetta. **Preparare soltanto la quantità necessaria per ogni test.** Il kit può essere usato fino a 4 volte entro la data di scadenza stabilita.
- Il tampone di lavaggio **ELISA WASHBUF** (concentrato) deve essere diluito con acqua pura **1 : 10** prima dell'uso (100 mL WASHBUF + 900 mL acqua ultra pura.), mescolare bene. Possono apparire cristalli dovuti all'alta concentrazione salina nel concentrato. I cristalli devono essere dissolti a 37 °C nel bagnomaria prima della diluizione.
Il **tampone concentrato** è stabile a **2 °C - 8 °C** entro la data stabilita sull'etichetta.
La **soluzione tampone diluita** può essere conservata in flaconi chiusi a **2 °C - 8 °C per 1 mese**.
- Il tampone di estrazione **IDK Extract®** (concentrato) deve essere diluito con acqua ultra pura **1:2,5** prima dell'uso (100 mL **IDK Extract®** + 150 mL acqua ultra pura), mescolare bene. Possono apparire cristalli dovuti all'alta concentrazione salina nel concentrato. I cristalli devono essere dissolti a 37 °C nel bagnomaria prima della diluizione.
Il **tampone concentrato** è stabile a **2 °C - 8 °C** entro la data stabilita sull'etichetta.
La **soluzione tampone diluita** può essere conservata in flaconi chiusi a **2 °C - 8 °C per 4 mesi**.
- Tutti gli altri reagenti sono pronti all'uso. I reagenti sono stabili entro la data stabilita riportata sull'etichetta se conservati a **2 °C - 8 °C**.

6 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

6.1 Stabilità dei campioni e conservazione

6.1.1 Feci puri

Calprotettina nelle feci è descritta di essere stabile per circa 3 giorni. Nonostante raccomandiamo di conservare i campioni per non più di 48 h a 2 °C - 8 °C e trasportare il massimo di 2 giorni a temperatura ambiente.

Una conservazione prolungata (fino a 12 mesi) è possibile a -20 °C. Permettere ai campioni di scongelare lentamente, preferibilmente a 2 °C - 8 °C per una notte e portare i campioni a temperatura ambiente prima dell'analisi.

Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla versione inglese.

Chimici o di additivi biologici in provette campione di feci possono interferire con il test Calprotectin ELISA (EIA-5415). Quindi **utilizzare solo** tubi vuoti o tubi riempiti con il tampone di estrazione fornito da DRG.

6.1.2 Estratti di feci

L'estratto di feci senza sedimento è stabile a temperatura ambiente, 2 °C - 8 °C e -20 °C per 9 giorni.

Evitare più di tre cicli di congelamento-scongelo.

6.2 Estrazione dei campioni fecali

Il **tampone d'estrazione** (IDK Extract® diluito 1:2,5) è usato per l'estrazione dei campioni. Raccomandiamo la seguente preparazione dei campioni:

Sistema di applicazione di campioni fecali (SAS) (Cat. No.: EIA-5674)

Tubetto per campioni fecali – Istruzioni per l'uso

Si prega di notare che il fattore di diluizione finale dei campioni dipende dalla quantità di materiale fecale usato e dal volume di tampone.

SAS con 1,5 mL tampone:

Quantità di materiale fecale:	15 mg
Volume del tampone:	1,5 mL
Fattore di diluizione:	1:100

Si prega di seguire le istruzioni per la preparazione dei campioni fecali usando il SAS come segue:

- Il campione grezzo deve essere scongelato.
In caso di campioni grossolanamente inhomogenei si raccomanda una omogenizzazione meccanica usando un applicatore, un'ansa di inoculazione o un dispositivo simile.
- Riempire il tubetto di campione vuoto con 1,5 mL del tampone di estrazione** (IDK Extract® diluito 1:2,5) prima di usarlo per il campione.
Importante: Permettere al tampone di estrazione di raggiungere temperatura ambiente.
- Aprire il tubetto (tappo giallo). Inserire il bastoncino giallo nel campione. La parte inferiore del bastoncino porta tacche che devono essere completamente coperte con materiale. Rimettere il bastoncino nel tubetto. Rimettendolo, il materiale in eccesso sarà ritenuto dal tappo e i rimanenti 15 mg vengono diluiti. Avvitare per chiudere il tubetto.
- Agitare il tubetto bene finché nessun materiale rimane tra le tacche.
Importante: assicurarsi che si ottenga un massimo di omogeneità dopo l'agitazione. Soprattutto nei casi con molto materiale solido si raccomanda di lasciare dissolvere il campione nei tubetti per circa 10 minuti.
- Permettere ai campioni di riposare per circa 10 minuti fino a che il sedimento sia depositato. Materiale fluttuante come gusci di grano può essere trascurato.
- Svitare cautamente il tappo completo incluso l'anello blu assieme al bastoncino. Scartare il tappo e il bastoncino. Assicurarsi che il sedimento non si disperde nuovamente.

Diluizione I 1:100

6.3 Diluizione dei campioni

La sospensione del procedimento di preparazione (diluizione I) viene ulteriormente diluito **1:25 con il SAMPLEBUF**. Per esempio:

40 µL surnatante (diluizione I) + 960 µL SAMPLEBUF, mescolare bene = 1:25 (diluizione II)

Ciò corrisponde ad una diluizione di 1:2500 totale.

Per l'analisi, pipettare **100 µL** del surnatante della **diluizione II** in ogni pozzetto.

7 PROCEDIMENTO D'ANALISI

7.1 Principio del test

Il test utilizza la tecnica "sandwich" con due anticorpi monoclonali selettati che legano la calprotettina umana.

Gli standard, i controlli e i campioni diluiti dei pazienti da analizzare sono aggiunti a pozzetti di una micropiastra ricoperti con un anticorpo anti-calprotettina umana monoclonale altamente affine. Durante la prima incubazione, la calprotettina dei campioni è legata dagli anticorpi immobilizzati. Poi si aggiunge un coniugato legato alla perossidasi e il seguente complesso è formato: anticorpo legato – calprotettina umana - coniugato perossidasi. Benzidine tetrametilico (TMB) è usato come substrato per la perossidasi. Finalmente, si aggiunge una soluzione d'arresto acida per terminare la reazione. Il colore vira dal blu al giallo. L'intensità del colore giallo è direttamente proporzionale alla concentrazione di calprotettina nel campione. Una curva dosaggio-risposta delle assorbanze (densità ottiche, OD 450 nm) verso la concentrazione è costruita, usando i valori ottenuti dagli standard. La calprotettina presente nei campioni dei pazienti è direttamente determinata dalla curva standard.

7.2 Procedimento del test

Portare tutti i reagenti e i campioni a temperature ambiente (15 °C - 30 °C) e mescolare bene.

Marcare la posizione di STD /SAMPLE/CTRL (standards/campioni/controlli) su un protocollo.

Prendere il numero di strisce necessarie dal kit. Conservare le strisce non usate coperti a 2 °C - 8 °C. Le strisce sono stabili fino alla data di scadenza indicate sull'etichetta.

Il protocollo dato può richiedere modifiche per processori automatici ELISA, secondo le specifiche dei rispettivi strumenti automatici. Per ulteriori dettagli si prega di contattare il vostro fornitore o DRG.

Si consiglia di eseguire la misurazione dei campioni in duplicato.

1. Aggiungere **100 µL di STD/CTRL/SAMPLE** nei rispettivi pozzetti.
2. Coprite la piastra accuratamente e **incubare per 30 minuti a temperature ambiente (15 °C - 30 °C)**.
3. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare i pozzetti **5 volte con 250 µL di tampone di lavaggio**. Dopo l'ultimo lavaggio, invertire i pozzetti e premerli su carta assorbente.
4. Aggiungere **100 µL CONJ** (coniugato) in ogni pozzetto.
5. Coprite la piastra accuratamente e **incubare per 30 minuti a temperature ambiente (15 °C - 30 °C)**.
6. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare i pozzetti **5 volte con 250 µL di tampone di lavaggio**. Dopo l'ultimo lavaggio, invertire i pozzetti e premerli su carta assorbente.
7. Aggiungere **100 µL di SUB** (substrato) in ogni pozzetto.
8. Incubare per **10–20 minuti* a temperature ambiente (15 °C - 30 °C)** al buio.
9. Aggiungere **100 µL di STOP** (soluzione d'arresto) in ogni pozzetto, mescolare accuratamente.
10. Determinare l'assorbanza immediatamente con uno spettrofotometro a 450 nm contro 620 nm (o 690 nm) come riferimento. Se non si dispone della lunghezza d'onda di riferimento, leggere soltanto a 450 nm. Se l'estinzione dello standard più alto eccede il campo dello spettrofotometro, l'assorbanza deve essere letta immediatamente a 405 nm contro 620 nm come riferimento.

* L'intensità del viraggio di colore è sensitiva alla temperature. Raccomandiamo di osservare il viraggio e di fermare la reazione al momento di vedere una buona differenziazione.

8 RISULTATI

I seguenti algoritmi possono essere usati alternativamente per calcolare i risultati. Raccomandiamo di usare l'algoritmo "a quattro parametri".

1. *algoritmo 4-parametri*

Si raccomanda di usare una ordinate lineare per la densità ottica e un'ascissa logaritmica per le concentrazioni. Se si usa una ascissa logaritmica, il calibratore zero deve essere specificato con un valore inferiore a 1 (p.es. 0.001).

2. *Calcolo punto-a-punto*

Raccomandiamo una ordinate lineare per la densità ottica e una abscissa lineare per le concentrazioni.

3. *algoritmo spline*

Raccomandiamo una ordinate lineare per la densità ottica e una abscissa lineare per le concentrazioni.

La plausibilità di coppie di valori deve essere esaminata prima della valutazione automatica dei risultati. Se con i programmi a disposizione questo non è possibile, il controllo delle coppie di valori deve essere eseguito manualmente.

Campioni fecali

Per ottenere la concentrazione di calprotettina nei campioni fecali, moltiplicare i risultati ottenuti per **2500** (diluizione I x diluizione II).

Nel caso un **altro fattore di diluizione** viene utilizzato, moltiplicare il risultato finale per il fattore usato.

9 LIMITI

I campioni con concentrazioni superiori al range di misura (*vedi definizione nelle istruzioni inglesi*) devono essere ulteriormente diluiti e ritestati. Regolare il calcolo di diluizione per questo fattore di diluizione.

I campioni con concentrazioni inferiori al range di misura (*vedi definizione nelle istruzioni inglesi*), non possono essere chiaramente quantificati.

10 CONTROLLO QUALITÀ

DRG raccomanda, possibilmente, l'uso di controlli esterni per un controllo qualità interno.

I controlli devono essere inseriti in ogni determinazione. I risultati, generate da questi controlli, devono essere valutati per l'accettabilità con metodi statistici. I risultati per i campioni dei pazienti possono essere invalidi se entro lo stesso test uno o più valori dei controllo qualità stanno al di fuori dei limiti accettati.

10.1 Campo normale

1 g feci equivale a 1 mL

- Il valore mediano in adulti sani è circa 25 µg/g.⁵ (mg/kg).
- I valori di Calprotectina <50 µg/g indicano un risultato negativo.
- I valori di Calprotectina compresi tra i 50 e i 100 µg/g indicano un debole positivo. Si suggerisce di ripetere la misurazione e di effettuare ulteriori investigazioni.
- I valori di Calprotectina >100 µg/g indicano un risultato positivo.

Raccomandiamo che ciascun laboratorio stabilisca i propri campi normali di concentrazione.

Nota:

Alcuni fattori contraddittori possono causare un incremento della calprotetina fecale in assenza di IBD o IBD in una fase quiescente della malattia, p.es. in caso di utilizzo di NSAIDs (farmaci antiinfiammatori non-steroidali), in caso di infezioni gastrointestinali intercorrenti e nella presenza di malignità. Questi fattori devono essere considerati nella interpretazione dei risultati del test e nella terapia di IBD^{1,10}.

10.2 I campi di riferimento per calprotetina fecale per bambini:

Hestvik E et al. (2011) BMC Pediatrics 11:9 doi: 10.1186/1471-2431-11-9

Method: 302 apparently healthy children, age 0-12 years, in Kampala, Uganda, were tested for faecal Calprotectin concentration.

Tabella 1:

Concentrazioni di calprotetina fecale in bambini apparentemente sani ordinate per età.

Eta'	Numero (%)	Medi di calprotetina fecale [µg/g]
0 - 3 mesi	14 (4.6)	345 (195-621)
3 - 6 mesi	13 (4.3)	278 (85-988)
6 - 12 mesi	27 (8.9)	183 (109-418)
1 - 4 anni	89 (29.5)	75 (53-119)
4 - 12 anni	159 (52.6)	28 (25-35)

Conclusione:

Le concentrazioni di calprotetina fecale tra bambini sani in Uganda sono comparabili con quelle di bambini sani nei paesi industrializzati. In bambini sani i livelli di calprotetina fecale sono alti; in bambini superiori a 4 anni la concentrazione di calprotetina fecale è bassa.

Fagerberg UL et al. (2003) J Pediatr Gastroenterol Nutr 37:468-472

Method: 117 healthy children age 4-17 years were tested for faecal Calprotectin concentration.

Tabella 1:

Concentrazioni di calprotetina fecale in bambini sani ordinate per età.

Età	Numero (%)	Medi di calprotetina fecale [µg/g]
4 -6 anni	27	28.2
7 – 10 anni	30	13.5
11 – 14 anni	27	9.9
15 – 17 anni	33	14.6

Conclusione:

Il livello di cut-off proposto per adulti (< 50 µg/g) può essere usato per bambini dell'età tra 4 e 17 anni.

11 CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

11.1 Precisione e riproducibilità

Intra-Assay (n=20)		
Campione	Calprotettina [µg/g]	CV [%]
1	89,2	5,6
2	229,1	3,2

Inter-Assay (n=12)		
Campione	Calprotettina [µg/g]	CV [%]
1	107,8	4,4
2	476,1	8,9

11.2 Ritrovabilità

A due campioni sono stati aggiunti differenti standard di calprotettina e i risultati sono ottenuti con questo test. n=2

Campione	Campione [ng/mL]	aggiunta [ng/mL]	Calprotettina attesa [ng/mL]	Calprotettina misurata [ng/mL]
1	18	10,5	28,5	29,6
	18	17,5	35,5	35,6
	18	40,5	58,5	59,3
	18	63,3	81,3	83,2
	18	173,2	191,2	188,7
2	20,7	10,5	31,2	33,3
	20,7	17,5	38,2	41,0
	20,7	40,5	61,2	62,7
	20,7	63,3	84,0	90,8

11.3 Sensitività analitica

Limit of blank, LoB 0.957 ng/mL

Limit of detection, LoD 1.023 ng/mL

Limit of quantitation, LoQ 7.161 ng/mL

11.4 Linearità

Tre campioni di pazienti sono stati diluiti con SAMPLEBUF e analizzati. I risultati sono riportati sotto: n=3

Campione	Diluizione	aspettato [µg/g]	misurato [µg/g]
A	1:2500		820
	1:5000	410	425
	1:10000	205	192
B	1:2500		1120
	1:5000	560	561
	1:10000	280	266,5
C	1:1250		643,0
	1:2500	321,5	344,0
	1:5000	160,8	157,8
	1:10000	80,4	80,0
	1:20000	40,2	39,7
	1:40000	20,1	17,6
	1:80000	10,0	9,5
	1:160000	5,0	5,0

11.5 Tracciabilità

Gli standards del saggio Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1 h) ELISA sono basati su calprottetina umana ricombinante che è stata calibrata contro MRP8/14 purificata proveniente da granulociti umani.

11.6 Reattività ad incrocio

Nessuna reattività ad incrocio è stata osservata rispetto alle seguenti proteine plasmatiche:

Lisozima - 0%

PMN-Elastasi - 0%

Myeloperossidasi - 0%

Lactoferrina - 0%

12 PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti contenuti nel kit sono per la diagnosi in vitro soltanto.
- Il materiale umano usato in questo test è stato testato e trovato negativo per HIV, epatite B ed epatite C. Nonostante, tutti i componenti del kit devono essere trattati come potenzialmente infettivi per motivi di sicurezza.
- I reagenti del kit contengono azide di sodio o ProClin come battericidi. L'azide di sodio e il ProClin sono tossici. I substrati per la reazione enzimatica sono tossici e carcinogenici. Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.
- La soluzione d'arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico, un acido forte. Anche se diluito si raccomanda di lavorare con cautela. L'acido può causare bruciature e deve essere adoperato portando guanti, occhiali e abiti protettivi. Ogni spruzzo deve essere diluito e lavato con abbondante acqua. Non respirare il vapore ed evitare l'inalazione.

13 CENNI TECNICI

- Non interscambiare alcun componente proveniente da un kit con diverso numero di lotto all'interno della stessa analisi. Inoltre, per l'analisi non assemblare i pozzetti di micropiastre diverse, neanche se le micropiastre presentano lo stesso lotto, dato che i pozzetti di micropiastre già aperti sono esposti a condizioni diverse rispetto a quelli non aperti.
- I controlli devono essere inseriti in ogni determinazione.
- I reagenti non devono essere usati dopo la data di scadenza indicate sull'etichetta.
- La soluzione di substrato deve rimanere incolore fino all'uso.
- Per accertare i risultati è necessario che la piastra sia coperta durante i passaggi d'incubazione.
- Evitare la formazione di schiume quando si mescolano i reagenti.
- Il test deve sempre essere eseguito seguendo il manuale.

14 NOTE GENERALI SUL TEST E SUL SUO PROCEDIMENTO

- Questo test assay è stato prodotto e messo sul mercato in accordo con le IVD linee di guida di 98/79/EC.
- Le regole del controllo qualità devono essere osservate.
- Le linee guide per i laboratori medici devono essere osservate.
- Il tempo di incubazione, la temperatura di incubazione e i volumi pipettati dei componenti sono definiti dal produttore. Ogni variazione del procedimento del test che non è coordinato con il produttore, può influenzare i risultati. DRG non può essere tenuta responsabile per eventuali danni causati da una manutenzione inesatta.

15 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA

1. D'Haens, G. et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 18, 2218–24 (2012).
2. Fagerberg, U. L., Löf, L., Merzoug, R. D., Hansson, L.-O. & Finkel, Y. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 37, 468–72 (2003).
3. Fagerhol, M. K. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 356, 1783–4 (2000).
4. Hestvik, E. et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0–12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. *BMC pediatrics* 11, 9 (2011).
5. Konikoff, M. R. & Denson, L. A. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 12, 524–34 (2006).
6. Poullis, A., Foster, R., Northfield, T. C. & Mendall, M. A. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16, 675–81 (2002).
7. Tibble, J. et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 47, 506–13 (2000).
8. Tibble, J. A., Sigthorsson, G., Bridger, S., Fagerhol, M. K. & Bjarnason, I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 119, 15–22 (2000).
9. Tøn, H. et al. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 292, 41–54 (2000).
10. van Rheenen, P. F., Van de Vijver, E. & Fidler, V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 341, c3369 (2010).

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
LOT	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité