

# BIOHIT

Innovating for Health



## BIOHIT CALPROTECTIN






INSTRUCTIONS FOR USE  
KÄYTTÖOHJE  
ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER  
MANUEL D'INSTRUCTION  
INSTRUCCIONES DE USO  
INSTRUÇÕES DE USO

**REF** 602260 **IVD** **CE**

For *in vitro* diagnostic use  
Store at 2-8 °C Upon Receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland  
Tel. +358 9 773 861, [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi), [www.biohithealthcare.com](http://www.biohithealthcare.com)

**SYMBOLS/SYMBOLIT/SYMBOLER/SYMBOLER/SÍMBOLOS/SIMBOLOS/**

	English	Suomi	Svenska
<b>IVD</b>	For <i>in vitro</i> diagnostic use	<i>In vitro</i> diagnostiseen käyttöön	<i>För in vitro -diagnostiskt bruk</i>
<b>LOT</b>	Batch code	Eränumero	Batchkod
	Use by	Eräntymis-päivämäärä	Används före
	Storage limitation Store at +2...+8°C	Lämpötilarajotteet Säilytys +2...+8 °C	Förvaringsbegrän-sning Förvaras vid 2 – 8 °C
<b>CE</b>	CE Mark	CE-merkki	CE-märke
<b>REF</b>	Catalogue Number	Kataloginumero	Katalognummer
	96 determinations	96 määrittystä	96 bestämningar
	Do not re-use	Älä käytä uudelleen	Får ej återanvändas
	Consult instructions for use	Lue käyttöohjeet	Se bruksanvisningen
<b>WASH 20x</b>	Washing Buffer Concentrate (20x)	Pesupuskuri konsentraatti (20x)	Tvättbuffertkoncentrat (20x)
<b>DILBUF 5x</b>	Sample Diluent Buffer Concentrate (5x)	Laimennospuskuri konsentraatti (5x)	Provspädningsbuffertkoncentrat (5x)
<b>FEC EXTRBUF 2.5x</b>	Fecal Extraction Buffer (2.5x)	Ulostenäytepuskuri konsentraatti (2.5x)	Fekalextraktionsbuffert (2.5x)
<b>BLANK</b>	Blank	0-näyteliuos	Blank
<b>CAL 1-5</b>	Calibrators 1-5	Kalibraattorit 1-5	Kalibratorer 1-5
<b>CONTROL LOW</b>	Low Control	Matala kontrolli	Låg kontroll
<b>CONTROL HIGH</b>	High Control	Korkea kontrolli	Hög kontroll
<b>CONJ</b>	Conjugate	Konjugaattiliuos	Konjugat
<b>SUBS</b>	Substrate	Substraattiliuos	Substrat

	<b>Français</b>	<b>Español</b>	<b>Português</b>
	Utilisation réservée au diagnostic <i>in vitro</i>	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>	Para utilização no diagnóstico <i>in vitro</i>
	Lot	Código de lote	Código de lote
	Utiliser avant	Fecha de caducidad	Não utilizar depois de
	Conserver à une température comprise entre +2 et +8 °C	Limitación de almacenamiento Almacenar a 2-8 °C	Limites de armazenamento Armazenar a +2...+8 °C
	Marquage CE	Marca CE	Marca CE
	Numéro de référence	Número de catálogo	Número de catálogo
	96 déterminations	96 determinaciones	96 determinações
	Ne pas réutiliser	No reutilizar	Não reutilizar
	Consulter le mode d'emploi	Consultar las instrucciones de uso	Consultar as instruções de utilização
	Tampon de lavage concentré (20x)	Concentrado de amortiguador para lavado (20x)	Tampão de lavagem concentrado (20x)
	Tampon de dilution d'échantillon concentré (5x)	Concentrado de amortiguador para dilución de muestras (5x)	Tampão de diluição da amostra concentrado (5x)
	Tampon d'extraction de selles (2.5 x)	Amortiguador para extracción fecal (2.5x)	Tampão de extração de fezes (2.5x)
	Témoin	Blanco	Solução em branco
	Calibrateurs 1-5	Calibradores 1-5	Calibradores 1 a 5
	Contrôle faible	Control bajo	Controlo baixo
	Contrôle fort	Control alto	Controlo alto
	Conjugué	Conjugado	Conjugado
	Substrat	Sustrato	Sustrato

INSTRUCTIONS FOR USE .....	5
KÄYTTÖOHJE .....	22
INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE ....	40
MANUEL D'INSTRUCTION .....	57
INSTRUCCIONES DE USO.....	76
INSTRUÇÕES DE USO .....	95
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÈRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS .....	114
ORDERING INFORMATION.....	116

**INSTRUCTIONS FOR USE**

**BIOHIT Calprotectin**

**REF 602260**

<b>1. INTENDED USE</b> .....	<b>6</b>
<b>2. BACKGROUND</b> .....	<b>6</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b> .....	<b>7</b>
<b>4. MATERIALS</b> .....	<b>7</b>
4.1. Reagents supplied with the kit .....	7
4.2. Materials supplied with the kit .....	9
4.3. Materials required but not supplied .....	9
<b>5. STABILITY AND STORAGE</b> .....	<b>9</b>
<b>6. REAGENT PREPARATION</b> .....	<b>10</b>
6.1. Coated microtiter plate strips .....	10
6.2. Sample Dilution Buffer .....	10
6.3. Washing Buffer.....	10
6.4. Fecal Extraction Buffer.....	10
6.5. Calibrators, blank and controls.....	10
6.6. Conjugate Solution.....	10
6.7. Substrate Solution .....	11
<b>7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION</b> .....	<b>11</b>
7.1. Fecal samples .....	11
7.1.1. Extraction using the BIOHIT Extraction tubes .....	12
7.1.2. Extraction using the weighing method (without extraction device) .....	12
<b>8. SUGGESTED PLATE LAYOUT</b> .....	<b>13</b>
<b>9. TEST PROCEDURE</b> .....	<b>13</b>
9.1 Procedural Notes .....	13
9.2 ELISA Procedure.....	14
<b>10. RESULTS</b> .....	<b>15</b>
10.1 Quality Control Values.....	15
10.2 Calculation of the results .....	15
10.3 Interpretation of the results .....	16
<b>11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE</b> .....	<b>17</b>
<b>12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b> .....	<b>17</b>
<b>13. WARNINGS AND PRECAUTIONS</b> .....	<b>18</b>
13.1 Disposal Considerations .....	19
<b>14. WARRANTY</b> .....	<b>20</b>
<b>15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE</b> .....	<b>21</b>
<b>DATE OF ISSUE</b> .....	<b>114</b>
<b>REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÈRENCES /</b> <b>REFERENCIAS / REFERÈNCIAS</b> .....	<b>114</b>
<b>ORDERING INFORMATION</b> .....	<b>116</b>

## 1. INTENDED USE

BIOHIT Calprotectin test is a quantitative *in vitro* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) aiding in diagnosis of organic disease of the small or large intestine or the stomach such as inflammatory bowel disease, ulcerative colitis or Crohn's disease by detecting calprotectin in stool samples. In addition, the test is used to monitor the disease activity and the response to treatment in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. The test can be conducted either manually or automatically and is intended to be used by healthcare professionals only.

## 2. BACKGROUND

Calprotectin is a 36 kilodalton calcium and zinc-binding protein<sup>1)</sup> released specially from leukocytes, in particular polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMN), to the gut lumen during intestinal mucosal inflammation. Micro-organisms of the bowel stimulate leukocytes to migrate into the gut lumen where they release their contents including antimicrobial substances like Calprotectin. This protein constitutes about 60% of total proteins in the cytoplasm of PMNs<sup>2)</sup> and can be reliably estimated in fecal samples stored for up to seven days at ambient temperature<sup>3)</sup>.

Different types of disease, for instance bacterial infections, rheumatoid arthritis and cancer, lead to activation of PMNs and increased levels of Calprotectin in plasma, cerebrospinal fluid, synovial fluid, crevicular fluid, urine or other human materials<sup>4)</sup>.

The concentration of Calprotectin in feces is correlated with the number of PMNs migrating into the gut lumen<sup>5)</sup>, and can be detected reliably even in small (less than one gram) random stool samples<sup>3,6)</sup>. Organic diseases of the bowel give a strong Calprotectin signal, i.e. elevations are regularly five to several thousand times the upper reference in healthy individuals<sup>3,7-9)</sup>, indicating intestinal inflammation. Inflammatory bowel diseases (IBD), i.e. ulcerative colitis and Crohn's disease, may appear from early childhood to late adulthood and the diagnosis is often delayed due to vague symptoms or reluctance to perform endoscopy and biopsy.

Functional disorders like irritable bowel syndrome (IBS) do not cause increased fecal Calprotectin concentrations, but organic abdominal disorders like IBD do. Patients with organic and functional abdominal disorders may have similar symptoms, and clinical examination alone may not be sufficient to give a specific diagnosis. A test for fecal Calprotectin is a simple, non-invasive, inexpensive and objective method that can help

selecting patients for additional examination like endoscopy. Abdominal symptoms are very common both in children and adults and a negative result as measured by BIOHIT Calprotectin can with high probability rule out inflammatory bowel disorders <sup>7)</sup>.

Mucosal healing is the optimal goal for IBD treatment, and a test for fecal Calprotectin shows when this has been achieved. Many IBD patients in clinical remission with normal C-reactive protein (CRP) levels still have on-going inflammation <sup>10)</sup>, reflected by increased fecal Calprotectin. Such patients have increased risk of relapse within a few months <sup>11)</sup>. If mucosal healing can be achieved, the risk of relapse and need for major abdominal surgery will be reduced <sup>12,13)</sup>. Normalisation of Calprotectin levels means that mucosal healing has been achieved <sup>14)</sup>.

### **3. PRINCIPLE OF THE TEST**

BIOHIT Calprotectin is based upon preparation of an extract of feces using Fecal Extraction Buffer. The level of Calprotectin is determined by testing the extract in an enzyme-linked immunoassay (ELISA) specific for Calprotectin.

In the ELISA, samples and calibrators are incubated in separate microtiter wells coated with monoclonal antibodies which bind the Calprotectin. After incubation and washing of the wells, bound Calprotectin is allowed to react with enzyme-labelled, immunoaffinity-purified Calprotectin-specific antibodies. After this reaction, the amount of enzyme bound in the microtiter wells is proportional to the amount of Calprotectin in the sample or calibrator, which is determined by incubation with a substrate for the enzyme giving a colored product. The color intensity is determined by absorbance using an ELISA plate reader and is proportional with the concentration of Calprotectin in the calibrators and samples. The assay is calibrated using Calprotectin purified from leukocyte extract.

### **4. MATERIALS**

#### **4.1. Reagents supplied with the kit**

**Coated Microtiterplate:** 12 strips, 8 wells per strip, coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. The plate is stored in a sealed bag with desiccant. Do not combine strips/wells from different microplates, even if they would have the same lot number.

**DILBUF 5x** **Sample Dilution Buffer (5x conc.)** \*\*\*: 1 x 20 mL, 5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, yellow colored solution, bottle with blue cap.

**WASH 20x** **Washing Buffer (20x conc.)** \*: 1 x 50 mL, 20x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water, for washing the microtiter wells; pH 7,8 ± 0.2, clear solution, bottle with white cap.

**FEC EXTRBUF 2.5X** **Fecal Extraction Buffer (2.5x conc.)** \*\*: 2 x 90 mL, 2.5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, clear solution, bottles with white caps.

**CAL 1-5** **Calprotectin Calibrators and** **BLANK** \*\*\*: 6 vials with 1.0 mL, ready to use; yellow colored solution, vials with different colored caps:

Blank: Blue cap	0	ng/mL
Calibrator 1: Green cap	7.8	ng/mL
Calibrator 2: Yellow cap	31.3	ng/mL
Calibrator 3: Red cap	62.5	ng/mL
Calibrator 4: White cap	125	ng/mL
Calibrator 5: Black cap	500	ng/mL

**CONTROL LOW** **CONTROL HIGH** **Controls "Low" and "High"** \*\*\*: 2 vials one tube each with 1.0 mL, ready to use, yellow colored solution; Ctr Low: vial with brown cap; Ctr High: vial with purple cap.

**CONJ** **Conjugate Solution** \*\*\*\*: 13 mL alkaline phosphatase-labelled, immunoaffinity-purified polyclonal rabbit antibodies against Calprotectin, ready to use; red colored solution, 25 mL Dynex reagent tube with white cap.

**SUBS** **Substrate Solution (pNPP)**: 13 mL, ready to use; clear to faint yellow solution, opaque bottle with yellow cap.

**Note:** If using a Dynex instrument, the substrate has to be transferred into a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

\* Contains 0.1 % Kathon

\*\* Contains <0.1% sodium azide

\*\*\* Contains 0.1 % Kathon and <0.1% sodium azide

\*\*\*\* Contains 0.02% methylisothiazolone and 0.02% bromonitrodioxane



#### **4.2. Materials supplied with the kit**

- 2 Incubation covers
- 1 Instructions for use
- 1 Plate layout

#### **4.3. Materials required but not supplied**

- Distilled/deionised water
- Extraction devices (see section 7.1.1 and 7.1.2)
- Disposable, breakable inoculation loops (if using weighing method in section 7.1.2)
- Sensitive digital scale (40 – 150 mg) (if using weighing method in section 7.1.2)
- Disposable polystyrene screw cap tubes, 5 mL (if using weighing method in section 7.1.2)
- Vortex mixer (with a tube adapter) or shaker up to 1000 rpm when used to extract a stool sample in section 7.1.2
- Disposable tubes for dilution of samples: Eppendorf tubes or similar (if assay is performed manually)
- Pipettes to deliver volumes 10 – 1000  $\mu\text{L}$  (if assay is performed manually)
- Repetitive pipette or multi-channel pipette, 100  $\mu\text{L}$  (if assay is performed manually)
- Microplate well washer or multi-channel pipette, 300  $\mu\text{L}$  (if assay is performed manually)
- Plate shaker (500 – 700 rpm) (if assay is performed manually)
- Timer (if assay is performed manually)
- Microplate reader, filter 405 nm (if assay is performed manually)
- 1M NaOH (stop solution; optional)

#### **5. STABILITY AND STORAGE**

When stored unopened at 2 – 8°C, kit reagents are stable up to the expiry date stated on the label.

Opened plates, reagents and concentrated buffers are stable for up to three months when stored at 2 – 8°C.

When prepared in clean vessels, working solutions (1x) of Washing Buffer, Sample Dilution Buffer and Fecal Extraction Buffer can be stored at 2 – 8°C for up to one month.

Avoid exposure to high temperature and direct sunlight.

## **6. REAGENT PREPARATION**

All reagents, samples and controls should be brought to room temperature (18 – 25°C) before starting the test run.

### **6.1. Coated microtiter plate strips**

The ready-to-use plate strips are coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. Unused strips should be removed from the frame and immediately re-sealed in the aluminium foil pouch along with the desiccant supplied. Store at 2 – 8°C.

### **6.2. Sample Dilution Buffer**

Dilute the 5x concentrated Sample Dilution Buffer by adding 1 part (20 mL) to 4 parts (80 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 100 mL. Mix well. Store diluted Sample Dilution Buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

*Note:* If using a Dynex DS2 or DSX ELISA automat, Sample Dilution Buffer must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

### **6.3. Washing Buffer**

Dilute 20x concentrated Washing Buffer by adding 1 part (50 mL) to 19 parts (950 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 1000 mL. Mix well. Store diluted Washing Buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

### **6.4. Fecal Extraction Buffer**

Dilute 2.5x concentrated Fecal Extraction Buffer by adding 1 part (90 mL) to 1.5 parts (135 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 225 mL. Mix well. Store diluted buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

### **6.5. Calibrators, blank and controls**

The vials labelled with blank, calibrator, as well as the controls, contain 1.0 mL each of a ready-to-use solution. The concentration of Calprotectin is printed on the label of each vial. The vials fit directly into Dynex DS2 and DSX ELISA automates.

### **6.6. Conjugate Solution**

The tube contains 13 mL of alkaline phosphatase (AP)-labelled, immu-

noaffinity-purified rabbit antibodies against Calprotectin in a buffer with stabilisers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. The tube fits directly into Dynex DS2 and DSX ELISA automates.

### **6.7. Substrate Solution**

The bottle contains 13 mL of p-nitrophenylphosphate (pNPP) solution. The solution is ready to use and must be stored in its original, opaque bottle.

*Note:* If using a Dynex DS2 or DSX ELISA automat, Enzyme Substrate Solution must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

## **7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**

BIOHIT Calprotectin has been developed and validated for fecal samples.

### **7.1. Fecal samples**

Since Calprotectin is very stable in stools, patients can collect small fecal samples at home. Collect 1 – 5 g (approximately one teaspoonful), place it in a suitable clean container and deliver it to the laboratory as soon as possible but within four days. When put in a container approved for transport, it can be sent by ordinary mail, i.e., no refrigeration is needed. Exposure to temperatures above 30°C should be avoided.

Samples can also be stored frozen, at -20°C or lower for up to 1,5 years, until delivery or mailing. Frozen samples must be thawed and equilibrated to room temperature before extraction and testing. Note that freezing fecal samples can in some cases result in increased Calprotectin levels, most likely due to release from granulocytes.

*Note:* Before commencing extraction, the stool sample should be homogenized well using for example a spatula before the small amount for extraction is taken out.

For extraction, we recommend the use of BIOHIT Extraction tubes, or the other method described below (chapter 7.1.1 and 7.1.2). Perform extraction according to package insert for the chosen extraction device/method. Other methods and devices, validated by the customer, can be used.

### 7.1.1. Extraction using the BIOHIT Extraction tubes

Instructions for use: please read package insert for product Ref. 602270.



### 7.1.2. Extraction using the weighing method (without extraction device)

1. Weigh (tare) an empty screw cap tube with an inoculation loop.
2. Take out approx. 100 mg (between 40 and 120 mg) feces by means of the inoculation loop and place it into the screw cap tube. Avoid taking out solid, undigested material like fibres and seeds.
3. Weigh tube and loop with feces which will give the net feces weight.
4. Break or cut off the top half of the loop handle and leave the bottom part inside the tube.
5. Add extraction buffer to a weight: volume ratio 1:50, for instance 4.9 mL buffer to 100 mg feces. Close the tube.
6. Mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex mixer.
7. Continue the mixing on a shaker (at approx. 1000 rpm) for 30±5 minutes with the loop inside the tube as an agitator.
8. Allow a couple of minutes on the bench for particles to settle and pipette carefully from the top of the tube. No centrifugation is necessary, but a short centrifugation can be performed if a particle-free solution is required.
9. The extract, which represents a 1:50 dilution (weight:volume) of the stool sample, is now ready for dilution and testing.
10. For storage, transfer about 0.5 mL to a new tube. Extracts can be stored at 2 – 8°C for at least five days or frozen below -20°C for up to 12 months.

## 8. SUGGESTED PLATE LAYOUT

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrator 5 500 ng/mL	Calibrator 5 500 ng/mL	Sample 1	Sample 1		
B	Calibrator 4 125 ng/mL	Calibrator 4 125 ng/mL	Sample 2	Sample 2		
C	Calibrator 3 62.5 ng/mL	Calibrator 3 62.5 ng/mL	Sample 3	Sample 3		
D	Calibrator 2 31.3 ng/mL	Calibrator 2 31.3 ng/mL	Sample 4	Sample 4		
E	Calibrator 1 7.8 ng/mL	Calibrator 1 7.8 ng/mL	Sample 5	Sample 5		
F	Blank 0 ng/ mL	Blank 0 ng/ mL	Sample 6	Sample 6		
G	Control "Low"	Control "Low"	Sample 7	Sample 7		
H	Control "High"	Control "High"	Sample 8	Sample 8		

Suggested ELISA plate layout for calibrators, controls and samples using manual procedure. Duplicate wells are recommended for increased reliability of results. A full plate takes 40 samples.

## 9. TEST PROCEDURE

The following procedure is for manual testing. Validated protocols for Dynex DS2 and DSX ELISA automates are available upon request. Please note that the calibrator, blank and positive control vials, as well as the conjugate tube, fit directly into the DS2 or DSX ELISA automates. Other automated ELISA instruments can also be used, but have to be validated by the customer.

### 9.1 Procedural Notes

- Preparation: Please read the Instructions for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, a plate layout for all blanks, calibrators, controls and samples should be carefully established, using, for example, the sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips. Unused strips should be re-sealed

in the aluminium pouch and stored as described in Section 6.1.

- A 1:100 dilution of fecal extracts is recommended. This dilution will give sample results between 25 mg/kg (LoQ) and 2500 mg/kg in fecal. Extracts with higher Calprotectin values can be diluted more ( $> 1:100$ ) and re-tested if a value is required. Extracts with low Calprotectin values can be diluted less (1:50). The adjusted dilution factor must be taken into account when converting from ng/mL to mg/kg (see section 11 below).
- Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.
- A clean, disposable pipette tip must be used for dispensing each calibrator, control and sample.
- To achieve the most reliable results, blanks, calibrators, controls and patient samples should always be run in duplicate.
- All samples and kit reagents should be equilibrated to room temperature (18 – 25°C) before testing is begun.

## 9.2 ELISA Procedure

1. Dilute fecal extract samples 1:100 (e.g. 10  $\mu$ L sample + 990  $\mu$ L Sample Dilution Buffer) and mix well by vortexing.
2. Add 100  $\mu$ L of each blank, calibrator, control and diluted sample in duplicate wells; see recommended plate layout in Section 8.
3. Cover the plate with a incubate cover and incubate at room temperature for 40 $\pm$ 5 min) on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
4. At the end of the incubation time, remove the liquid and wash the wells by adding 300  $\mu$ L Washing Buffer to each well. Remove as much liquid as possible and repeat until a total of three washings have been performed. If a plate washer is used, check that all aspirating and filling probes are unblocked to ensure efficient washing of all wells. After the final wash, invert the plate and tap the well openings thoroughly on absorbent tissue to remove any remaining Washing Buffer.
5. Mix the content of Conjugate vial gently prior to use (do not shake). Add 100  $\mu$ L of conjugate to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
6. Cover the plate with incubate cover and incubate at room temperature for 40 $\pm$ 5 min) on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
7. Repeat the washing steps as described above, three times with 300  $\mu$ L Washing Solution per well.

8. Add 100  $\mu\text{L}$  Substrate Solution to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
9. Incubate the plate at room temperature (without shaking) for 20 – 30 minutes, protected from light.
10. Optional: Add 100  $\mu\text{L}$  1M NaOH stop solution to each well if a fixed incubation period is required.
11. Read the optical density (OD) values at 405 nm using an ELISA reader. If the plate reader has this option, shake the plate briefly (2-3 seconds) before reading.

## 10. RESULTS

### 10.1 Quality Control Values

- A new standard curve must be included in each run.
- The positive controls should be included in each run. The value of the controls should be within the limits printed on the vial labels.
- As a guide, the OD value of Calibrator 5 (500 ng/mL) should be  $\geq 1.6$  and the OD value of Blank (0 ng/mL) should be  $\leq 0.25$ . A representative calibration curve is shown in figure 1.

### 10.2 Calculation of the results

Calculation of Calprotectin concentration in patient fecal samples:

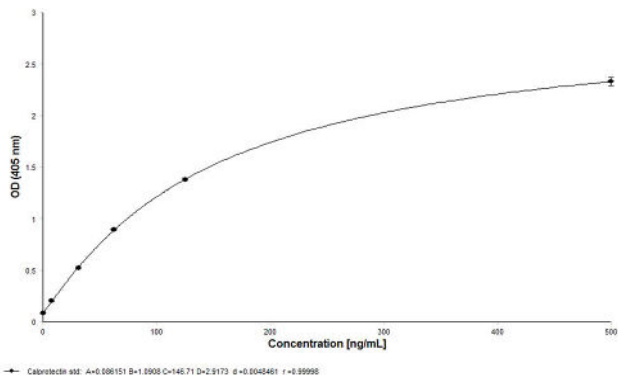
1. Calculate the mean OD values of all duplicate wells (blank, calibrators, and samples).
2. Plot the value of blank and each calibrator concentration (ng/mL) on the x axis against its mean OD value on the y axis to obtain a calibration curve. **A 4-parameter curve fit function is recommended** (see figure 1 below). If a logarithmic x axis is required, a value of 0.001 ng/mL must be used for standard A (0 ng/mL).
3. Use the calibration curve to determine the Calprotectin concentration in the diluted samples (ng/mL) based on their OD values.
4. **Multiply the Calprotectin concentration (ng/mL) in the diluted fecal extracts by 5 in order to convert to mg/kg Calprotectin in the original stool sample.**

This factor corrects for the total dilution of 1:5000 (1:50 during the extraction procedure and the following 1:100 dilution of the extracts) and converts the value from ng/mL to mg/kg.

*Example: if a diluted extract sample has a value of 100 ng/mL the concentration in the original stool specimen was  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

*Note: If extracts have been diluted more (or less) than the recommended 1:100, the additional dilution factor must be entered into the calculation.*

Figure 1: A representative calibration curve using 4-parameter curve fit.



### 10.3 Interpretation of the results

The following Calprotectin values in stool samples have been reported in the published literature<sup>3, 25</sup>):

Normal value	5 – 50 mg/kg
Positive value	> 50 mg/kg
Median value in patients with symptomatic colorectal cancers	350 mg/kg
Active, symptomatic inflammatory bowel disease	200 – 40 000 mg/kg

Note that a diagnosis should not be established based on a single test result. Diagnosis should take into consideration clinical history and symptoms.



## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established based on a single test result.

## 12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Note: All design verification studies were performed by manual testing on fecal extract samples (diluted 1:100), using the ELISA procedure described in Section 9.

### Inter-assay and intra-assay precision from fecal extracts.

Inter-assay precision, fecal extracts*		Intra-assay precision, fecal extracts**	
Concentration in feces (mg/kg)	% CV	Concentration in feces (mg/kg)	% CV
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\*Mean results from three different laboratories, each testing two different kit lots: six samples were tested a total of 10 times over five days

\*\* Mean results from three different laboratories, each testing two kit lots: six samples were tested with 10 replicates in one run

### Recovery:

Feces: 85 – 105%; tested with fecal extract spiked with purified Calprotectin at five different levels.

### Limit of Quantification:

5 ng/mL; tested with feces extract and purified Calprotectin. Samples were analysed five times over five days. The mean CV for the different samples and determinations at this level was 12%.

### Limit of Detection:

< 5 ng/mL; calculated as mean (Sample Dilution Buffer; n= 32) + 5x SD.

### Interference

No observed interference on the ELISA from commonly used pharmaceuticals: Prednisolon, Imurel, Salazopyrin and Ciprofloxacin.

### Extraction precision

Two fecal samples were extracted 10 times each, using the procedure described in section 7.1.2, and the extracts analysed in the ELISA. Mean results from three different laboratories and one kit lot:

Sample	Concentration (mg/kg)	% CV
Low	130	8.7
High	1357	8.8

### Linearity, fecal extracts

Fecal extracts (n=10) were diluted 1:100 – 1:1000 and analysed in the ELISA. Mean results:

Dilution	% of 1:100 dilution
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Note that sample variation in linearity has been observed.

## 13. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC, the use of the *in vitro* diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performance and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and the warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analysers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for *in vitro* diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these rea-

gents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and hepatitis B antigen (Bag) and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should be regarded and handled as potentially infectious.

- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- Do not use reagents from other manufacturers with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label or after 1 month of preparation of concentrated reagents to working solutions.
- Use only clean pipette tips, dispensers and lab ware.
- To prevent cross-contamination, do not interchange screw caps of reagent vials.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage, check conjugate, calibrators and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results, pipette calibrators, control and fecal extract samples, and dispense conjugate and substrate, accurately to the bottom of microplate wells, without splashing.
- Some reagents contain sodium azide at less than 0.1% (w/v) and/or 0.1% Kathon.
- Store the substrate solution in the original, opaque bottle; the solution should be clear to pale yellow. Mix gently before use.
- BIOHIT Calprotectin is designed for use by qualified personnel who are trained in good laboratory practice.

### **13.1 Disposal Considerations**

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose of hazardous waste.

#### **14. WARRANTY**

Biohit shall remedy all defects discovered in any Product (the "Defective Product") that result from unsuitable materials or negligent workmanship and which prevent the mechanical functioning or intended use of the Products including, but not limited to, the functions specified in Biohit's specifications for the Products. ANY WARRANTY WILL, HOWEVER, BE DEEMED AS VOID IF FAULT IS FOUND TO HAVE BEEN CAUSED BY MALTREATMENT, MISUSE, ACCIDENTAL DAMAGE, INCORRECT STORAGE OR USE OF THE PRODUCTS FOR OPERATIONS OUTSIDE THEIR SPECIFIED LIMITATIONS OR OUTSIDE THEIR SPECIFICATIONS, CONTRARY TO THE INSTRUCTIONS GIVEN IN THE INSTRUCTION MANUAL.

The period of this warranty is defined in the instruction manual of the Products and will commence from the date the relevant Product is shipped by Biohit. This Biohit Diagnostic kit has been manufactured according to ISO 9001 / ISO 13485 quality management protocols.

In case of interpretation disputes the English text applies.

In case of any serious incident in relation to the product, contact the manufacturer.

## **15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE**

BIOHIT Calprotectin kit for analysis of Calprotectin in feces.

*Please refer to sections 7 – 9 in the package insert for a full description of the practical steps.*

### **Extraction**

Perform extraction according to one of the methods described in section 7.1.1 – 7.1.2

### **ELISA (manual procedure)**

- Dilute fecal extracts 1:100 in Sample Dilution Buffer
- Add 100 µL calibrators, controls, blank and samples to the ELISA plate
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min)
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Buffer
- Add 100 µL of Conjugate solution to each well
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min)
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Buffer
- Add 100 µL Substrate Solution to each well
- Incubate under cover for 20 – 30 min
- Optional: add 100 µL 1M NaOH to each well
- Read the OD values at 405 nm using an ELISA reader
- Using a 4-parameter curve fit, calculate the results (ng/mL)
- mg/kg in feces = ng/mL × 5

For questions, please contact: [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

## KÄYTTÖOHJE

BIOHIT Calprotectin

REF 602260

1. KÄYTTÖTARKOITUS .....	23
2. TAUSTA .....	23
3. TESTIN PERIAATE .....	24
4. MATERIAALIT .....	25
4.1. Pakkaukseen sisältyvät reagenssit .....	25
4.2. Pakkaukseen sisältyvät materiaalit .....	26
4.3. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen .....	26
5. SÄILYVYYS JA SÄILYTYS .....	27
6. REAGENSSEIEN VALMISTAMINEN .....	27
6.1. Päälystetyn kuoppalevyn liuskat .....	27
6.2. Näytteen laimennuspuskuri .....	27
6.3. Pesupuskuri .....	27
6.4. Ulostenäytepuskuri .....	27
6.5. Kalibraattorit, 0-näyteliuos ja kontrollit .....	28
6.6. Konjugaattiliuos .....	28
6.7. Substraattiliuos .....	28
7. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA VALMISTELEMINEN .....	28
7.1. Ulostenäytteet .....	28
7.1.1. Uuttaminen BIOHIT-uuttamisputkien avulla .....	29
7.1.2. Uuttaminen punnitusmenetelmällä (ilman uuttamislaitetta) .....	29
8. SUOSITELTU LEVYN PIPETOINTIKAAVIO .....	30
9. TESTIMENETELMÄ .....	30
9.1 Menetelmiä koskevia huomioita .....	31
9.2 ELISA-menetelmä .....	31
10. TULOKSET .....	32
10.1 Kalibroidut kontrollien raja-arvot .....	32
10.2 Tulosten laskenta .....	32
10.3 Tulosten tulkinta .....	34
11. TOIMENPITEEN RAJOITUKSET .....	34
12. TESTIN SUORITUSARVOT .....	34
13. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET .....	36
13.1 Huomioitava hävitettäessä .....	37
14. TAKUU .....	38
15. TESTIN LYHYT KUVAUS .....	39
DATE OF ISSUE .....	114
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS .....	114
ORDERING INFORMATION .....	116

## 1. KÄYTTÖTARKOITUS

BIOHIT Calprotectin on kvantitatiivinen *in vitro* entsyymi-immunomääritys, joka auttaa diagnosoimaan ohutsuolen tai mahalaukun orgaanisia sairauksia, kuten tulehduksellista suolistosairautta, haavaista paksusuolitulehdusta tai Crohnin tautia, havaitsemalla kalprotektiinia ulostenäytteistä. Lisäksi testillä seurataan sairauden aktiivisuutta ja hoitovastetta potilailla, joilla on haavainen paksusuolitulehdus tai Crohnin tauti. Testi voidaan suorittaa joko manuaalisesti tai automaattilla ja se on tarkoitettu vain terveydenhuollon ammattilaisten käyttöön.

## 2. TAUSTA

Kalprotektiini on 36 kilodaltonin kokoinen kalsiumia ja sinkkiä sitovaa proteiini<sup>1)</sup> jota vapautuu erityisesti leukosyyteistä, tarkemmin polymorfonukleaarista neutrofiilisistä granulosyyteistä (PMN) suolen luumeniin suoliston limakalvon tulehduksen aikana. Suolen mikro-organismit stimuloivat leukosyyttejä siirtymään suolen luumeniin, missä ne vapauttavat sisältönsä, johon kuuluu mikrobeja tappavia aineita, kuten kalprotektiinia. Tämä proteiini muodostaa noin 60 % kaikista PMN:n soluliman proteiineista<sup>2)</sup> ja sen määrä voidaan luotettavasti arvioida ulostenäytteistä, joita on säilytetty korkeintaan seitsemän päivää huoneenlämmössä<sup>3)</sup>. Erityyppiset sairaudet, esimerkiksi bakteeri-infektiot, nivelreuma ja syöpä, johtavat PMN:n aktivoitumiseen ja lisäävät kalprotektiinin määrää solulimassa tai muissa kehon nesteissä<sup>4)</sup>.

Ulosteen kalprotektiinipitoisuus korreloi suolen luumeniin siirtyneiden PMN:en lukumäärän kanssa<sup>5)</sup> ja pitoisuus voidaan määrittää luotettavasti myös pienistä (alle gramman painoisista) satunnaisista ulostenäytteistä<sup>3,6)</sup>. Suoliston elimelliset taudit jättävät selkeän suolistotulehduksesta kertovan kalprotektiinijäljen; tyypillisesti kalprotektiinin arvot nousevat viisi- tai monituhatkertaisiksi siitä, mitä terveiden henkilöiden arvot enimmäkseen ovat<sup>3,7,9)</sup>. Tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD), kuten haavainen paksusuolitulehdus ja Crohnin tauti, voivat esiintyä varhaislapsuudesta myöhäiseen aikuisikään asti ja diagnoosia viivästyttävät usein vaikeaselkoiset oireet tai vastahakoisuus endoskopian ja biopsian suorittamiseen.

Toiminnalliset häiriöt, kuten ärtyvän suolen oireyhtymä (IBS), eivät aiheuta lisääntynyttä kalprotektiinin pitoisuutta ulosteessa, toisin kuin IBD. Potilailla, joilla on elimellinen tai toiminnallinen vatsavaiva, voi olla samankaltaisia oireita, ja pelkkä kliininen tutkimus ei välttämättä riitä oikean

diagnoosin varmistamiseen. Kalprotektiinin testaaminen ulosteesta on yksinkertainen, ei-invasiivinen, edullinen ja objektiivinen tapa valikoida potilaita lisätutkimuksiin, kuten endoskopiaan. Vatsan oireilu on hyvin tavallista sekä lapsilla että aikuisilla ja BIOHIT Calprotectin ELISA-testillä mitatut negatiiviset tulokset voivat suurella todennäköisyydellä auttaa poissulkemaan tulehdukselliset suolistosairaudet <sup>7)</sup>.

Limakalvon parantuminen on onnistuneen IBD:n hoidon tavoite ja kalprotektiinin testaus ulosteesta kertoo, milloin tämä tavoite on saavutettu. Monilla IBD-potilailla on kliinisen toipumisjakson aikana normaalit C-reaktiivisen proteiinin (CPR) tasot, mutta heillä on silti jatkuva tulehdus, <sup>10)</sup>, joka näkyy kalprotektiinin määrän kasvuna ulosteessa. Näillä potilailla IBD:n uusiutumisriski seuraavien kuukausien aikana on korkea <sup>11)</sup>. Jos limakalvo paranee, uusiutumisriski ja merkittävän suolistoleikkauksen tarve pienenevät <sup>12,13)</sup>. Kalprotektiinin tason normalisoituminen merkitsee sitä, että limakalvon paraneminen on alkanut <sup>14)</sup>.

### 3. TESTIN PERIAATE

BIOHIT Calprotectin-testi perustuu ulostenäytteen käsittelyyn eristyspuskurin (Fecal Extraction Buffer) avulla. Kalprotektiinipitoisuus määritetään entsyymi-immunologisella menetelmällä (ELISA), joka on kalprotektiinille spesifinen.

ELISA-testissä näytteet ja kalibraattorit inkuboidaan erillisillä kuoppalevyillä, jotka on päällystetty kalprotektiinia sitovilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Inkuboinnin ja kuoppalevyjen pesun jälkeen sitoutuneen kalprotektiinin annetaan reagoida entsyymillä leimatun, affiniteetti-puhdistetun kalprotektiinispesifisen vasta-aineen kanssa. Tämän reaktion jälkeen kuoppalevyyn sitoutuneen entsyymin määrä on verrannollinen kalprotektiinin määrään näytteessä tai kalibraattorissa, mikä määritetään lisäämällä kuoppiin substraattia joka reagoi entsyymin kanssa muodostaen värireaktion. Väriin intensiivisyys määritetään mittaamalla kuoppien absorbanssi käyttäen ELISA-lukijalaitetta. Intensiteetti on suoraan verrannollinen kalibraattorien ja näytteen kalprotektiinipitoisuuden kanssa. Analyysi kalibroidaan käyttämällä leukosyyttiuutteesta puhdistettua kalprotektiinia.



## 4. MATERIAALIT

### 4.1. Pakkaukseen sisältyvät reagenssit

**Päällystetty kuoppalevy:** 12 liuskaa, 8 kuoppaa liuskassa, päällystetty affiniteetti-puhdistetulla, monoklaanisella, kalprotektiinispesifisellä hiiren vasta-aineella. Levy on pakattu umpiopakattuun pussiin yhdessä kuivausaineen kanssa. Älä yhdistä eri kittilaatikoiden kuoppalevyjä/liuskoja, vaikka niillä olisi sama eränumero.

**DILBUF 5x** laimennuspuskurikonsentraatti (5x konsentraatti) \*\*\*:

1 x20 ml, 5x konsentraatti, laimennetaan tislattulla/deionisoidulla vedellä, pH 8,0 ± 0,2, keltainen liuos, pullossa sininen korkki.

**WASH 20x** pesupuskurikonsentraatti (20x konsentraatti) \*:

1 x50 ml, 20x konsentraatti, laimennetaan tislattulla/deionisoidulla vedellä, kuoppalevyn pesuun, pH 7,8 ± 0,2, kirkas liuos, pullossa valkoinen korkki.

**FEC EXTRBUF 2.5X** ulostenäytepuskurikonsentraatti (2,5x konsentraatti) \*\*: 2 x 90 ml, 2,5x konsentraatti, laimennetaan tislattulla/deionisoidulla vedellä, pH 8,0 ± 0,2, kirkas liuos, pulloissa valkoiset korkit.

**CAL 1-5** kalprotektiinin kalibraattorit ja **BLANK** 0-näyteliuos\*\*\*:

6 kpl 1,0 ml:n pulloja, käyttövalmis, keltainen liuos, ampulleissa eriväriset korkit:

Blank: Sininen korkki	0	ng/ml
Kalibraattori 1: Vihreä korkki	7.8	ng/ml
Kalibraattori 2: Keltainen korkki	31.3	ng/ml
Kalibraattori 3: Punainen korkki	62.5	ng/ml
Kalibraattori 4: Valkoinen korkki	125	ng/ml
Kalibraattori 5: Musta korkki	500	ng/ml

**CONTROL LOW CONTROL HIGH** Matala ja korkea kontrolli \*\*\*: 2 kpl 1,0 ml:n ampullia, käyttövalmiita, keltainen liuos, matala kontrolli: ampulli, jossa ruskea korkki, korkea kontrolli: ampulli, jossa violetti korkki.

**CONJ** Konjugaattiliuos\*\*\*\*: 13 ml emäksistä fosfataasi-leimattua, affiniteetti- puhdistettua polykloonaalista kanin kalprotektiini vasta-ainetta, käyttövalmis, punainen liuos, 25 ml:n Dynex-reagenssiputki, jossa valkoinen korkki.

**SUBS** Substraattiliuos (pNPP): 13 ml, käyttövalmis, kirkas tai vaalean-keltainen liuos, läpinäkyvät pullo, jossa keltainen korkki.

**Huomautus:** Jos käytät Dynex-automaattia, substraattiliuos tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista.

*	Sisältää 0,1 % Kathonia
**	Sisältää <0,1 % natriumatsidia
***	Sisältää 0,1 % Kathonia ja <0,1 % natriumatsidia
****	Sisältää 0,02 % metyyli-isotiatsolonaa ja 0,02 % bromonitrodioksaania

#### 4.2. Pakkaukseen sisältyvät materiaalit

- 2 inkubaatiokalvoa
- 1 testin käyttöohje
- 1 levyn malli

#### 4.3. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen

- Tislattu/deionisoitu vesi
- Uuttamisvälineet (katso kohta 7.1.1 ja 7.1.2)
- Kertakäyttöiset, murrettavat inokulaatiosilmukat (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Herkkä digitaalivaaka (40–150 mg) (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Kertakäyttöiset, kierrekorkilla varustetut polystyreeniset näyteputket, 5 ml (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Vortex-sekoitin (putkisovittimen kanssa) tai ravistelija 1000 rpm:n nopeudella, käytettäessä ulostenäytteen uuttamiseen kohdassa 7.1.2
- Kertakäyttöiset putket näytteiden laimentamiseen: Eppendorf-putket tai samankaltaiset (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Pipettejä, joiden tilavuus on 10–1000 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Pipetti tai monikanavainen pipetti 1000 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Mikroitiiterilevyjen pesuri tai monikanavainen pipetti 300 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Levyn ravistelija (500–700 r/min) (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Ajastin (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Kuoppalevyn lukija, suodatin 405 nm (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- 1 M NaOH (pysäytysliuos, valinnainen)

## 5. SÄILYVYYS JA SÄILYTYS

Säilytettäessä avaamattomina 2–8 °C:ssa pakkauksen reagenssit pysyvät stabiileina etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään asti.

Levyt, reagenssit ja konsentroidut puskuriliuokset säilyvät avattuina kolme kuukautta säilytettynä 2–8 °C:ssa.

Pesupuskuriliuoskonsentraatin, laimennuspuskurikonsentraatin ja ulostenäytepuskurikonsentraatin työliuokset (1x) säilyvät kuukauden ajan säilytettynä 2–8 °C:ssa, kun ne valmistetaan puhtaisiin astioihin.

Vältä altistamista korkeille lämpötiloille ja suoralle auringonvalolle.

## 6. REAGENSSEIEN VALMISTAMINEN

Kaikki reagenssit, näytteet ja kontrollit tulee tasapainottaa huoneenlämpöön (18–25 °C) ennen testin aloittamista.

### 6.1. Päälystetyn kuoppalevyn liuskat

Käyttövalmiit liuskat on päälystetty affiniteetti-puhdistetulla, monoklaanisella hiiren kalprotektiinivasta-aineella. Käyttämättömät liuskat tulee poistaa kehyksestä ja sulkea heti alumiinifoliopussiin kuivausaineen kanssa. Säilytys 2–8 °C:n lämpötilassa.

### 6.2. Näytteen laimennuspuskuri

Laimenna 5x näytteen laimennuspuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (20 ml) neljään osaan (80 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on 100 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu näytteen laimennuspuskurikonsentraatti suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

*Huomautus:* Jos käytät Dynex DS2- tai DSX ELISA -automaattia, laimennuspuskurikonsentraatti tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista.

### 6.3. Pesupuskuri

Laimenna 20x pesupuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (50 ml) 19 osaan (950 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on 1000 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu pesupuskuri suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

### 6.4. Ulostenäytepuskuri

Laimenna 2,5x ulostenäytepuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (90

ml) 1,5 osaan (135 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on yhteensä 225 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu puskurikonsentraatti suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

### **6.5. Kalibraattorit, 0-näyteliuos ja kontrollit**

0-näyteliuos, kalibraattorit ja kontrollit sisältävät jokainen 1,0 ml käyttövalmista liuosta. Kalprotektiinipitoisuus on merkitty jokaisen pullon etikettiin. Pullot ovat yhteensopivia Dynex DS2- ja DSX ELISA -automaattien kanssa.

### **6.6. Konjugaattiliuos**

Putki sisältää 13 ml emäksistä fosfataasi-leimattua (ALP), affiniteetti-puhdistettua kanin kalprotektiinivasta-ainetta puskurissa, jossa on stabilisaattoria, säilöntäaineita ja inaktiivista (inertiä) punaista väriainetta. Liuos on käyttövalmista. Putki on yhteensopiva Dynex DS2- ja DSX ELISA -automaattien kanssa.

### **6.7. Substraattiliuos**

Pullo sisältää 13 ml p-nitrofenyylifosfaattiliuosta (pNPP). Liuos on käyttövalmista ja se tulee säilyttää alkuperäisessä, läpinäkyvässä pullossaan.

*Huomautus:* Jos käytät Dynex DS2- tai DSX ELISA -automaattia, entsyymisubstraattiliuosta tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista.

## **7. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA VALMISTELEMINEN**

BIOHIT Calprotectin on kehitetty ja hyväksytty ulostenäytteiden tutkimiseen.

### **7.1. Ulostenäytteet**

Koska kalprotektiini säilyy hyvin ulosteessa, potilaat voivat ottaa pienen näytteen kotioloissa. Ota 1–5 gramman (noin yksi teelusikallinen) näyte, laita se sopivaan puhtaaseen astiaan ja toimita se mahdollisimman pian, viimeistään seuraavan neljän päivän aikana, laboratorioon. Jos näyte laitetaan hyväksytyyn kuljetuspakkaukseen, näyte voidaan lähettää tavallisena postina, kylmäkuljetusta ei tarvita. Altistamista yli 30 °C:n lämpötiloille tulee välttää.

Näytteet voidaan säilyttää myös pakastettuina, –20 °C:ssa tai alhaisemmassa lämpötilassa korkeintaan 1,5 vuoden ajan, kunnes ne toimitetaan

tai postitetaan. Pakastetut näytteet tulee sulattaa ja tasapainottaa huoneenlämpöön ennen uuttamista ja testausta. Vältä näytteen uudelleenpakastusta ja -sulatusta. Huomioi, että ulostenäytteen jäädyttäminen voi joissain tapauksissa johtaa kohonneisiin kalprotektiinipitoisuuksiin, todennäköisimmin granulosityteistä vapautumisen seurauksena.

*Huomautus:* Ennen uuttamisen aloittamista uloste tulee homogenisoida hyvin esimerkiksi lastalla, ennen kuin pieni osa erotetaan uuttamista varten.

Suosittelemme BIOHIT-uuttamisputkien tai jonkin alla kuvatun menetelmän (kohdat 7.1.1 ja 7.1.2) käyttöä uuttamiseen. Tee uuttaminen pakkauselosteeseen ohjeen mukaisesti, sen mukaan mikä uuttamisväline tai -menetelmä on valittu. Myös muita asiakkaan validoimia menetelmiä tai laitteita voi käyttää.

#### **7.1.1. Uuttaminen BIOHIT-uuttamisputkien avulla**

Käyttöohjeet: Lue tuotteen Ref. 602270 pakkauseloste.



#### **7.1.2. Uuttaminen punnitusmenetelmällä (ilman uuttamislaitetta)**

1. Punnitse tyhjä näyteputki (tyhjäpaino) yhdessä inokulaatiosilmukan kanssa.
2. Ota silmukan avulla noin 100 mg (40–120 mg) ulostetta ja aseta se kierrekorkilliseen näyteputkeen. Vältä kiinteiden, sulamatta jääneiden materiaalien, kuten kuitujen ja siemenien ottamista.
3. Punnitse näyteputki ja silmukka yhdessä ulosteeseen kanssa, jolloin saat laskettua ulosteeseen nettopainon.
4. Murra tai leikkaa silmukan kädensijan yläosa irti ja jätä alaosa putkeen.
5. Lisää ulostenäytepuskuri painoon: määrän suhde 1:50, esimerkiksi 4.9 ml puskuria 100 mg:a ulostetta kohti. Sulje putki.
6. Sekoita voimakkaasti 30 sekunnin ajan vortex-sekoittimessa.
7. Jatka sekoitusta ravistimessa (noin nopeudella 1000 r/min) noin 30

- ± 5 minuutin ajan. Silmukan tulee olla putken sisällä sekoituksen ajan.
8. Anna uutteen asettua muutaman minuutin ajan ja ota näytettä varovasti pipetillä näyteputken yläosasta. Sentrifugin käyttö ei ole tarpeellista, mutta lyhyt käsittely voidaan suorittaa, jos tarvitaan partikkelivapaa liuos.
  9. Uute, joka edustaa ulostenäytteen laimennusta 1:50 (paino:määrä), on nyt valmis laimennusta ja testausta varten.
  10. Siirrä noin 0.5 ml uutetta uuteen putkeen säilytystä varten. Uutteita voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa ainakin viiden päivän ajan tai jäädytettynä alle –20 °C:een 12 kuukauden ajan.

## 8. SUOSITELTU LEVYN PIPETOINTIKAAVIO

	1	2	3	4	etc.	
<b>A</b>	Kalibraattori 5 500 ng/ml	Kalibraattori 5 500 ng/ml	Näyte 1	Näyte 1		
<b>B</b>	Kalibraattori 4 125 ng/ml	Kalibraattori 4 125 ng/ml	Näyte 2	Näyte 2		
<b>C</b>	Kalibraattori 3 62,5 ng/ml	Kalibraattori 3 62,5 ng/ml	Näyte 3	Näyte 3		
<b>D</b>	Kalibraattori 2 31,3 ng/ml	Kalibraattori 2 31,3 ng/ml	Näyte 4	Näyte 4		
<b>E</b>	Kalibraattori 1 7,8 ng/ml	Kalibraattori 1 7,8 ng/ml	Näyte 5	Näyte 5		
<b>F</b>	0-näyteliuos 0 ng/ml	0-näyteliuos 0 ng/ml	Näyte 6	Näyte 6		
<b>G</b>	Matala kon- trolli	Matala kon- trolli	Näyte 7	Näyte 7		
<b>H</b>	Korkea kontrolli	Korkea kontrolli	Näyte 8	Näyte 8		

Suosittelava ELISA-levyn pipetointimalli kalibraattoreille, kontrolleille ja näytteille manuaalisessa testivaihtoehdossa. Kahden rinnakkaisen kuopan käyttöä yhdelle näytteelle suositellaan tuloksien luotettavuuden parantamiseksi. Täyteen levyn mahtuu 40 näytettä.

## 9. TESTIMENETELMÄ

Seuraavat toimenpiteet koskevat manuaalista testausta. Hyväksytyt toimenpiteet Dynex DS2- ja DSX ELISA-automaattien käyttöön ovat

saatavilla pyynnöstä. Huomioi, että kalibraattorin, 0-näyteliuoksen ja positiivisen kontrollin sekä konjugaatin putki sopivat DS2- ja DSX ELISA-automaatteihin. Muitakin automaattisia ELISA-välineitä voidaan myös käyttää, mutta asiakkaan tulee validoida ne.

### 9.1 Menetelmiä koskevia huomioita

- Valmistelu: Lue käyttöohje huolellisesti ennen määrittäksen tekemistä. Tulosten luotettavuus on riippuvainen kuvatus käyttöohjeen huolellisesta noudattamisesta. Ennen testauksen aloittamista, pipetointimalli 0-näyteliuokseen, kalibraattoreineen, kontroleineen ja näytteineen tulee varmistaa huolellisesti, käyttäen esimerkiksi pakkauksessa olevaa pohjaa apuna. Valitse tarvittava määrä kuoppalevyn liuskoja. Käytettävät liuskat tulee sulkea alumiinipussiin ja säilyttää kohdassa 6.1. kuvatulla tavalla.
- Suositeltava laimennos ulostenäytteestä on 1:100. Tällä laimennoksella näyteen tulos on välillä 25 mg/kg (LoQ) – 2500 mg/kg ulosteesta. Näytteitä, joiden kalprotektiiniarvot ovat korkeat, voidaan laimentaa enemmän (> 1:100) ja testata uudelleen, jos tarkka arvo tarvitaan. Näytteitä, joiden kalprotektiiniarvot ovat alhaiset, voidaan laimentaa vähemmän (1:50). Käytetty laimennuskerroin tulee huomioida konvertoitaessa määriä yksiköstä ng/ml yksikköön mg/kg (katso kohta 10 jäljempänä).
- Tee kaikki testin vaiheet annetussa järjestyksessä ilman huomattavia viivästyksiä vaiheiden välillä.
- Jokainen kalibraattori, kontrolli ja näyte tulee annostella puhtaalla, kertakäyttöisellä pipettikärjellä.
- Jotta tulokset olisivat luotettavia, 0-näyteliuoksista, kalibraattoreista, kontroleista ja potilasnäytteistä tulee aina testata myös kaksoiskappaleet.
- Kaikki näytteet ja pakkauksen reagenssit tulee saattaa huoneenlämpöön (18–25 °C) ennen testin aloittamista.

### 9.2 ELISA-menetelmä

1. Laimenna ulosteudenäytteet suhteeseen 1:100 (esim. 10 µL näytettä + 990 µL näyteen laimennuspuskuri) ja sekoita hyvin Vortex-sekoittimessa.
2. Lisää 100 µL kutakin 0-näyteliuosta, kalibraattoria, kontrollia ja laimennettua näytettä kuoppalevyn kaksoiskappaleeseen. Katso suositeltu levyn järjestys kohdasta 8.
3. Peitä levy inkubaatiokalvolla ja inkuboi huoneenlämmössä 40 ± 5 min)

- vaakatasoisessa levyn ravistimessa (nopeudella noin 500–700 r/min).
4. Poista neste inkubointiajan lopussa ja pese kuoppalevyn kuopat lisäämällä 300 µL pesupuskuria jokaiseen kuoppaan. Poista mahdollisimman suuri osa nesteestä ja toista pesu vielä kaksi kertaa. Jos käytössä on levynpesin, tarkista että kaikki imu- ja täyttönturit ovat auki, jotta kuopat puhdistuvat kunnolla. Käännä viimeisen pesun jälkeen levy nurin ja taputtele kuoppia huolellisesti imukykyisellä pyyhkeellä poistaaksesi pesupuskurin jäämät.
  5. Sekoita konjugaattipullon sisältö hellävaraisesti ennen käyttöä (älä ravista). Lisää 100 µL konjugaattiliuosta jokaiseen kuoppaan käyttämällä mielellään toistopipettiä tai monikanavaista pipettiä.
  6. Peitä levy inkubaatiokalvolla ja inkuboi huoneenlämmössä  $40 \pm 5$  min vaakatasoisessa levyn ravistimessa (noin nopeudella 500–700 r/min).
  7. Toista yllä kuvatut pesuvaiheet jokaiselle kuopalle kolme kertaa 300 µL:llä pesuainetta.
  8. Lisää 100 µL substraattiliuosta jokaiseen kuoppaan, käytä mielellään toistopipettiä tai monikanavaista pipettiä.
  9. Inkuboi huoneenlämmössä (älä ravista) valolta suojattuna 20–30 minuutin ajan.
  10. Vaihtoehtoinen: Lisää 100 µL 1 M NaOH -pysäytysliuosta jokaiseen kuoppaan, jos ennalta määritetty inkubaatioaika on tarpeen.
  11. Lue optisen tiheyden (OD) arvot 405 nm:n kohdalla ELISA-lukijan avulla. Jos levyn lukijassa on ravistelutoiminto, ravistele levyä hetken (2–3 sekuntia) ennen lukemista.

## 10. TULOKSET

### 10.1 Kalibroidut kontrollien raja-arvot

- Uusi standardikäyrä pitää sisällyttää jokaiseen käyttökertaan.
- Positiiviset kontrollit pitää sisällyttää jokaiseen käyttökertaan. Kontrollien arvojen tulee olla lääkepullojen etiketteihin merkittyjen raja-arvojen mukaiset.
- Ohjeena on, että kalibraattori 5:n (500 ng/ml) OD-arvon tulee olla  $\geq 1.6$  ja 0-näyteliuksen (0 ng/ml) OD-arvon tulee olla  $\leq 0.25$ . Kuva 1 esittää edustavan kalibraattorikäyrän.
- 

### 10.2 Tulosten laskenta

Kalprotektiinipitoisuuden laskeminen potilaan ulostenäytteestä:

1. Laske kaikkien kaksoismääritysten (0-näyteliuos, kalibraattorit ja näytteet) keskimääräiset OD-arvot.



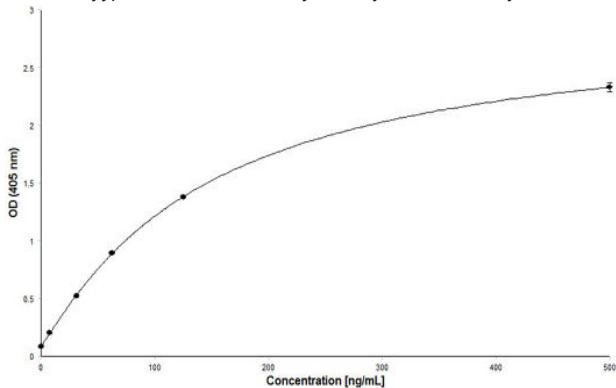
2. Merkitse 0-näyteliuoksen ja jokaisen kalibraattorin ja pitoisuuden (ng/ml) arvo X-akselille vastaamaan sen Y-akselilla olevaa OD-keskiarvoa piirtääksesi standardikäyrän. **Neliparametristä sovituskäyrää (curve fit function) suositellaan käytettäväksi** (katso kuva 1 alla). Jos logaritminen x-akseli on tarpeen, arvoa 0,001 ng/ml tulee käyttää 0-näyteliuokselle (0 ng/ml).
3. Määritä kalprotektiinipitoisuus laimennetuissa näytteissä (ng/ml) OD-arvojen perusteella käyttämällä kalibrointikäyrää.
4. **Kerro kalprotektiinipitoisuus (ng/ml) laimennetuissa ulostenäytteissä viidellä, jotta voit muuntaa ne yksikköön mg/kg kalprotektiinia alkuperäisessä ulostenäytteessä.**

Tämä korjaa laimennoksen suhteessa 1:5000 (1:50 uuttamisvaiheessa ja sitä seuraava uutteen laimennus 1:100) ja muuttaa arvon yksiköistä ng/ml yksikköön mg/kg.

*Esimerkki: jos laimennetun uutetun näytteen arvo on 100 ng/ml, alkupe-  
räisen ulostenäytteen pitoisuus on  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

*Huomautus: Jos uutetta on laimennettu suositeltua suhdetta 1:100 enemmän (tai vähemmän), lisälaimennuskerroin tulee huomioida laskelmissa.*

Kuva 1: Tyypillinen kalibraatiokäyrä, käytössä 4P käyrän sovitus.



→ Calprotectin std: A=0.096151 B=1.0998 C=146.71 D=2.9173 d=0.0048461 r=0.99998

### 10.3 Tulosten tulkinta

Kirjallisuudessa on raportoitu seuraavat kalprotektiinin arvot ulostenäytteissä<sup>3, 25</sup>:

Normaali arvo	5 – 50 mg/kg
Positiivinen arvo	> 50 mg/kg
Mediaaniarvo symptomaattista kolorektaalisyöpää sairastavilla potilailla	350 mg/kg
Aktiivinen, oireinen tulehduksellinen suolistosairaus	200 – 40 000 mg/kg

Huomaa, että diagnoosia ei tule tehdä yksittäisen testituloksen perusteella. Diagnoosissa tulee ottaa huomioon potilaan kliininen taudinkuva ja oireet.

### 11. TOIMENPITEEN RAJOITUKSET

Näytteen toistuva pakastaminen ja sulattaminen saattaa vaikuttaa testitulosten tarkkuuteen.

Lopullista diagnoosia ei tule tehdä yksittäisen testituloksen perusteella.

### 12. TESTIN SUORITUSARVOT

Huomautus. Kaikki testin varmennustutkimukset suoritettiin uloste-uutteenäytteiden (laimennus 1:100) manuaalisella testauksella kohdassa 9 kuvatus ELISA-menetelmän mukaisesti.

#### Testien välinen ja testien sisäinen toistettavuus ulostenäytteistä:

Testien välinen toistettavuus, ulostenäytteet*		Testien sisäinen toistettavuus, ulostenäytteet**	
Pitoisuus ulosteessa (mg/kg)	% CV	Pitoisuus ulosteessa (mg/kg)	% CV
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\* Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta, jokainen testasi kitin kaksi valmistuserää: kuusi näytettä testattiin yhteensä kymmenen kertaa viiden päivän aikana

\*\* Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta, jokainen testasi kaksi valmistuserää: kuusi näytettä ja kymmenen toistoa yhdellä kerralla

### **Saanto (recovery)**

Uloste: 85–105 %; testattu ulostenäytteellä, johon lisätty puhdistettua kalprotektiinia viidellä eri pitoisuudella.

### **Kvantifointiraja (limit of quantification):**

5 ng/ml; testattu ulostenäytteellä ja puhdistetulla kalprotektiinilla. Näytteet analysoitiin viisi kertaa viiden päivän aikana. Eri näytteiden ja määritysten CV:n keskiarvo tällä tasolla oli 12 %.

### **Määrittämiss raja (limit of detection):**

<5 ng/ml; laskettu keskiarvona (laimennuspuskuri; n= 32) + 5x SD.

### **Häiritsevät tekijät**

Yleisesti käytettyjen lääkkeiden: prednisoloni, Imurel, salatsopyriini ja sip-rofloksasiini ei todettu vaikuttavan ELISA-testin tuloksiin.

### **Uuttamisen toistettavuus (precision)**

Kaksi ulostenäytettä uutettiin molemmat kymmenen kertaa kohdassa 7.1.2 kuvailtujen toimenpiteiden mukaisesti ja uutteen analysoitiin ELISA-menetelmällä. Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta ja yhdestä kitin valmistuserästä:

Näyte	Pitoisuus (mg/kg)	% CV
Low	130	8.7
High	1357	8.8

### Lineaarisuus, ulostenäyteuutteet

Ulostenäyteuutteet (n = 10) laimennettiin suhteessa 1:100–1:1000 ja analysoitiin ELISA-menetelmällä. Keskimääräiset tulokset:

Laimennus	% laimennussuhteen 1:100 tuloksesta
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Näytteiden vaihtelu on huomioitu lineaarisuudessa.

### 13. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET

- EU-direktiivin 98/79/EY 1. artiklan kohdan 2b mukaisesti, tämä *in vitro* -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite on valmistajan toimesta varmistettu käyttöön soveltuvaksi, toimivaksi ja turvalliseksi.
- Sen vuoksi käyttöohjeessa esitettyjä käyttöohjeita, tietoja, varotoimia ja varoituksia on seurattava tarkasti. Testikitin soveltuvuus käytettävissä analysointilaitteiden tai vastaavien laitteiden kanssa tulee validoida. Kaikki muutokset koskien muotoilua, kokopanoa ja testin suoritusohjetta sekä kaikki yhteiskäyttö muiden sellaisten tuotteiden kanssa, joita valmistaja ei ole hyväksynyt, ovat kiellettyjä ja käyttäjä on itse vastuussa muutoksista. Valmistaja ei ole vastuussa edellä mainituista syystä johtuvista virheellisistä tuloksista tai tapaturmista. Valmistaja ei ole vastuussa potilasnäytteiden visuaalisesta analysoinnista.
- Ainoastaan *in vitro* -diagnostiseen käyttöön
- Kaikki näiden reagenssien valmistuksessa käytetyt ihmisperäiset aineet on testattu HIV-vasta-aineiden, HCV-vasta-aineiden ja hepatiitti-B-antigeenien (Bag) suhteen ja ne on todettu negatiivisiksi. . Kuitenkin kaikkia materiaaleja on käsiteltävä potentiaalisesti tartuntavaarallisina.
- Älä vaihda reagensseja tai liuskoja tuote-erien välillä.
- Älä käytä tämän testin reagensseja yhdessä toisten valmistajien reagenssien kanssa.
- Älä käytä reagensseja niiden etikettiin merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen tai yhden kuukauden jälkeen siitä, kun konsentraateista on valmistettu käyttöliuos.
- Käytä vain puhtaita pipettikärkiä, annostelijoita ja laboratoriotarvikkeita.
- Estä ristikontaminaatio, äläkä vaihda reagenssipullojen korkkeja keskenään.

- Sulje reagenssien pullot tiukasti heti käytön jälkeen välttääksesi haihtumista ja mikrobikontaminaatiota.
- Tarkista ensimmäisen käytön ja sitä seuraavan säilytyksen jälkeen konjugaatin, kalibraattorien ja kontrollien pullot mikrobikontaminaation varalta ennen uudelleenkäyttöä.
- Välttääksesi ristikontaminaatio ja virheellisen korkeat testitulokset, pipetoi kalibraattorit, kontrollit ja ulosteutenäytteet ja annostelee konjugaatti ja substraatti tarkasti ja läikyttämättä kuoppalevyn kuopan pohjalle.
- Jotkin reagenssit sisältävät natriumatsidia alle 0,1 % (w/v) ja/tai 0,1 % Kathonia.
- Säilytä substraattiliuos alkuperäisessä, läpinäkymättömässä pullossa, liuoksen tulee olla kirkasta tai vaaleankeltaista. Sekoita varovasti ennen käyttöä.
- BIOHIT Calprotectin on tarkoitettu sellaisten pätevien ammattilaisten käyttöön, jotka tuntevat hyvät laboratoriokäytännöt.
- 

### **13.1 Huomioitava hävitettäessä**

Kemikaalien ja liuosten jäämiä tulee yleisesti käsitellä ongelmajätteenä. Tämänkaltaisen jätteen hävittämisestä on säädetty kansallisissa ja alueellisissa laeissa ja säädöksissä. Ota yhteyttä paikallisiin viranomaisiin ja jätteenkäsittely-yhtiöihin, jotka neuvovat vaarallisen jätteen hävittämisessä.

#### **14. TAKUU**

Valmistaja lupaa korvata kaikki sen tuotteissa löydetyt viat ("Viallinen tuote") jotka johtuvat epäsovivista materiaaleista tai huolimattomasta valmistustyöstä, mikä estää tuotteen mekaanisen toiminnan tai tarkoitetun käytön mukaanlukien, muttei rajoitettuna vain, toiminnot jotka on lueteltu valmistajan antamassa tuoteselostuksessa. TAKUU TULLAAN SILTI PITÄMÄÄN MITÄTÖITYNÄ JOS VIAN HUOMATAAN AIHEUTUNEEN TUOTTEEN VAHINGOITTAMISESTA, VÄÄRINKÄYTÖSTÄ, VÄÄRÄSTÄ SÄILYTYKSESTÄ, TAI KÄYTÖSTÄ ANNETTUJEN SPE-SIFIKAATIOIDEN TAI RAJOITUSTEN ULKOPUOLELLA. TAI KÄYTTÖOHJEEN VASTAISESTI.

Takuun voimassaoloaika vastaa tuotteen säilyvyysaika. Tämä Biohitin diagnostinen kitti on valmistettu ISO 9001- / ISO 13485 -laaduntarkkailukäytännön mukaisesti. Säilyvyysaika on esitetty pakkausmerkinnöissä. Tulkinnasta johtuvien epäselvyyksien kyseessä ollessa englanninkielinen versio on voimassa.

Jos tuotteeseen liittyy vakavia tapahtumia, tulee siitä ottaa yhteyttä valmistajaan

## 15. TESTIN LYHYT KUVAUS

BIOHIT Calprotectin -testi kalprotektiinin analysoimiseen ulosteesta. *Katso tuoteselosteen kohdista 7-9 yksityiskohtaiset testin käyttöohjeet*

### Näytteen uuttaminen

- Tee uuttaminen käyttäen yhtä kohdassa 7.1.1-7.1.2.kuvattua menetelmää

### ELISA (manuaalinen menetelmä)

- Laimenna ulosteutetta suhteessa 1:100 laimennuspuskuriin
- Lisää 100 µL kalibraatoreita, kontrollinäyteitä, 0-näyteliuosta ja näytteitä ELISA-levylle
- Inkuboi levynravistimessa huoneenlämmössä  $40 \pm 5$  minuutin ajan
- Pese kuopat kolme kertaa 300 µL:lla pesupuskuria
- Lisää 100 µL konjugaattiliuosta jokaiseen kuoppaan
- Inkuboi levynravistimessa huoneenlämmössä  $40 \pm 5$  minuutin ajan
- Pese kuopat kolme kertaa 300 µL:lla pesupuskuria
- Lisää 100 µL substraattiliuosta jokaiseen kuoppaan
- Inkuboi peitettyinä 20–30 minuutin ajan
- Vaihtoehtoinen: lisää 100 µL 1 M NaOH:a jokaiseen kuoppaan
- Lue OD-arvot 405 nm:n kohdalla ELISA-lukijan avulla
- Laske tulokset (ng/ml) käyttäen neliparametristä sovituskäyrää
- mg/kg ulosteessa = ng/ml  $\times$  5

Jos sinulla on kysymyksiä, ota yhteyttä sähköpostiosoitteeseen: [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

## INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE

BIOHIT Calprotectin

REF 602260

1. AVSEDD ANVÄNDNING .....	41
2. BAKGRUND .....	41
3. TESTETS PRINCIP .....	42
4. MATERIAL .....	42
4.1. Reagenser som ingår i kitet .....	42
4.2. Material som ingår i kitet .....	44
4.3. Material som krävs men ej medföljer .....	44
5. STABILITET OCH FÖRVARING .....	44
6. REAGENSBEREDNING .....	45
6.1. Bestrukna remsor för mikrotiterplatta .....	45
6.2. Provspädningsbuffert .....	45
6.3. Tvättbuffert .....	45
6.4. Fekalextraktionsbuffert .....	45
6.5. Kalibratorer, blank och kontroller .....	45
6.6. Konjugatlösning .....	45
6.7. Substratlösning .....	46
7. PROVTAGNING OCH BEREDNING .....	46
7.1. Fecesprover .....	46
7.1.1. Extraktion med BIOHIT extraktionsrör .....	47
7.1.2. Extraktion med vägningsmetoden (utan extraktionsenhet) .....	47
8. FÖRSLAG TILL PLATTLAYOUT .....	48
9. TESTFÖRFARANDE .....	48
9.1 Förklaringar till förfarandet .....	48
9.2 ELISA-förfarande .....	49
10. RESULTAT .....	50
10.1 Kvalitetskontrollvärden .....	50
10.2 Resultatberäkning .....	50
10.3 Resultattolkning .....	51
11. FÖRFARANDETS BEGRÄNSNINGAR .....	51
12. KLINISKA PRESTANDA .....	52
13. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER .....	53
13.1 Kasseringshänseenden .....	54
14. GARANTI .....	55
15. FÖRFARANDET I KORTHET .....	56
DATE OF ISSUE .....	114
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÈRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS .....	114
ORDERING INFORMATION .....	116



## 1. AVSEDD ANVÄNDNING

BIOHIT Calprotectin är en kvantitativ enzymkopplad *in vitro*-immunanalys avsedd som stöd för diagnos av organiska sjukdomar i tunn- eller tjocktarm eller magsäck, till exempel inflammatorisk tarmsjukdom, ulcerös kolit eller Crohns sjukdom genom detektion av kalprotektin i avföringsprover. Dessutom används testet för att monitorera sjukdomsaktiviteten och behandlingssvaret hos patienter med ulcerös kolit och Crohns sjukdom. Testet kan utföras antingen manuellt eller automatiskt och är endast avsett att användas av sjukvårdspersonal.

## 2. BAKGRUND

Kalprotektin är ett kalcium- och zinkbindande protein med en molekylärvikt på 36 kDa<sup>1)</sup> som frisätts speciellt från leukocyter i särskilda polymorfonukleära neutrofila granulocyter (PMN) till tarmlumen vid tunntarmsinflammation. Tarmens mikroorganismer stimulerar leukocyter till att migrera till tarmlumen där de frisätter sitt innehåll, inklusive antimikrobiella ämnen som kalprotektin. Detta protein utgör cirka 60 % av det totala proteinet i PMN:ernas cytoplasma<sup>2)</sup> och kan mätas tillförlitligt i fecesprover som har förvarats i upp till sju dagar i rumstemperatur<sup>3)</sup>.

Olika sjukdomar, t.ex. bakteriella infektioner, reumatoid artrit och cancer, medför aktivering av PMN:er och förhöjda kalprotektinvärden i plasma, ryggmärgsvätska, ledvätska, tandköttsvätska, urin eller andra humanmaterial<sup>4)</sup>.

Kalprotektinkoncentrationen i feces korrelerar med antalet PMN:er som migrerar till tarmlumen<sup>5)</sup>, och kan påvisas tillförlitligt även i små (mindre än ett gram) slumpvisa avföringsprover<sup>3,6)</sup>. Organiska sjukdomar i tarmen ger en stark kalprotektinsignal, d.v.s. förhöjningen är ofta fem till flera tusen gånger högre än den övre referensnivån bland friska individer<sup>3,7-9)</sup>, vilket indikerar tunntarmsinflammation. Inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD), t.ex. ulcerös kolit och Crohns sjukdom, kan uppstå från tidig barndom till hög vuxen ålder och diagnosen fördröjs ofta av vaga symtom eller ovilja att utföra endoskopi och biopsi.

Funktionsstörningar som colon irritabile (IBS) orsakar inte förhöjda kalprotektinkoncentrationer, men det gör organiska åkommor i buken, som IBD. Patienter med organiska och funktionsstörningar i buken kan ha liknande symtom, och enbart klinisk undersökning kan därför vara otillräcklig för att ge en specifik diagnos. Ett test för fekalt kalprotektin är en

enkel, icke-invasiv, billig och objektiv metod som kan vara till hjälp med att selektera patienter för vidare undersökning, t.ex. endoskopi. Buksymtom är mycket vanliga bland både barn och vuxna, och ett negativt resultat som uppmätts med BIOHIT Calprotectin kan med stor sannolikhet utesluta inflammatoriska tarmstörningar <sup>7)</sup>.

Läkning av slemhinnan är det optimala målet för IBD-behandling, och ett test för fekalt kalprotectin visar när detta har uppnåtts. Många IBD-patienter i klinisk remission med normala värden för C-reaktivt protein (CRP) har fortfarande en pågående inflammation <sup>10)</sup>, som påvisas av förhöjt fekalt kalprotectin. Sådana patienter löper ökad risk för återfall inom några månader <sup>11)</sup>. Om läkning av slemhinnan kan uppnås, minskar risken för återfall och behovet av omfattande bukkirurgi <sup>12,13)</sup>. En normalisering av kalprotectinvärdet innebär att läkning av slemhinnan har uppnåtts <sup>14)</sup>.

### 3. TESTETS PRINCIP

BIOHIT Calprotectin bygger på beredning av ett fecesextrakt med fekaextraktionsbuffert. Kalprotectinvärdet bestäms genom att testa extraktet i en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) som är specifik för kalprotectin.

I ELISA-analysen inkuberas prover och standarder i separata mikrotiterbrunnar som är bestrukna med monoklonala antikroppar som binder kalprotectin. Efter inkubering och tvättning av brunnarna kan bundet kalprotectin reagera med enzymmärkta, immunoaffinitetsrenade kalprotectin-specifika antikroppar. Efter denna reaktion är mängden bundet enzym i mikrotiterbrunnarna proportionell mot mängden kalprotectin i provet ellerkalibratoren, vilket bestäms genom inkubering med ett substrat för enzymet som ger en färgad produkt. Färgens intensitet bestäms genom absorbans med hjälp av en ELISA-plattläsare och är proportionell mot kalprotectinkoncentrationen i kalibratorerna och proverna. Analysen kalibreras med kalprotectin som renats från leukocytextrakt.

### 4. MATERIAL

#### 4.1. Reagenser som ingår i kitet

**Bestrukna mikrotiterplatta:** 12 remсор, 8 brunnar per remсор, bestrukna med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar som är specifika för kalprotectin. Plattan förvaras i en försluten påse med torkmedel. Kombinera inte remсор/brunnar från olika mikroplattor, även om de skulle ha samma partinummer.

**DILBUF 5x** Provspädningsbuffert (5x konc.) \*\*\*: 1 x 20 ml, 5x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, pH 8 ± 0,2, guldfärgad lösning, flaska med blått lock.

**WASH 20x** Tvättbuffert (20x konc.) \*: 1 x 50 ml, 20x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, för tvättning av mikrotiterbrunnarna, pH 7,8 ± 0,2, ofärgad lösning, flaska med vitt lock.

**FEC EXTRBUF 2.5X** Fekalextraktionsbuffert (2,5x konc.) \*\*: 2 x 90 ml, 2,5x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, pH 8 ± 0,2, ofärgad lösning, flaskor med vita lock.

**CAL 1-5** Kalprotektinkalibratorer och **BLANK** \*\*\*: 6 flaskor med 1 ml guldfärgad lösning som är färdig att använda, flaskor med lock i olika färger:

Blank: Blått lock	0	ng/ml
Kalibrator 1: Grönt lock	7,8	ng/ml
Kalibrator 2: Gult lock	31,3	ng/ml
Kalibrator 3: Rött lock	62,5	ng/ml
Kalibrator 4: Vitt lock	125	ng/ml
Kalibrator 5: Svart lock	500	ng/ml

**CONTROL LOW** **CONTROL HIGH** Kontroller "Låg" och "Hög" \*\*\*: 2 flaskor med 1 ml guldfärgad lösning som är färdig att använda, Ktr Låg: flaska med brunt lock. Ktr Hög: flaska med lila lock.

**CONJ** Konjugatlösning \*\*\*\*: 113 ml alkaliska fosfatasmärkta, immunoafinitetsrenade polyklonala kaninantikroppar mot kalprotektin, rödfärgad lösning som är färdig att använda, 25 ml Dynex-reagensrör med vitt lock.

**SUBS** Substratlösning (pNPP): 13 ml ofärgad till svagt guldfärgad lösning som är färdig att använda, ogenomskinlig flaska med gult lock.

*Obs!* Om ett Dynex-instrument används måste substratet överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

\* Innehåller 0,1 % kation

\*\* Innehåller <0,1 % natriumazid

\*\*\* Innehåller 0,1 % kation och <0,1 % natriumazid

\*\*\*\* Innehåller 0,02 % metylisotiazolon och 0,02 % bromnitrodioxan

## 4.2. Material som ingår i kitet

- 2 inkubationstäckningar
- 1 testprotokoll
- 1 plattlayout

## 4.3. Material som krävs men ej medföljer

- Destillerat/avjoniserat vatten
- Extraktionsinstrument (se avsnitt 7.1.1 och 7.1.2)
- Brytbara ympöglor för engångsbruk (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Känslig digitalvåg (40 – 150 mg) (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Polystyrenrör med skruvlock för engångsbruk, 5 ml (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Vortexmixer (med en röradapter) eller shaker upp till 1000 rpm när den används för att extrahera ett avföringsprov i avsnitt 7.1.2
- Engångsrör för spädning av prover: Eppendorf-rör eller liknande (om analysen utförs manuellt)
- Pipetter för överföring av volymer mellan 10 – 1 000 µl (om analysen utförs manuellt)
- Repeterpipett eller flerkanalpipett, 100 µl (om analysen utförs manuellt)
- Tvättinstrument för mikroplattans brunnar eller flerkanalpipett, 300 µl (om analysen utförs manuellt)
- Plattskak (500 – 700 r/min) (om analysen utförs manuellt)
- Timer (om analysen utförs manuellt)
- Mikroplattläsare, filter 405 nm (om analysen utförs manuellt)
- 1M NaOH (stopplösning; valfritt)

## 5. STABILITET OCH FÖRVARING

Vid förvaring i oöppnat skick vid 2 – 8 °C är kitets reagenser stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

Öppnade plattor, reagenser och koncentrerade buffertar är stabila i upp till tre månader vid förvaring vid 2 – 8 °C.

Arbetslösningar (1x) med tvättbuffert, provspädningsbuffert och fekalextraktionsbuffert som bereds i rena kärl kan förvaras i upp till en månad vid 2 – 8 °C.

Undvik exponering för hög temperatur och direkt solljus.

## **6. REAGENSBEREDNING**

Låt alla reagenser, prover och kontroller anta rumstemperatur (18 – 25 °C) innan testet körs.

### **6.1. Bestrukna remsor för mikrotiterplatta**

Plattremorna som är färdiga att använda är bestrukna med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar som är specifika för kalprotektin. Oanvända remsor ska tas bort från ramen och genast återförslutas i foliepåsen tillsammans med det medföljande torkmedlet. Förvara vid 2 – 8 °C.

### **6.2. Provspädningsbuffert**

Späd den 5x-koncentrerade provspädningsbufferten genom att tillsätta 1 del (20 ml) till 4 delar (80 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 100 ml. Blanda väl. Förvara den spädda provspädningsbufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.

Obs! Om Dynex DS2 eller DSX ELISA-automat används måste provspädningsbufferten överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

### **6.3. Tvättbuffert**

Späd den 20x-koncentrerade tvättbufferten genom att tillsätta 1 del (50 ml) till 19 delar (950 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 1 000 ml. Blanda väl. Förvara den spädda tvättbufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.

### **6.4. Fekalextraktionsbuffert**

Späd den 2,5x-koncentrerade fekalextraktionsbufferten genom att tillsätta 1 del (90 ml) till 1,5 delar (135 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 225 ml. Blanda väl. Förvara den spädda bufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.

### **6.5. Kalibratorer, blank och kontroller**

Flaskorna som är märkta med blank eller kalibrator samt kontrollerna innehåller 1 ml lösning vardera som är färdig att använda. Kalprotektin-koncentrationen är tryckt på etiketten på varje flaska. Flaskorna passar direkt i Dynex DS2 och DSX ELISA-automater.

### **6.6. Konjugatlösning**

Röret innehåller 13 ml alkaliska fosfatas-märkta (ALP), immunoaffinitetsrenade polyklonala kaninantikroppar mot kalprotektin i en buffert med stabiliserare, konserveringsmedel och ett inert rött färgämne. Lösningen

är färdig att använda. Röret passar direkt i Dynex DS2 och DSX ELISA-automater.

### **6.7. Substratlösning**

Flaskan innehåller 13 ml p-nitrofenylfosfatlösning (pNPP). Lösningen är färdig att använda och måste förvaras i den ogenomskinliga originalflaskan.

Obs! Om Dynex DS2 eller DSX ELISA-automat används måste enzym-substratlösningen överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

## **7. PROVTAGNING OCH BEREDNING**

BIOHIT Calprotectin har utvecklats och validerats för fecesprover.

### **7.1. Fecesprover**

Eftersom kalprotektin är mycket stabilt i avföring kan patienten ta små fecesprover i hemmet. Ta 1 – 5 g (cirka en tesked), placera provet i en lämplig, ren behållare och leverera det till laboratoriet snarast möjligt, dock senast inom 4 dagar. Om provet läggs i en behållare som är godkänd för transport kan det skickas med vanlig post; kylförvaring är inte nödvändig. Undvik exponering för temperaturer över 30 °C.

Prover kan också frysförvaras vid -20 °C eller lägre i högst 1,5 år tills de levereras eller postas. Frysta prover måste tinas och ekvibreras till rumstemperatur innan de extraheras och testas. Observera att frysning av fecesprover i vissa fall kan medföra förhöjda kalprotektinvärden, sannolikt på grund av frisättning från granulocyter.

Obs! Innan extraktionen påbörjas ska avföringsprovet blandas väl med t.ex. en spatel innan en mindre mängd tas ut för extraktion.

För extraktionen rekommenderar vi BIOHIT extraktionsrör eller den andra metod som beskrivs nedan (avsnitt 7.1.1 och 7.1.2). Utför extraktionen enligt bipacksedeln som medföljer den valda extraktionsenheten/-metoden. Andra metoder och enheter som validerats av kunden kan användas.

### 7.1.1. Extraktion med BIOHIT extraktionsrör

Bruksanvisning: se bipacksedeln för produktref. 602270.



### 7.1.2. Extraktion med vägningsmetoden (utan extraktionsenhet)

1. Väg (tara) ett tomt skruvlocksrör med en ympögla.
2. Ta ut cirka 100 mg (mellan 40 och 120 mg) feces med ympöglan och placera det i skruvlocksröret. Undvik att ta med fast, ospjälkat material som fibrer och frön.
3. Väg röret och ögla med feces för att beräkna nettovikten för feces.
4. Bryt eller skär av den övre halvan av ympöglaans skaft och lämna den nedre halvan inuti röret.
5. Tillsätt extraktionsbuffert till förhållandet vikt: volym 1:50, t.ex. 4,9 ml buffert till 100 mg feces. Sätt på korken på röret.
6. Blanda kraftigt i 30 sekunder med en vortexblandare.
7. Fortsätt att blanda på en skak (cirka 1 000 r/min) i 30 ±5 minuter med ögla inuti röret som agitator.
8. Låt röret stå ett par minuter på bänken så att partiklarna sjunker och pipettera sedan försiktigt från rörets öppning. Centrifugering är inte nödvändig, men en kort centrifugering kan utföras om en partikelfri lösning behövs.
9. Extraktet, som utgör en 1:50-spädning (vikt:volym) av avföringsprovet, är nu klart för spädning och testning.
10. Om provet ska förvaras ska cirka 0,5 ml överföras till ett nytt rör. Extrakt kan förvaras vid 2 – 8 °C i minst 5 dagar eller nedfryst under -20 °C i upp till 12 månader.

## 8. FÖRSLAG TILL PLATTLAYOUT

	1	2	3	4	etc.	
A	Kalibrator 5 500 ng/ml	Kalibrator 500 ng/ml	Prov 1	Prov 1		
B	Kalibrator 4 125 ng/ml	Kalibrator 4 125 ng/ml	Prov 2	Prov 2		
C	Kalibrator 3 62,5 ng/ml	Kalibrator 3 62,5 ng/ml	Prov 3	Prov 3		
D	Kalibrator 2 31,3 ng/ml	Kalibrator 2 31,3 ng/ml	Prov 4	Prov 4		
E	Kalibrator 1 7,8 ng/ml	Kalibrator 1 7,8 ng/ml	Prov 5	Prov 5		
F	Blank 0 ng/ml	Blank 0 ng/ml	Prov 6	Prov 6		
G	Kontroll "Låg"	Kontroll "Låg"	Prov 7	Prov 7		
H	Kontroll "Hög"	Kontroll "Hög"	Prov 8	Prov 8		

Förslag till layout för ELISA-platta med kalibratorer, kontroller och prover för manuellt förfarande. Duplicera brunnarna enligt rekommendationerna för att öka resultatens tillförlitlighet. En full platta rymmer 40 prover.

## 9. TESTFÖRFARANDE

Följande förfarande gäller manuell testning. Validerade protokoll för Dynex DS2 och DSX ELISA-automater är tillgängliga på begäran. Observera att flaskorna med kalibrator, blank och positiv kontroll samt konjugatröret passar direkt i DS2 eller DSX ELISA-automater. Andra automatiska ELISA-instrument kan också användas, men de måste valideras av kunden.

### 9.1 Förklaringar till förfarandet

- Beredning: Läs bruksanvisningen noga innan analysen utförs. Resultatets tillförlitlighet beror av att testprotokollet följs exakt enligt anvisningarna. Innan analysen påbörjas ska en plattlayout för alla blanka, kalibratorer, kontroller och prover fastställas, t.ex. med det blad som ingår i kitet. Välj nödvändigt antal mikrotiterremсор. Oanvända remсор ska återförslutas i foliepåsen och förvaras enligt anvisningarna i avsnitt 6.1.
- En 1:100-spädning av fecesextrakt rekommenderas. Denna spädning ger provresultat på mellan 25 mg/kg (LoQ) och 2 500 mg/kg i feces.



Extrakt med högre kalprotektinvärde kan spädas mer ( $> 1:100$ ) och omtestas om ett värde krävs. Extrakt med låga kalprotektinvärden kan spädas mindre ( $1:50$ ). Den justerade spädningsfaktorn måste beaktas vid omvandling från ng/ml till mg/kg (se avsnitt 10 nedan).

- Utför alla steg i analysen i den ordning de anges och utan väsentliga dröjsmål mellan stegen.
- Använd en ren pipettspets till dispensering av vardera standard, kontroll och prov.
- För att få de mest tillförlitliga resultaten ska blanka, kalibratorer, kontroller och patientprover alltid köras i duplikat.
- Ekvilibrera alla prover och reagenser i kitet till rumstemperatur ( $18 - 25$  °C) innan testet påbörjas.

## 9.2 ELISA-förfarande

1. Späd fecesextraktprover  $1:100$  (t.ex.  $10 \mu\text{l}$  prov +  $990 \mu\text{l}$  provspädningsbuffert) och vortexblanda väl.
2. Tillsätt  $100 \mu\text{l}$  vardera av blank, kalibrator, kontroll och spätt prov i duplicerade brunnar; se rekommenderad plattlayout i avsnitt 8.
3. Täck plattan med inkubationstäckning och inkubera i rumstemperatur i  $40 \pm 5$  min) på en horisontal plattskak (cirka  $500 - 700$  r/min).
4. Avlägsna vätskan mot slutet av inkuberingstiden och tvätta brunnarna genom att tillsätta  $300 \mu\text{l}$  tvättbuffert i varje brunn. Avlägsna så mycket vätska som möjligt och upprepa tills sammanlagt tre tvättar har utförts. Om en plattvätt används, kontrollera att aspirations- och påfyllningsslangarna inte är tilltäppta för att säkerställa effektiv tvätt av alla brunnar. Vänd efter sista tvätten plattan upp och ned och knacka brunnsöppningarna ordentligt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande buffert.
5. Blanda varsamt innehållet i konjugatflaskan innan det används (skaka inte). Tillsätt  $100 \mu\text{l}$  konjugat i varje brunn, helst med en repeter- eller flerkanalspipett.
6. Täck plattan med inkubationstäckning och inkubera i rumstemperatur i  $40 \pm 5$  min) på en horisontal plattskak (cirka  $500 - 700$  r/min).
7. Upprepa tvättstegen enligt anvisningarna ovan tre gånger med  $300 \mu\text{l}$  tvättlösning per brunn.
8. Tillsätt  $100 \mu\text{l}$  substratlösning i varje brunn, helst med en repeter- eller flerkanalspipett.
9. Inkubera plattan i rumstemperatur (utan att skaka den) i  $20 - 30$  minuter skyddat från solljus.
10. Valfritt: Tillsätt  $100 \mu\text{l}$   $1\text{M}$  NaOH stopplösning i varje brunn om en be-

stämd inkuberings-tid krävs.

11. Läs av värdena för optisk densitet (OD) vid 405 nm med en ELISA-läsare. Om plattläsaren har funktionen för det, kan plattan skakas kort (2-3 sekunder) före avläsning.

## 10. RESULTAT

### 10.1 Kvalitetskontrollvärden

- En ny standardkurva måste inkluderas i varje körning.
- Positiva kontroller bör inkluderas i varje körning. Kontrollernas värden ska ligga inom de gränser som är tryckta på flasketiketterna.
- Som riktlinje bör OD-värdet för Kalibrator 5 (500 ng/ml) vara  $\geq 1,6$  och OD-värdet för Blank (0 ng/ml) bör vara  $\leq 0,25$ . En representativ kalibratorkurva visas nedan i bild 1.

### 10.2 Resultatberäkning

Beräkning av kalprotektinkoncentrationen i fecesprover från patient:

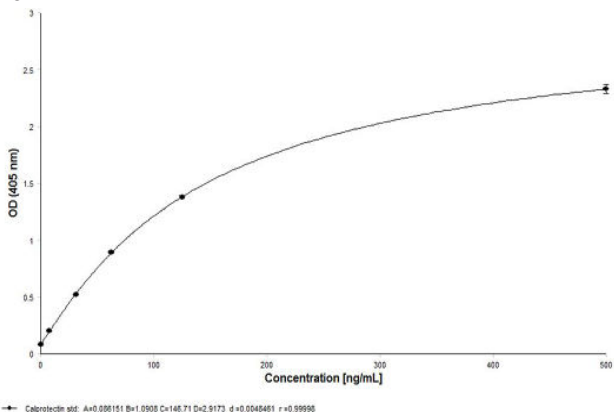
1. Beräkna OD-medelvärdet för alla duplikatbrunnar (blanka, kalibratorer och prover).
2. Plotta värdet för blank och varje kalibrator och koncentration (ng/ml) på x-axeln mot dess OD-medelvärde på y-axeln för att få en standardkurva. **En kurvanpassningsfunktion med fyra parametrar rekommenderas** (se bild 1 nedan). Om en logaritmisk x-axel krävs måste ett värde på 0,001 ng/ml användas för standard A (0 ng/ml).
3. Bestäm med hjälp av kalibreringskurvan kalprotektinkoncentrationen i de spädda proverna (ng/ml) baserat på deras OD-värden.
4. **Multiplitera kalprotektinkoncentrationen (ng/ml) i de spädda fecesextrakten med 5 för att omvandla till mg/kg kalprotektin i det ursprungliga avföringsprovet.**

Denna faktor korrigerar för den totala spädningsgraden på 1:5000 (1:50 under extraktionen och den påföljande 1:100-spädningsgraden av extrakten) och omvandlar värdet från ng/ml till mg/kg.

*Exempel: Om ett spätt extraktprov har ett värde på 100 ng/ml var koncentrationen i det ursprungliga avföringsprovet  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

**Obs!** Om extrakt har späts mer (eller mindre) än det rekommenderade 1:100 måste den ytterligare spädningsfaktorn tas med i beräkningen.

Bild 1: En representativ kalibratorkurva med 4-parameters kurvanpassning.



### 10.3 Resultattolkning

Följande kalprotektinvärden har rapporterats i publicerad litteratur<sup>3, 25</sup>:

Normalvärde	5 – 50 mg/kg
Positivt värde	> 50 mg/kg
Medelvärde hos patienter med symtomatiska kolorektala cancerformer	350 mg/kg
Aktiv, symtomatisk inflammatorisk tarmsjukdom	200 – 40 000 mg/kg

Observera att diagnos inte ska ställas baserat på ett enskilt testresultat. I diagnosen måste även klinisk anamnes och symtom beaktas.

## 11. FÖRFARANDETS BEGRÄNSNINGAR

Diagnos ska inte ställas baserat på ett enskilt testresultat.

## 12. KLINISKA PRESTANDA

Obs! Alla utformningsverifierande studier utfördes genom manuella test på prover av fecesextrakt (spädda 1:100) med det ELISA-förfarande som beskrivs i avsnitt 9.

### Precision i interanalys och intraanalys från fecesextrakt:

Interanalysprecision, fecesextrakt*		Intraanalysprecision, fecesextrakt**	
Koncentration i feces (mg/kg)	% CV	Koncentration i feces (mg/kg)	% CV
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\*Medelresultat från tre olika laboratorier som vardera testade två olika kitpartier: 6 prover testades sammanlagt 10 gånger under 5 dagar

\*\* Medelresultat från tre olika laboratorier som vardera testade två olika kitpartier: 6 prover testades med 10 replikat i en körning

### Påvisning:

Feces: 85 – 105 %; testat med fekalextrakt spetsat med renat kalprotektin på fem olika nivåer.

### Kvantifieringsgräns:

5 ng/ml; testad med fecesextrakt och renat kalprotektin. Proverna analyserades fem gånger under fem dagar. CV-medelvärdet för de olika proverna och bestämningarna på den här nivån var 12 %.

### Detektionsgräns:

< 5 ng/ml, beräknad som medelvärde (provspädningsbuffert; n= 32) + 5x SD.

### Interferens

Ingen observerad interferens på ELISA från vanligt förekommande läkemedel: Prednisolon, Imurel, Salazopyrin och Ciprofloxacine.

### Extraktionsprecision:

Två fecesprover extraherades tio gånger vardera enligt det förfarande som beskrivs i avsnitt 7.1.2, och extrakten analyserades i ELISA. Medelresultat från tre olika laboratorier och ett kitparti:

Prov	Koncentration (mg/kg)	% CV
Låg	130	8.7
Hög	1357	8.8

### Linearitet, fekalextrakt

Fekalextrakt (n=10) späddes 1:100 – 1:1000 och analyserades i ELISA. Medelresultat:

Spädning	% av 1:100-spädning
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Observera att provvariationen i linearitet har beaktats.

## 13. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- I enlighet med artikel 1 stycke 2b i Europaparlamentets och Rådets direktiv 98/79/EG, är användningen av medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik av tillverkaren avsedd att säkerställa produktens lämplighet, prestanda och säkerhet. Testförfarandet, informationen samt de varningar och försiktighetsåtgärder som anges i bruksanvisningen måste därför följas noga. Användning av testkit med analyserare och liknande utrustning måste valideras. Ändring av utformning, sammansättning och testförfarande samt användning i kombination med andra produkter som inte godkänts av tillverkaren tillåts inte; användaren ansvarar själv för sådana ändringar. Tillverkaren ansvarar inte för falska resultat och incidenter av denna anledning. Tillverkaren ansvarar inte för eventuella resultat från visuell analys av patientproverna.
- Endast för *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- Alla komponenter av mänskligt ursprung som använts i tillverkningen av dessa reagenser har testats för anti-HIV-antikroppar, anti-HCV-antikroppar och hepatit B-antigen (Bag) och har visats vara icke-reaktiva. Allt material ska dock betraktas och hanteras som potentiellt smittförande.

- Blanda inte reagenser och remsor från olika tillverkningspartier.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagenser i det här testkitet.
- Använd inte reagenser efter det utgångsdatum som anges på etiketten eller senare än en månad efter beredning av koncentrerade reagenser till arbetslösningar.
- Använd endast rena pipettspetsar, dispenserare och labbutrustning.
- Förebygg korskontaminering genom att inte blanda ihop skruvlocken till reagensflaskorna.
- Dra åt flasklocken ordentligt direkt efter användning för att undvika avdunstning och mikrobkontaminering.
- Efter att ha öppnats och sedan förvarats ska konjugat-, kalibrator- och kontrollflaskor kontrolleras för mikrobkontaminering innan de används.
- Undvik korskontaminering och falskt förhöjda resultat genom att pipettera standarder, kalibratorer och fekalextraktprover och dispensera konjugat och substrat korrekt till botten i mikroplattans brunnar utan stänk.
- Vissa reagenser innehåller natriumazid med en halt under 0,1 % (v/v) och/eller 0,1 % kation.
- Förvara substratlösningen i sin ogenomskinliga originalflaska; lösningen ska vara ofärgad till svagt gul. Blanda varsamt före användning.
- BIOHIT Calprotectin är avsedd för användning av utbildad personal med kunskaper i god laboratoriepraxis.

### **13.1 Kasseringshänseenden**

Rester av kemikalier och beredningar betraktas allmänt som riskavfall. Kassering av sådant avfall regleras i nationella och lokala förordningar och bestämmelser. Kontakta lokala myndigheter eller avfallshanteringsföretag som kan ge råd om hur riskavfall ska kasseras.

#### **14. GARANTI**

Biohit ska avhjälpa alla defekter som påträffas i någon Produkt (den "Defekta produkten") som härrör från olämpliga material eller försumligt utförande och som förhindrar Produkternas mekaniska funktion eller avsedda användning, inklusive men inte begränsat till de funktioner som anges i Biohits Produktspecifikationer. EVENTUELL GARANTI BETRÄKTAS DOCK SOM OGILTIG OM FELET VISAR SIG HA UPPSTÅTT TILL FÖLJD AV FELAKTIG HANTERING ELLER ANVÄNDNING, SKADA TILL FÖLJD AV OLYCKSHÄNDELSE, FELAKTIG FÖRVARING ELLER ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA FÖR BRUK SOM LIGGER UTANFÖR DERAS ANGIVNA BEGRÄNSNINGAR ELLER SPECIFIKATIONER I STRID MOT DE ANVISNINGAR SOM LÄMNAS I INSTRUKTIONSMANUALEN.

Garantiperioden framgår av Produkternas instruktionsmanual och börjar gälla från det datum då den relevanta Produkten skickas av Biohit. Detta diagnostiska kit från Biohit har tillverkats i enlighet med kvalitetsledningsprotokollen ISO 9001/ISO 13485. I fall av tolkningsdispyter är det den engelska texten som gäller.

I fall någon olycka sker med anknytning till produkten, vänligen kontakta tillverkaren.

## 15. FÖRFARANDET I KORTHET

BIOHIT Calprotectin för analys av kalprotektin i feces.

Se avsnitt 7 – 9 i bipacksedeln för en fullständig beskrivning av de praktiska stegen.

### Extraktion

Utför extraktionen enligt en av de metoder som beskrivs i avsnitt 7.1.1 – 7.1.2

### ELISA (manuellt förfarande)

- Späd fekalextrakt 1:100 i provspädningsbuffert
- Tillsätt 100 µL kalibratorer, kontroller, blanka och prover till ELISA-plattan
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40 ±5 min)
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µL tvättbuffert
- Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40 ±5 min)
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µL tvättbuffert
- Tillsätt 100 µL substratlösning till varje brunn
- Inkubera övertäckt i 20 – 30 min
- Valfritt: tillsätt 100 µL 1M NaOH till varje brunn
- Läs av OD-värdena vid 405 nm med en ELISA-läsare
- Beräkna resultaten (ng/ml) med en 4-parameters kurvanpassning
- mg/kg i feces = ng/ml × 5

Om du har frågor, kontakta [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)



1. APPLICATION.....	58
2. ANTÉCÉDENTS .....	58
3. PRINCIPE DU TEST.....	59
4. MATÉRIEL.....	60
4.1. Réactifs fournis avec le kit .....	60
4.2. Matériel fourni avec le kit .....	61
4.3. Matériel nécessaire non fourni.....	61
5. STABILITÉ ET STOCKAGE.....	62
6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS .....	62
6.1. Bandes de plaques microtitres coatées .....	62
6.2. Tampon de dilution d'échantillon .....	62
6.3. Tampon de lavage.....	63
6.4. Tampon d'extraction de selles.....	63
6.5. Calibrateurs, témoins et contrôles.....	63
6.6. Solution de conjugué.....	63
6.7. Solution substrat .....	63
7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS .....	64
7.1. Échantillons de selles .....	64
7.1.1. Extraction à l'aide de tubes BIOHIT.....	64
7.1.2. Extraction à l'aide de la méthode de pesée (sans dispositif d'extraction).....	65
8. PLAN DE PLAQUE SUGGÉRÉ .....	66
9. PROCÉDURE DE TEST.....	66
9.1 Remarques concernant la procédure à suivre .....	66
9.2 Procédure ELISA.....	67
10. RÉSULTATS .....	68
10.1 Valeurs de contrôle de qualité.....	68
10.2 Calcul des résultats .....	68
10.3 Interprétation des résultats.....	70
11. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE.....	70
12. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES .....	70
13. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS .....	72
13.1 Considérations relatives à l'élimination .....	73
14. GARANTIE .....	74
15. RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE À SUIVRE .....	75
DATE OF ISSUE .....	114
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / REFERÈNCIAS.....	114
ORDERING INFORMATION.....	116

## 1. APPLICATION

Le test de la calprotectine fécale BIOHIT est un dosage immuno-enzymatique quantitatif *in vitro* facilitant le diagnostic d'une maladie organique de l'intestin grêle, du gros intestin ou de l'estomac, telle qu'une maladie intestinale inflammatoire, une rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn, en détectant la calprotectine dans les échantillons de selles.

Par ailleurs, le test est utilisé pour la surveillance de l'activité de la maladie et la réponse au traitement chez les patients souffrant d'une rectocolite hémorragique ou de la maladie de Crohn. Le test peut être effectué manuellement ou automatiquement et est destiné à être utilisé uniquement par des professionnels de la santé.

## 2. ANTÉCÉDENTS

La calprotectine est une protéine de liaison au calcium et au zinc de 36 kD<sup>1)</sup> notamment libérée par les leucocytes, et tout particulièrement les granulocytes neutrophiles (PNN), dans la lumière du tube digestif en cas d'inflammation de la muqueuse intestinale. Les micro-organismes de l'intestin stimulent la migration des leucocytes dans la lumière du tube digestif, où ils libèrent leurs contenus, y compris des substances antimicrobiennes comme la calprotectine. Cette protéine constitue environ 60 % de toutes les protéines présentes dans le cytoplasme des PNN<sup>2)</sup> et sa quantité peut être estimée de façon fiable dans des échantillons de selles stockés pendant un maximum de sept jours à température ambiante<sup>3)</sup>.

Plusieurs types de maladie, comme les infections bactériennes, l'arthrite rhumatoïdale et le cancer, déclenchent l'activation des PNN et augmentent les niveaux de calprotectine dans le plasma, le liquide cérébro-spinal, le liquide synovial, le liquide crémieux et l'urine, entre autres matériels humains<sup>4)</sup>.

La concentration de calprotectine dans les selles est corrélée au nombre de PNN qui migrent dans la lumière du tube digestif<sup>5)</sup>, et peut être détectée de façon fiable, même dans des échantillons de faibles dimensions (moins d'un gramme) de selles prélevés de façon aléatoire<sup>3,6)</sup>. Les maladies organiques de l'intestin se traduisent par d'importantes quantités de calprotectine : les augmentations sont généralement de cinq à plusieurs milliers de fois supérieures à la valeur de référence des individus sains<sup>3,7-9)</sup>, ce qui indique une inflammation intestinale. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, peuvent apparaître dès la plus tendre enfance jusqu'à l'âge adulte le plus avancé. Leur diagnostic est souvent retardé

en raison de symptômes vagues ou d'une réticence à pratiquer l'endoscopie et la biopsie.

Des troubles fonctionnels comme le côlon irritable ne provoquent pas d'augmentation de la concentration de calprotectine dans les selles, mais des troubles abdominaux organiques semblables à ceux provoqués par les MICI. Les patients atteints de troubles abdominaux organiques et fonctionnels peuvent montrer des symptômes similaires, et un examen clinique peut ne pas être suffisant, à lui seul, pour établir un diagnostic spécifique. Le test de la calprotectine fécale est une méthode simple, non invasive, peu coûteuse et objective pouvant aider à sélectionner les patients sur lesquels pratiquer un examen supplémentaire, comme une endoscopie. Les symptômes abdominaux sont très fréquents chez les enfants et les adultes, et un résultat négatif mesuré par le kit BIOHIT Calprotectin permet d'écartier avec une forte probabilité le risque de troubles intestinaux inflammatoires <sup>7)</sup>.

La cicatrisation de la muqueuse est l'objectif ultime de tout traitement contre les MICI, et le test de la calprotectine fécale permet de savoir quand celui-ci est atteint. Beaucoup de patients atteints de MICI en rémission clinique avec des niveaux de protéine C réactive (CRP) normaux souffrent toujours d'inflammation <sup>10)</sup>, reflétée par une augmentation de la calprotectine fécale. Ces patients augmentent le risque de rechute au cours des prochains mois <sup>11)</sup>. Si la cicatrisation des muqueuses peut être atteinte, le risque de rechute et les besoins de chirurgie abdominale majeure diminueront <sup>12,13)</sup>. Une normalisation des niveaux de calprotectine signifie que la cicatrisation des muqueuses s'est produite <sup>14)</sup>.

### **3. PRINCIPE DU TEST**

Le kit BIOHIT Calprotectin repose sur la préparation d'un échantillon de selles à l'aide d'un tampon d'extraction de selles. Le niveau de calprotectine est déterminé en soumettant l'échantillon à un test immuno-enzymatique (ELISA) spécifique de la calprotectine.

Dans l'ELISA, des échantillons et calibraterus sont incubés dans des puits de plaques microtitres séparés, coatés avec des anticorps monoclonaux qui fixent la calprotectine. Après incubation et lavage des puits, la calprotectine fixée peut réagir avec des anticorps spécifiques de la calprotectine purifiés par immuno-affinité, marqués avec une enzyme. Après cette réaction, la quantité d'enzyme fixée dans les puits de la

plaque microtitre est proportionnelle à la quantité de calprotectine dans l'échantillon ou l'étalon. Elle est déterminée par incubation de l'enzyme avec un substrat pour donner un produit coloré. L'intensité de la couleur est déterminée par absorbance à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA et est proportionnelle à la concentration de calprotectine dans les calibrateurs et échantillons. L'essai est calibré par l'utilisation de calprotectine purifiée à partir d'un extrait leucocytaire.

#### 4. MATÉRIEL

##### 4.1. Réactifs fournis avec le kit

**Plaque microtitre coatée** : 12 bandes, 8 puits par bande, coatées avec des anticorps de souris monoclonaux purifiés par immuno-affinité, spécifiques de la calprotectine. La plaque est conservée dans un sachet étanche contenant un agent déshydratant. Ne pas combiner les barrettes/puits de différentes microplaques, même si elles auraient le même numéro de lot.

**DILBUF 5x** Tampon de dilution d'échantillon (5 x conc.) \*\*\*: 1 x 20 ml, concentré 5 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée ; pH 8,0 ± 0,2, solution de couleur jaune, bouteille à bouchon bleu.

**WASH 20x** Tampon de lavage (20 x conc.) \*: 1 x 50 ml, concentré 20 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée, pour laver les puits des plaques microtitres ; pH 7,8 ± 0,2, solution transparente, bouteille à bouchon blanc.

**FEC EXTRBUF 2.5X** Tampon d'extraction de selles (2,5 x conc.) \*\*: 2 x 90 ml, concentré 2,5 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée ; pH 8,0 ± 0,2, solution transparente, bouteilles à bouchon blanc.

**CAL 1-5** Calibrateurs de calprotectine et **BLANK** \*\*\*: 6 flacons de 1,0 ml, prêts à l'utilisation ; solution de couleur jaune, flacons avec des bouchons de couleurs différentes :

Blank : bouchon bleu	0	ng/ml
Calibrateur 1 : bouchon vert	7.8	ng/ml
Calibrateur 2 : bouchon jaune	31.3	ng/ml
Calibrateur 3 : bouchon rouge	62.5	ng/ml
Calibrateur 4 : bouchon blanc	125	ng/ml
Calibrateur 5 : bouchon noir	500	ng/ml

**CONTROL LOW CONTROL HIGH** Contrôles « Faible » et « Fort » \*\*\*:

2 flacons de 1,0 ml, prêts à l'utilisation ; solution de couleur jaune ; Ctr. faible : flacon avec un bouchon marron ; Ctr. fort : flacon avec un bouchon mauve.

**CONJ** **Solution de conjugué \*\*\*\***: 113 ml anticorps de lapin polyclonaux purifiés par immuno-affinité, marqués avec une phosphatase alcaline contre la calprotectine, prêts à l'usage ; solution de couleur rouge, 25 ml tube de réactif Dynex à bouchon blanc.

**SUBS** **Solution substrat (pNPP)**: 113 ml, prêt à l'usage ; solution transparente à légèrement jaune, bouteille opaque à bouchon jaune.

*Remarque* : si l'on utilise un instrument Dynex, le substrat doit être transféré dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test.

\* Contient 0,1 % de Kathon

\*\* Contient < 0,1 % d'azoture de sodium

\*\*\* Contient 0,1 % de Kathon et < 0,1 % d'azoture de sodium

\*\*\*\* Contient 0,02 % de méthylisothiazolinone et 0,02 % de bromonitrodioxane

#### 4.2. Matériel fourni avec le kit

- 2 films d'incubation
- 1 manuel d'instructions
- 1 plan de plaque

#### 4.3. Matériel nécessaire non fourni

Eau distillée/désionisée

- Dispositifs d'extraction (voir points 7.1.1 et 7.1.2)
- Boucles d'inoculation jetables, cassables (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)
- Balance numérique de précision (40 – 150 mg) (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)
- Tubes à bouchon vissable en polystyrène jetables, 5 ml (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)
- Mélangeur vortex (avec un adaptateur de tube) ou un agitateur jusqu'à 1000 tr/min lorsqu'il est utilisé pour extraire un échantillon de selles dans la section 7.1.2
- Tubes jetables pour la dilution des échantillons : tubes Eppendorf ou similaires (si l'essai est réalisé manuellement)

- Pipettes permettant de distribuer des volumes 10 – 1 000 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Pipette à répétition ou multi-canaux, 100 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Pipette de lavage de puits de plaque microtitre ou multi-canaux, 300 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Vibreur agitateur de plaques (500 – 700 tr/min) (si l'essai est réalisé manuellement)
- Minuterie (si l'essai est réalisé manuellement)
- Lecteur de plaques microtitres, filtre 405 nm (si l'essai est réalisé manuellement)
- 1M NaOH (solution d'arrêt ; option)

## 5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Lorsqu'ils sont non ouverts et conservés à 2 – 8 °C, les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

Une fois ouverts, les plaques, réactifs et tampons concentrés sont stables pendant trois mois s'ils sont conservés à 2 – 8 °C.

Si elles sont préparées dans des récipients propres, les solutions de travail (1 x) de tampon de lavage, tampon de dilution d'échantillon et tampon d'extraction de selles peuvent être conservées à 2 – 8°C pendant un mois.

Éviter toute exposition aux hautes températures et à la lumière directe du soleil.

## 6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs, échantillons et contrôles doivent être portés à température ambiante (18 – 25 °C) avant de commencer la série de tests.

### 6.1. Bandes de plaques microtitres coatées

Les bandes de plaques prêtes à l'usage sont coatées avec des anticorps de souris monoclonaux purifiés par immuno-affinité, spécifiques de la calprotectine. Les bandes non utilisées doivent être retirées de la plaque et immédiatement replacées dans le sachet étanche en papier d'aluminium avec l'agent déshydratant fourni. Stocker à 2 – 8 °C.

### 6.2. Tampon de dilution d'échantillon

Diluer le tampon de dilution d'échantillon concentré 5 x en ajoutant 1 partie (20 ml) à 4 parties (80 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 100 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon de dilution d'échantillon dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C. Remarque : si l'on utilise un système automatisé Dynex DS2 ou DSX, le tampon de dilution d'échantillon doit être transféré dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test.

### **6.3. Tampon de lavage**

Diluer le tampon de lavage concentré 20 x en ajoutant 1 partie (50 ml) à 19 parties (950 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 1 000 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon de lavage dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C.

### **6.4. Tampon d'extraction de selles**

Diluer le tampon d'extraction de selles concentré 2,5 x en ajoutant 1 partie (90 ml) à 1,5 partie (135 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 225 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C.

### **6.5. Calibrateurs, témoins et contrôles**

Les flacons étiquetés comme témoins, calibrateurs et contrôles contiennent chacun 1,0 ml de solution prête à l'usage. La concentration de calprotectine est imprimée sur l'étiquette de chaque flacon. Les flacons peuvent être placés directement dans les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX.

### **6.6. Solution de conjugué**

Le tube contient 13 ml d'anticorps de lapin purifiés par immuno-affinité, marqués avec une phosphatase alcaline (ALP) contre la calprotectine dans un tampon avec des stabilisateurs, conservateurs et un colorant rouge inerte. La solution est prête à l'usage. Le tube peut être placé directement dans les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX.

### **6.7. Solution substrat**

La bouteille contient 13 ml de solution de p-nitrophénylphosphate (pNPP). La solution est prête à l'usage et doit être conservée dans sa bouteille opaque originale.

*Remarque* : Si l'on utilise un automate ELISA Dynex DS2 ou DSX, la so-

lution de substrat enzymatique doit être transférée dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test.

## **7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**

Le kit BIOHIT Calprotectin a été développé et validé pour des échantillons de selles.

### **7.1. Échantillons de selles**

Dans la mesure où la calprotectine est très stable dans les selles, les patients peuvent prélever de petits échantillons de selles chez eux. Effectuer un prélèvement de 1 – 5 g (environ une petite cuiller), le placer dans un récipient propre et le remettre au laboratoire le plus tôt possible, dans un délai maximum de quatre jours. S'il est placé dans un récipient adéquat pour son transport, il peut être envoyé par courrier ordinaire (aucune réfrigération n'est nécessaire). L'exposition à des températures de plus de 30 °C doit être évitée.

Les échantillons peuvent également être stockés congelés à -20 °C ou moins jusqu'à 1,5 ans, jusqu'à leur remise ou envoi. Les échantillons congelés doivent être décongelés et portés à température ambiante avant l'extraction et le test. Il faut savoir que dans certains cas, les échantillons de selles congelés peuvent avoir des niveaux de calprotectine supérieurs, probablement dus à sa libération par les granulocytes.

Remarque : Avant de commencer l'extraction, l'échantillon de selles doit être bien homogénéisé, en utilisant par exemple une spatule avant le prélèvement d'une faible quantité.

Pour l'extraction, nous recommandons l'utilisation de tubes d'extraction BIOHIT ou de toute autre des méthodes décrites ci-dessous (chapitre 7.1.1 et 7.1.2).

Effectuer l'extraction conformément à la notice contenue dans l'emballage pour la méthode et le dispositif d'extraction choisis. D'autres méthodes et dispositifs, validés par le client, peuvent être utilisés.

#### **7.1.1. Extraction à l'aide de tubes BIOHIT**

Mode d'emploi : veuillez lire la notice contenue de l'emballage du produit réf. 602270.





### 7.1.2. Extraction à l'aide de la méthode de pesée (sans dispositif d'extraction)

1. Peser (tarer) un tube à bouchon vissant vide avec une boucle d'inoculation.
2. Prélever env. 100 mg (entre 40 et 120 mg) de selles à l'aide de la boucle d'inoculation et l'introduire dans le tube à bouchon vissant. Éviter de prélever des matières solides non digérées telles que des fibres et des graines.
3. Peser le tube et la boucle avec les selles, pour obtenir le poids net de selles.
4. Casser ou couper la moitié supérieure du manche de la boucle et laisser la partie inférieure à l'intérieur du tube.
5. Ajouter le tampon d'extraction jusqu'à un rapport poids/ volume de 1/50 (par exemple, 4,9 ml de tampon pour 100 mg de selles). Fermer le tube.
6. Mélanger soigneusement pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex.
7. Continuer à mélanger avec un vibreur agitateur (à env. 1 000 tr/min) pendant  $30 \pm 5$  minutes avec la boucle à l'intérieur du tube faisant office d'agitateur.
8. Laisser reposer pendant deux minutes sur la paillasse pour que les particules se déposent, et pipetter soigneusement la partie supérieure du tube. La centrifugation n'est pas nécessaire, mais elle peut être réalisée pendant un bref intervalle de temps si l'on souhaite une solution exempte de particules.
9. L'extrait, qui représente une dilution au 1/50e (poids/volume) de l'échantillon de selles, est désormais prêt à être dilué et testé.
10. Pour le stockage, transférer environ 0,5 ml dans un nouveau tube. Les extraits peuvent être stockés à  $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant au moins cinq jours ou congelés à moins de  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant un maximum de 12 mois.

## 8. PLAN DE PLAQUE SUGGÉRÉ

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrateur 5 500 ng/ml	Calibrateur 5 500 ng/ml	Échantil- lon 1	Échantil- lon 1		
B	Calibrateur 4 125 ng/ml	Calibrateur.4 125 ng/ml	Échantil- lon 2	Échantil- lon 2		
C	Calibrateur 3 62,5 ng/ml	Calibrateur 3 62,5 ng/ml	Échantil- lon 3	Échantil- lon 3		
D	Calibrateur 2 31,3 ng/ml	Calibrateur 2 31,3 ng/ml	Échantil- lon 4	Échantil- lon 4		
E	Calibrateur 1 7,8 ng/ml	Calibrateur 1 7,8 ng/ml	Échantil- lon 5	Échantil- lon 5		
F	Témoin 0 ng/ml	Témoin 0 ng/ml	Échantil- lon 6	Échantil- lon 6		
G	Contrôle faible »	Contrôle faible »	Échantil- lon 7	Échantil- lon 7		
H	Contrôle fort »	Contrôle fort »	Échantil- lon 8	Échantil- lon 8		

Plan de plaque ELISA suggéré pour les calibrateurs, contrôles et échantillons en utilisant la procédure manuelle. Il est recommandé de dupliquer les puits pour accroître la fiabilité des résultats. Une plaque complète contient 40 échantillons.

## 9. PROCÉDURE DE TEST

La procédure suivante correspond à un manuel d'instructions. Des protocoles validés pour les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX sont disponibles sur demande. Les flacons des calibrateurs, témoins et contrôles positifs, ainsi que le tube de conjugué, peuvent être directement placés dans les systèmes automatisés DS2 ou DSX. D'autres instruments automatisés ELISA peuvent être utilisés, mais ils doivent être validés par le client.

### 9.1 Remarques concernant la procédure à suivre

- Préparation : Lisez attentivement le manuel d'instructions avant d'effectuer le test. La fiabilité du résultat dépend du strict respect du manuel d'instructions tel qu'il est décrit. Avant de commencer le test, un plan de la plaque avec tous les témoins, calibrateurs, contrôles et échantillons doit être soigneusement dressé, en utilisant, par exemple,

la feuille fournie dans le kit. Sélectionner le nombre nécessaire de bandes de plaques microtitres. Les bandes non utilisées doivent être remplacées dans le sachet étanche en aluminium et stockées conformément aux instructions du point 6.1.

- Il est recommandé de diluer les extraits de selles au 1/100e. Cette dilution fournira, pour les échantillons, des résultats compris entre 25 mg/kg (LoQ) et 2 500 mg/kg dans les selles. Les extraits contenant les plus hautes valeurs de calprotectine peuvent être dilués davantage (> 1/100e) et retestés si leur valeur l'exige. Les extraits ayant de faibles valeurs de calprotectine peuvent être moins dilués (1/50e). Le facteur de dilution ajusté doit être pris en compte lorsqu'on effectue la conversion de ng/ml à mg/kg (voir point 10 ci-dessous).
- Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre indiqué, sans délai appréciable entre les étapes.
- Un embout jetable propre de pipette doit être utilisé pour chaque étalon, contrôle et échantillon.
- Pour garantir les résultats les plus fiables, les témoins, calibrateurs, contrôles et échantillons du patient doivent toujours être analysés en double.
- Tous les échantillons et réactifs du kit doivent être portés à température ambiante (18 – 25 °C) avant de commencer le test.

## 9.2 Procédure ELISA

1. Diluer les échantillons d'extraits de selles au 1/100e (par ex. 10 µl échantillon + 990 µl de tampon de dilution d'échantillon) et bien mélanger au vortex.
2. Ajouter 100 µl de chaque témoin, calibrateur, contrôle et échantillon dilué dans deux puits ; consulter le plan de plaque recommandé au point 8.
3. Couvrir la plaque avec une film d'incubation et laisser incuber à température ambiante pendant  $40 \pm 5$  min sur un vibreur agitateur horizontal de plaques (environ 500 – 700 tr/min).
4. À la fin du temps d'incubation, retirer le liquide et laver les puits en ajoutant 300 µl de tampon de lavage à chaque puits. Éliminer le plus de liquide possible et répéter l'opération jusqu'à effectuer un total de trois lavages. Si l'on utilise un laveur de plaques, vérifier que toutes les buses d'aspiration et de remplissage sont bien débouchées afin de garantir un lavage efficace de tous les puits. Après le lavage final, retourner la plaque et tapoter énergiquement les ouvertures des puits sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de tampon de lavage.

5. Mélanger doucement le contenu du flacon de conjugué avant son utilisation (ne pas agiter). Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, préférablement à l'aide d'une pipette à répétition ou multi-canaux.
6. Couvrir la plaque avec une film d'incubation et laisser incuber à température ambiante pendant  $40 \pm 5$  min) sur un vibreur agitateur horizontal de plaques (environ 500 – 700 tr/min).
7. Recommencer les étapes de lavage telles que décrites ci-dessus trois fois avec 300 µl de solution de lavage par puits.
8. Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits, préférablement à l'aide d'une pipette à répétition ou multi-canaux.
9. Laisser incuber la plaque à température ambiante (sans agiter) pendant 20 – 30 minutes, à l'abri de la lumière.
10. En option : Ajouter 100 µl de solution d'arrêt 1M NaOH à chaque puits si une période d'incubation fixe est requise.
11. Lire les valeurs de densité optique (D.O.) à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA. Si le lecteur de plaques possède cette option, agiter la plaque brièvement (2-3 secondes) avant la lecture.

## 10. RÉSULTATS

### 10.1 Valeurs de contrôle de qualité

- Une nouvelle courbe étalon doit être réalisée à chaque série de tests.
- Les contrôles positifs doivent être inclus à chaque série de tests. La valeur des contrôles doit être comprise dans les limites imprimées sur les étiquettes des flacons.
- À titre indicatif, la valeur de D.O. du calibrateur 5 (500 ng/ml) doit être  $\geq 1,6$  et celle du témoin (0 ng/ml)  $\leq 0,25$ . Une courbe représentative de calibrateur est montrée à la figure 1.

### 10.2 Calcul des résultats

Calcul de la concentration de calprotectine dans les échantillons de selles des patients :

1. Calculer la moyenne des valeurs de D.O. de toutes les répétitions (témoins, calibrateurs et échantillons).
2. Représenter sous forme graphique la valeur de concentration du témoin et de chaque calibrateur (ng/ml) sur l'axe des abscisses en fonction de la valeur moyenne de la D.O. sur celui des ordonnées pour obtenir une courbe étalon. **Une fonction d'ajustement de la courbe à 4 paramètres est recommandée** (voir figure 1 ci-dessous). Si un axe des abscisses logarithmiques est requis, une valeur de 0,001 ng/

ml doit être utilisée comme étalon A (0 ng/ml).

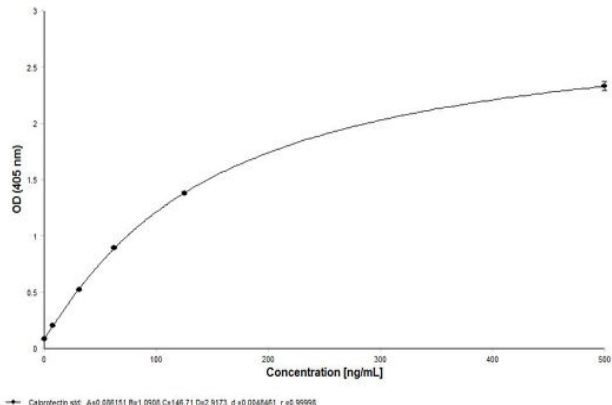
- Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en calprotectine dans les échantillons dilués (ng/ml) à partir de leurs valeurs de D.O.
- Multiplier la concentration de calprotectine (ng/ml) dans les extraits de selles dilués par 5 pour effectuer la conversion en mg/kg de calprotectine dans l'échantillon de selles d'origine.**

Ce facteur corrige la dilution totale de 1/5000e (1/50e pendant la procédure d'extraction, puis la dilution au 1/100e des extraits) et convertit la valeur de ng/ml à mg/kg.

*Exemple : si un échantillon d'extrait dilué possède une valeur de 100 ng/ml, la concentration dans l'échantillon original de selles était de  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

*Remarque :* Si les extraits ont été dilués davantage (ou moins) que la valeur recommandée de 1/100, le facteur de dilution supplémentaire doit être saisi dans le calcul.

Figure 1 : Courbe étalon représentative utilisant un ajustement de courbe à 4 paramètres.



### 10.3 Interprétation des résultats

Les valeurs suivantes de calprotectine dans les échantillons de selles sont issues de la bibliographie<sup>3, 25</sup>:

Valeur normale	5 – 50 mg/kg
Valeur positive	> 50 mg/kg
Valeur moyenne chez des patients atteints de cancers colorectaux symptomatiques	350 mg/kg
Maladie inflammatoire chronique intestinale active	200 – 40 000 mg/kg

Le diagnostic ne doit pas toutefois pas être établi sur la seule base d'un résultat de test. Il doit prendre en considération le dossier clinique et les symptômes.

### 11. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Le diagnostic ne doit pas être établi sur la seule base d'un résultat de test.

### 12. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Remarque : Toutes les études de vérification de la conception ont été réalisées moyennant test manuel sur des échantillons d'extraits de selles (dilués au 1/100e) à l'aide de la procédure ELISA décrite au point 9.

#### Précision inter-essai et intra-essai sur des extraits de selles:

Précision inter-essai, extraits de selles*		Précision intra-essai, extraits de selles**	
Concentration dans les selles (mg/kg)	% C.V.	Concentration dans les selles (mg/kg)	% C.V.
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\*Résultats moyens de trois laboratoires différents, chacun d'eux ayant testé deux lots de kit différents : six échantillons ont été testés 10 fois sur cinq jours

\*\* Résultats moyens de trois laboratoires différents, chacun d'eux ayant testé deux lots de kit : six échantillons ont été testés avec 10 répétitions sur une même série

#### **Récupération:**

Selles: 85 – 105 % ; testé sur des extraits de selles auxquels ont été ajoutés cinq niveaux différents de calprotectine purifiée.

#### **Limite de quantification:**

5 ng/ml; testé avec des extraits de selles et de la calprotectine purifiée. Les échantillons ont été analysés cinq fois sur cinq jours. Le C.V. moyen des différents échantillons et déterminations à ce niveau était de 12 %.

#### **Limite de détection:**

< 5 ng/ml ; calculé comme une moyenne (tampon de dilution d'échantillon ; n= 32) + 5 x écart-type.

#### **Interférence**

Aucune interférence n'a été observée entre l'ELISA et les médicaments habituellement utilisés : prednisolone, Imurel, salazopyrine et ciprofloxacine.

#### **Précision de l'extraction**

Deux échantillons de selles ont été extraits 10 fois chacun, en utilisant la procédure décrite au point 7.1.2, et les extraits ont été analysés à l'ELISA. Résultats moyens de trois laboratoires différents sur un lot de kit :

Échantillon	Concentration (mg/kg)	% C.V.
Faible	130	8.7
Fort	1357	8.8

### Linéarité, extraits de selles

Des extraits de selles (n = 10) ont été dilués au 1/100e – 1/1 000e, puis analysés au test ELISA. Résultats moyens:

Dilution	% de dilution au 1/100e
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Une variation de la linéarité des échantillons a été observée.

### 13. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- En vertu de l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/CE, l'utilisation de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* est conçue de la part du fabricant pour garantir la convenance, performance et sécurité du produit. La procédure de test, l'information, les précautions et les avertissements contenus dans le mode d'emploi doivent donc être strictement respectés. L'utilisation des kits de test avec des analyseurs ou un équipement similaire doit être validée. Toute modification de la conception, composition et procédure de test, ainsi que toute utilisation en association avec d'autres produits non approuvés par le fabricant est interdite ; l'utilisateur lui-même est responsable de telles modifications. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et incidents dus à de telles causes. Le fabricant n'est pas responsable des résultats issus d'une simple analyse visuelle des échantillons du patient.
- Utilisation réservée au seul diagnostic *in vitro*.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la production de ces réactifs ont été testés avec des anticorps anti-VIH, des anticorps anti-HCV et un antigène de l'hépatite B (Bag). Les résultats obtenus montrent qu'ils ne sont pas réactifs. Quoi qu'il en soit, tout le matériel doit être considéré et manipulé comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger des réactifs ou des bandes appartenant à des lots de production différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec des réactifs de ce kit de test.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration indiquée sur l'étiquette ou 1 mois après avoir préparé les solutions de travail à partir des réactifs concentrés.



- N'utiliser que des embouts de pipette, distributeurs et matériel de laboratoire propres.
- Pour éviter toute contamination croisée, ne pas interchanger les bouchons vissants des flacons de réactifs.
- Bien refermer les flacons de réactifs immédiatement après l'usage pour éviter toute évaporation et contamination microbienne.
- Après l'ouverture et le stockage, vérifier l'absence de contamination microbienne dans les flacons de conjugué, calibrateurs et contrôles avant de les réutiliser.
- Pour éviter toute contamination croisée et des résultats faussement élevés, pipetter les calibrateurs, contrôles et échantillons d'extraits de selles et distribuer le conjugué et substrat avec précision dans le fond des puits des plaques microtitres, sans éclabousser.
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium à moins de 0,1 % (p/v) et/ou 0,1 % de Kathon.
- Stocker la solution substrat dans sa bouteille opaque originale ; la solution doit être transparente ou jaune pâle. Mélanger légèrement avant usage.
- Le kit BIOHIT Calprotectin est conçu pour être utilisé par un personnel qualifié, formé aux bonnes pratiques de laboratoire.

### **13.1 Considérations relatives à l'élimination**

Les déchets de produits chimiques et préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est assujettie aux lois et réglementations nationales et régionales. Veuillez contacter les autorités locales ou des sociétés de gestion des déchets qui vous informeront sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

#### **14. GARANTIE**

Biohit est tenu de remédier à tout défaut découvert dans un produit quel qu'il soit (le « Produit défectueux ») résultant de l'emploi de composants inappropriés ou d'une qualité de fabrication négligente, qui empêche le fonctionnement ou l'utilisation prévue du produit, y compris, mais pas uniquement, les fonctions indiquées parmi les spécificités des produits établies par Biohit. CEPENDANT, LA PRÉSENTE GARANTIE N'EST PAS APPLICABLE SI LE DÉFAUT A ÉTÉ CAUSÉ PAR UNE UTILISATION IMPROPRE OU ABUSIVE DU PRODUIT, UN DOMMAGE ACCIDENTEL, UNE CONSERVATION INCORRECTE OU ENCORE L'UTILISATION DU PRODUIT POUR DES OPÉRATIONS HORS DES LIMITATIONS OU CARACTÉRISTIQUES, OU CONTRAIRES AUX INSTRUCTIONS FOURNIES PAR CE MODE D'EMPLOI.

La période de garantie est définie dans le mode d'emploi et prend effet à compter de la date d'expédition du Produit par Biohit. Ce coffret de diagnostic Biohit a été fabriqué conformément aux protocoles de gestion de la qualité définis par la norme ISO 9001 / ISO 13485.

En cas de litiges, c'est la version anglaise du texte qui s'applique.

En cas d'incident grave lié au produit, contacter le fabricant.

## **15. RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE À SUIVRE**

Le kit BIOHIT Calprotectin pour l'analyse de calprotectine dans les selles  
*Se reporter aux points 7 – 9 de la notice contenue dans l'emballage pour une description complète de la procédure.*

### **Extraction**

Effectuer l'extraction conformément à l'une des méthodes décrites aux points 7.1.1 – 7.1.2

### **ELISA (procédure manuelle)**

- Diluer des extraits de selles au 1/100e dans le tampon de dilution d'échantillon
- Ajouter 100 µL de chaque calibrateur, contrôle, témoin et échantillon sur la plaque ELISA
- Laisser incuber sur un vibreur agitateur de plaques à température ambiante pendant 40 ± 5 min)
- Laver les puits trois fois avec 300 µl de tampon de lavage
- Ajouter 100 µL de solution de conjugué dans chaque puits
- Laisser incuber sur un vibreur agitateur de plaques à température ambiante pendant 40 ± 5 min)
- Laver les puits trois fois avec 300 µl de tampon de lavage
- Ajouter 100 µL de solution substrat à chaque puits
- Couvrir et laisser incuber pendant 20 – 30 min
- En option : ajouter 100 µL de 1M NaOH à chaque puits
- Lire les valeurs de D.O. à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA
- Calculer les résultats (ng/ml) à l'aide d'un ajustement de courbe à 4 paramètres
- mg/kg dans les selles = ng/ml × 5

Pour toute question, prière de contacter [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

**INSTRUCCIONES DE USO**

BIOHIT Calprotectin

REF 602260

1. USO PREVISTO .....	77
2. ANTECEDENTES .....	77
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	78
4. MATERIALES .....	79
4.1. Reactivos facilitados con el kit .....	79
4.2. Materiales facilitados con el kit .....	80
4.3. Materiales necesarios que no se suministran .....	80
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO .....	81
6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS .....	81
6.1. Tiras recubiertas de la placa de pocillos .....	81
6.2. Amortiguador para la dilución de muestras .....	81
6.3. Amortiguador para lavado .....	82
6.4. Amortiguador para extracción fecal .....	82
6.5. Calibradores, blanco y controles .....	82
6.6. Solución conjugada .....	82
6.7. Solución de sustrato Solución de sustrato .....	82
7. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	82
7.1. Muestras fecales .....	82
7.1.1. Extracción mediante tubos de extracción BIOHIT .....	84
7.1.2. Extracción mediante el método de pesada (sin dispositivo de extracción) .....	84
8. SUGERENCIA DE ESQUEMA DE PLACA .....	85
9. MÉTODO ANALÍTICO .....	85
9.1 Notas sobre el procedimiento .....	85
9.2 Procedimiento de ELISA .....	86
10. RESULTADOS .....	87
10.1 Valores del control de calidad .....	87
10.2 Cálculo de los resultados .....	87
10.3 Interpretación de los resultados .....	89
11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....	89
12. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS .....	89
13. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	91
13.1 Consideraciones respecto a la eliminación .....	92
14. GARANTIA .....	93
15. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO .....	94
DATE OF ISSUE .....	114
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÈRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS .....	114
ORDERING INFORMATION .....	116

## 1. USO PREVISTO

La prueba BIOHIT Calprotectin es un ensayo cuantitativo *in vitro* de inmunoadsorción enzimática que ayuda en el diagnóstico de enfermedades orgánicas del intestino delgado, del intestino grueso y del estómago, como la enteropatía inflamatoria, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, mediante la detección de calprotectina en muestras de heces. Asimismo, la prueba se utiliza para controlar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. La prueba se puede realizar de forma manual o automática y está concebida para uso exclusivo por parte de profesionales sanitarios.

## 2. ANTECEDENTES

La calprotectina es una proteína de fijación al calcio y zinc de 36 kilodaltonios<sup>1</sup> que liberan sobre todo los leucocitos, en concreto los neutrófilos polimorfonucleares (NPM), en la luz intestinal durante la inflamación de la mucosa intestinal. Los microorganismos del intestino estimulan la migración de los leucocitos a la luz intestinal, donde liberan su contenido, que incluye sustancias antimicrobianas como la calprotectina. Esta proteína constituye alrededor del 60 % del total de proteínas que hay en el citoplasma de los NPM<sup>2</sup> y puede estimarse de manera fiable en muestras fecales almacenadas hasta siete días a temperatura ambiente<sup>3</sup>.

Distintos tipos de enfermedad, como las infecciones bacterianas, la artritis reumatoide y el cáncer, conllevan la activación de los NPM y el aumento de los niveles de calprotectina en plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido crevicular, orina u otras sustancias del cuerpo humano<sup>4</sup>.

Existe una relación entre la concentración de calprotectina en las heces y el número de NPM que migran a la luz intestinal<sup>5</sup>; dicha concentración puede detectarse de forma fiable incluso en muestras fecales aleatorias de pequeño tamaño (inferiores a un gramo)<sup>3,6</sup>. Las enfermedades orgánicas del intestino arrojan una fuerte señal de calprotectina; los aumentos, en general, superan el nivel de referencia máximo de los individuos sanos entre cinco y varios miles de veces<sup>3,7-9</sup>, lo que indica la existencia de inflamación intestinal. Las enteropatías inflamatorias (EI), como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, pueden aparecer entre la niñez temprana y el final de la edad adulta, y el diagnóstico suele ser tardío debido a la vaguedad de los síntomas o la renuencia a someterse a endoscopias y biopsias.

Los trastornos funcionales, como el síndrome del intestino irritable (SII) no provocan un aumento de la concentración de calprotectina fecal, a diferencia de los trastornos abdominales orgánicos, como las EI. Los pacientes con trastornos abdominales orgánicos y funcionales pueden tener síntomas similares y la exploración clínica por sí sola puede no ser suficiente para obtener un diagnóstico específico. La prueba de calprotectina fecal es un método sencillo, no invasivo, económico y objetivo que puede ayudar a seleccionar pacientes para someterlos a exploraciones adicionales, como la endoscopia. Los síntomas abdominales son muy frecuentes tanto en niños como en adultos y un resultado negativo medido por BIOHIT Calprotectin puede descartar, con un gran índice de probabilidad, las enteropatías inflamatorias<sup>7</sup>.

La curación de la mucosa es el objetivo principal del tratamiento de las EI y una prueba de calprotectina fecal demuestra si dicha curación se ha producido. Muchos pacientes de EI en remisión clínica con niveles normales de proteína C reactiva (PCR) siguen teniendo inflamación<sup>10</sup>, reflejada por un aumento de la calprotectina fecal. Estos pacientes tienen mayor riesgo de sufrir una recaída al cabo de pocos meses<sup>11</sup>. Si se logra la curación de la mucosa, se reducirá el riesgo de recaída y la necesidad de cirugía abdominal mayor<sup>12,13</sup>. La normalización de los niveles de calprotectina indica que se ha logrado la curación de la mucosa<sup>14</sup>.

### **3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

BIOHIT Calprotectin se basa en la preparación de un extracto de heces mediante un amortiguador para extracción fecal. El nivel de calprotectina se determina analizando el extracto en un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA) específico para la calprotectina.

En el ELISA, las muestras y calibradores se incuban en pocillos distintos recubiertos de anticuerpos monoclonales que fijan la calprotectina. Tras la incubación y el lavado de los pocillos, la calprotectina fijada puede reaccionar con anticuerpos específicos para la calprotectina, marcados enzimáticamente y purificados mediante inmunoadfinidad. Tras esta reacción, la cantidad de enzima fijada en los pocillos es proporcional a la cantidad de calprotectina que hay en la muestra o el patrón, que viene determinada por la incubación con un sustrato para la enzima, lo que resulta en un producto coloreado. La intensidad del color viene determinada por la absorbencia utilizando un lector de placas ELISA y es proporcional a la concentración de calprotectina en los calibradores y muestras. El análisis se calibra mediante calprotectina purificada procedente de extracto de leucocitos.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos facilitados con el kit

**Placa de pocillos recubiertos:** 12 tiras, 8 pocillos por tiras, recubiertas con anticuerpos murinos monoclonales purificados mediante afinidad específica para la calprotectina. La placa viene almacenada en una bolsa sellada con desecante. No combine tiras/pocillos de diferentes microplacas, aunque tengan el mismo número de lote.

**DILBUF 5x** Amortiguador para dilución de muestras (conc. 5x) \*\*\*: 1 unidad de 20 ml, en concentración 5x, para diluir en agua destilada/desionizada; solución de color amarillo con pH  $8,0 \pm 0,2$ , frasco con tapón azul.

**WASH 20x** Amortiguador para lavado (conc. 20x) \*: 1 unidad de 50 ml, en concentración 20x, para diluir en agua destilada/desionizada, para el lavado de los pocillos; solución transparente con pH  $7,8 \pm 0,2$ , frasco con tapón blanco.

**FEC EXTRBUF 2.5X** Amortiguador para extracción fecal (conc. 2,5x) \*\*: 2 unidades de 90 ml, en concentración 2,5x, para diluir en agua destilada/desionizada; solución transparente con pH  $7,8 \pm 0,2$ , frascos con tapón blanco.

**CAL 1-5** Calibradores de calprotectina 1-5 y **BLANK** \*\*\*: 6 viales de 1,0 ml, solución de color amarillo lista para usar, viales con tapones de distinto color:

Blanco: tapón azul	0	ng/ml
Calibrador 1: tapón verde	7,8	ng/ml
Calibrador 2: tapón amarillo	31,3	ng/ml
Calibrador 3: tapón rojo	62,5	ng/ml
Calibrador 4: tapón blanco	125	ng/ml
Calibrador 5: tapón negro	500	ng/ml

**CONTROL LOW** **CONTROL HIGH** Controles “bajo” y “alto” \*\*\*: 2 viales de 1,0 ml, solución de color amarillo lista para usar; control bajo: vial con tapón marrón; control alto: vial con tapón morado.

**CONJ** Solución conjugada \*\*\*\*: 113 ml de solución de color rojo, lista para usar, con anticuerpos policlonales de conejo contra la calprotectina

marcados con fosfatasa alcalina y purificados mediante inmunoafinidad, en un tubo de reactivo Dynex de 25 ml con tapón blanco.

**SUBS** **Solución de sustrato (pNPP):** 113 ml de solución lista para usar, de color transparente a amarillo claro, en frasco opaco con tapón amarillo.

*Nota:* Si se usa un instrumento Dynex, el sustrato debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis.

- \* Contiene 0,1 % de Kathon.
- \*\* Contiene <0,1 % de acida de sodio
- \*\*\* Contiene 0,1 % de Kathon y <0,1 % de acida de socio
- \*\*\*\* Contiene 0,02 % de metilisotiazolona y 0,02 % de bromonitrodioxano

#### 4.2. Materiales facilitados con el kit

- 2 cubiertas de incubación
- 1 manual de instrucción
- 1 esquema de placa

#### 4.3. Materiales necesarios que no se suministran

- Agua destilada/desionizada
- Aparatos de extracción (ver secciones 7.1.1 y 7.1.2)
- Asas bacteriológicas desechables y rompibles (si se usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Balanza digital sensible (40-150 mg) (si se usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Tubos desechables con tapón de rosca de poliestireno, de 5 ml (si se usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Agitador vórtex (con un adaptador de tubo) o agitador de hasta 1000 rpm cuando se usa para extraer una muestra de heces en la sección 7.1.2
- Tubos desechables para la dilución de las muestras: Tubos eppendorf o similares (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Pipetas para aplicar volúmenes de 10-1000  $\mu$ l (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Pipeta repetidora o pipeta multicanal, de 100  $\mu$ l (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Limpiador de pocillos o pipeta multicanal, de 300  $\mu$ l (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Agitador de placas (500-700 rpm) (si el análisis se lleva a cabo de



- forma manual)
- Temporizador (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Lector de placas, filtro de 405 nm (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- 1M NaOH (solución de frenado; optativa)

## **5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO**

Si se almacenan sin abrir a 2-8 °C, los reactivos del kit permanecen estables hasta la fecha de caducidad que indica la etiqueta.

Las placas, reactivos y amortiguadores concentrados que se hayan abierto permanecen estables hasta un máximo de tres meses si se almacenan a 2-8 °C.

Si se preparan en recipientes limpios, las soluciones de trabajo (1x) de amortiguador para lavado, amortiguador para la dilución de muestras y amortiguador para la extracción fecal pueden almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de un mes.

Evitar la exposición a altas temperaturas y a la luz directa del sol.

## **6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS**

Todos los reactivos, muestras y controles deben llevarse a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de empezar el análisis.

### **6.1. Tiras recubiertas de la placa de pocillos**

Las tiras de la placa están listas para usar y vienen recubiertas con anticuerpos murinos monoclonales purificados mediante afinidad específicos para la calprotectina. Las tiras que no se usen deben eliminarse de la estructura y volverse a sellar inmediatamente en bolsa de papel de aluminio junto con el desecante suministrado. Almacenar a 2-8 °C.

### **6.2. Amortiguador para la dilución de muestras**

Diluir el amortiguador para dilución de muestras concentrado a 5x añadiendo 1 parte (20 ml) a 4 partes (80 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 100 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador para la dilución de muestras diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

Nota: Si se usa un instrumento automático Dynex DS2 o DSX ELISA, el amortiguador para la dilución de muestras debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis.

### **6.3. Amortiguador para lavado**

Diluir el amortiguador para lavado concentrado a 20x añadiendo 1 parte (50 ml) a 19 partes (950 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 1000 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador para lavado diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

### **6.4. Amortiguador para extracción fecal**

Diluir el amortiguador para extracción fecal concentrado a 2,5x añadiendo 1 parte (90 ml) a 1.5 partes (135 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 225 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

### **6.5. Calibradores, blanco y controles**

Los viales marcados como blanco, calibrador y controles contienen cada uno 1,0 ml de una solución lista para usar. La concentración de calprotectina viene impresa en la etiqueta de cada vial. Los viales encajan directamente en los instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA.

### **6.6. Solución conjugada**

El tubo contiene 13 ml anticuerpos de conejo contra la calprotectina marcados con fosfatasa alcalina (FA) y purificados mediante inmunoespecificidad en un amortiguador con estabilizantes, conservantes y un tinte rojo inerte. La solución viene lista para usar. El tubo encaja directamente en los instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA.

### **6.7. Solución de sustrato Solución de sustrato**

El frasco contiene 13 ml de solución de p-nitrofenilfosfato (pNPP). La solución viene lista para usar y debe almacenarse en su frasco opaco original.

*Nota:* Si se usa un instrumento automático Dynex DS2 o DSX ELISA, la solución de sustrato enzimático debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis.

## **7. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

BIOHIT Calprotectin se ha elaborado y validado para muestras fecales.

### **7.1. Muestras fecales**

Dado que la calprotectina es muy estable en las heces, los pacientes

pueden obtener pequeñas muestras fecales en casa. Se debe recoger una muestra de 1-5 g (aproximadamente, una cucharadita), introducirla en un recipiente limpio apropiado y enviarla al laboratorio lo antes posible, en un plazo máximo de cuatro días. Si se introduce en un recipiente apto para el transporte, puede enviarse por correo ordinario; es decir, no se necesita refrigeración. Debe evitarse exponer la muestra a temperaturas superiores a 30 °C.

Las muestras también pueden almacenarse congeladas, a -20 °C o menos, durante un máximo de 1,5 años, hasta su entrega o envío. Las muestras congeladas deben descongelarse y equilibrarse hasta la temperatura ambiente antes de la extracción y el análisis. Téngase en cuenta que al congelar muestras fecales pueden aumentar en ocasiones los niveles de calprotectina, debido, muy probablemente, a su liberación a partir de los granulocitos.

Nota: Antes de comenzar la extracción, la muestra fecal debe homogeneizarse bien, usando, por ejemplo, una espátula, antes de retirar la pequeña cantidad para la extracción.

Para la extracción, recomendamos usar tubos de extracción BIOHIT o los otros métodos que se describen a continuación (capítulos 7.1.1 y 7.1.2). Realizar la extracción de acuerdo con el prospecto del envase correspondiente al dispositivo/método de extracción escogido. Pueden emplearse otros métodos y dispositivos validados por el cliente.

### 7.1.1. Extracción mediante tubos de extracción BIOHIT

Instrucciones de uso: leer el prospecto del envase del producto ref. 602270.



### 7.1.2. Extracción mediante el método de pesada (sin dispositivo de extracción)

1. Pesar (tarar) un tubo vacío con tapón de rosca con un asa bacteriológica.
2. Tomar aproximadamente 100 mg (entre 40 y 120 mg) de heces mediante el asa bacteriológica e introducirlos en el tubo con tapón de rosca. Evitar tomar material sólido no digerido, como fibras y semillas.
3. Pesar el tubo y el asa con heces, con lo que se obtendrá el peso neto de las heces.
4. Romper o cortar la mitad superior del asa bacteriológica y dejar la parte inferior dentro del tubo.
5. Añadir amortiguador para extracción en una proporción peso: volumen de 1:50; por ejemplo, 4,9 ml de amortiguador a 100 mg de heces. Cerrar el tubo.
6. Mezclar vigorosamente durante 30 segundos mediante un agitador vórtex.
7. Seguir mezclando en un agitador (a aproximadamente 1000 rpm) durante 30±5 minutos con el asa dentro del tubo a modo de agitador.
8. Dejar un par de minutos sobre el mostrador para que las partículas se asienten y pipetear con cuidado desde la parte superior del tubo. No es necesario centrifugar, aunque se puede llevar a cabo un breve centrifugado si se necesita una solución sin partículas.
9. El extracto, que representa una dilución 1:50 (peso:volumen) de la muestra de heces, ya está lista para la dilución y el análisis.
10. Para el almacenamiento, transferir aproximadamente 0,5 ml a un nuevo tubo. Los extractos pueden almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de cinco días o congelarse por debajo de -20 °C durante un máximo de 12 meses.

## 8. SUGERENCIA DE ESQUEMA DE PLACA

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrador 5 500 ng/ml	Calibrador 5 500 ng/ml	Muestra 1	Muestra 1		
B	Calibrador 4 125 ng/ml	Calibrador 4 125 ng/ml	Muestra 2	Muestra 2		
C	Calibrador 3 62,5 ng/ml	Calibrador 3 62,5 ng/ml	Muestra 3	Muestra 3		
D	Calibrador 2 31,3 ng/ml	Calibrador 2 31,3 ng/ml	Muestra 4	Muestra 4		
E	Calibrador 1 7,8 ng/ml	Calibrador 1 7,8 ng/ml	Muestra 5	Muestra 5		
F	Blanco 0 ng/ml	Blanco 0 ng/ml	Muestra 6	Muestra 6		
G	Control "bajo"	Control "bajo"	Muestra 7	Muestra 7		
H	Control "alto"	Control "alto"	Muestra 8	Muestra 8		

Sugerencia de esquema de placa ELISA para calibradores, controles y muestras siguiendo un procedimiento manual. Se recomienda duplicar los pocillos para aumentar la fiabilidad de los resultados. En una placa completa caben 40 muestras.

## 9. MÉTODO ANALÍTICO

El siguiente procedimiento se refiere al análisis manual. Se pueden solicitar protocolos validados para instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA. Debe tenerse en cuenta que los viales para calibrador, blanco y control positivo, así como el tubo de conjugado, encajan directamente en los instrumentos automáticos DS2 o DSX ELISA. También pueden usarse otros instrumentos automáticos para ELISA, pero el cliente debe validarlos previamente.

### 9.1 Notas sobre el procedimiento

- Preparación: Leer con atención manual de instrucción antes de llevarlo a cabo. La fiabilidad de los resultados depende de que se siga esrupulosamente el protocolo de análisis descrito. Antes de comenzar el análisis, debe establecerse minuciosamente un esquema de placa para todos los blancos, calibradores, controles y muestras, utilizando,

por ejemplo, la hoja que se incluye en el kit. Seleccionar el número necesario de tiras de la placa. Las tiras que no se usen deben volverse a sellar inmediatamente en bolsa de papel de aluminio y almacenarse según se describe en la sección 6.1.

- Se recomienda emplear una dilución a 1:100 de extractos de heces. Esta dilución arrojará unos resultados de muestra de entre 25 mg/kg (límite de cuantificación) y 2500 mg/kg en heces. Los extractos con valores de calprotectina más altos pueden diluirse más ( $> 1:100$ ) y volverse a someter análisis si se necesita un valor. Los extractos con valores de calprotectina bajos pueden diluirse menos (1:50). El factor de dilución ajustado debe tenerse en cuenta al convertir de ng/ml a mg/kg (véase la sección 10, más adelante).
- Llevar a cabo todos los pasos del análisis en el orden indicado y sin demoras apreciables entre ellos.
- Debe usarse una punta de pipeta limpia y desechable para dispensar cada patrón, control y muestra.
- Para obtener unos resultados lo más fiables posible, los blancos, calibradores, controles y muestras de pacientes deben analizarse siempre por duplicado.
- Todas las muestras y reactivos del kit deben equilibrarse a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de empezar el análisis.

## 9.2 Procedimiento de ELISA

1. Diluir las muestras de extracto de heces a 1:100 (p. ej., 10  $\mu$ l de muestra + 990  $\mu$ l de amortiguador para dilución de muestras) y mezclar bien mediante el agitador vórtex.
2. Añadir 100  $\mu$ l de cada blanco, calibrador, control y muestra diluida en pocillos duplicados; véase el esquema de placa recomendado en la sección 8.
3. Tapar la placa con una cubierta de incubación e incubar a temperatura ambiente durante 40 $\pm$ 5 minutos en un agitador de placas horizontal (aproximadamente, a 500-700 rpm).
4. Al final del tiempo de incubación, retirar el líquido y lavar los pocillos añadiendo 300  $\mu$ l de amortiguador para lavado a cada pocillo. Retirar tanto líquido como sea posible y repetir hasta que se hayan realizado un total de tres lavados. Si se usa un limpiador de placas, comprobar no haya ninguna sonda de aspirado y llenado bloqueada para garantizar el correcto lavado de todos los pocillos. Tras el lavado final, invertir la placa y golpear con fuerza la aberturas de los pocillos sobre papel absorbente para eliminar cualquier resto de amortiguador

para lavado.

5. Mezclar el contenido del vial de conjugado suavemente antes de usarlo (sin agitarlo). Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo; preferiblemente, con una pipeta repetidora o multicanal.
6. Tapar la placa con una cubierta de incubación e incubar a temperatura ambiente durante  $40 \pm 5$  minutos en un agitador de placas horizontal (aproximadamente, a 500-700 rpm).
7. Repetir los pasos de lavado arriba descritos, tres veces con 300 µl de solución de lavado por pocillo.
8. Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo; preferiblemente, con una pipeta repetidora o multicanal.
9. Incubar la placa a temperatura ambiente (sin agitar) durante 20-30 minutos, protegida de la luz.
10. Optativo: Añadir 100 µl de solución de frenado 1M NaOH a cada pocillo si se necesita un periodo de incubación fijo.
11. Leer los valores de densidad óptica (DO) a 405 nm usando un lector de ELISA. Si el lector de placas tiene esta opción, agitar brevemente la placa (2-3 segundos) antes de la lectura.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Valores del control de calidad

- Debe incluirse una nueva curva de patrón en cada tanda.
- Los controles positivos deben incluirse en cada tanda. El valor de los controles debe encontrarse dentro de los límites impresos en las etiquetas de los viales.
- A modo de guía, el valor de DO del calibrador 5 (500 ng/ml) debe ser  $\geq 1,6$ , mientras que el valor de DO del blanco (0 ng/ml) debe ser  $\leq 0,25$ . En la figura 1 se muestra una curva de calibrador representativa.

### 10.2 Cálculo de los resultados

Cálculo de la concentración de calprotectina en muestras fecales de pacientes:

1. Calcular los valores medios de DO de todos los pocillos duplicados (blanco, calibradores y muestras).
2. Trazar el valor del blanco y de cada calibrador y la concentración (ng/ml) en el eje de la x frente a su valor de DO medio en el eje de la y para obtener una curva de patrón. **Se recomienda una función de ajuste de curvas de 4 parámetros** (véase la figura 1, a continua-

ción). Si se necesita un eje de la x logarítmico, debe usarse un valor de 0,001 ng/ml para el patrón A (0 ng/ml).

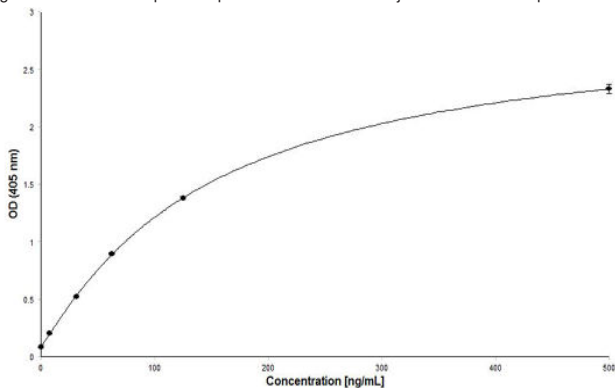
3. Usar la curva de calibración para determinar la concentración de calprotectina en las muestras diluidas (ng/ml) de acuerdo con sus valores de DO.
4. **Multiplicar la concentración de calprotectina (ng/ml) en los extractos fecales diluidos por 5 para convertir a mg/kg de calprotectina en la muestra de heces original.**

Este factor efectúa la corrección para la dilución total de 1:5000 (1:50 durante el procedimiento de extracción y la posterior dilución a 1:100 de los extractos) y convierte el valor de ng/ml a mg/kg.

*Ejemplo: si una muestra de extracto diluido tiene un valor de 100 ng/ml, la concentración en la muestra fecal original era de  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

*Nota: Si los extractos se han diluido en una relación mayor (o menor) al 1:100 recomendado, el factor de dilución adicional deberá introducirse en el cálculo.*

Figura 1: Una curva de patrón representativa usando un ajuste de curva de 4 parámetros.



→ Calprotectin std: A=0.005151 B=1.0908 C=146.71 D=2.9173 d=0.0048461 r=0.99990



### 10.3 Interpretación de los resultados

En diversas publicaciones se han señalado los siguientes valores de calprotectina en muestras fecales<sup>3,25</sup>:

Valor normal	5 – 50 mg/kg
Valor positivo	> 50 mg/kg
Valor mediano en pacientes con cánceres colorrectales sintomáticos	350 mg/kg
Enteropatía inflamatoria activa sintomática	200 – 40 000 mg/kg

Téngase en cuenta que no se debe establecer un diagnóstico partiendo del resultado de un solo análisis. El diagnóstico debe tomar en consideración los antecedentes clínicos y los síntomas.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se debe establecer un diagnóstico partiendo del resultado de un solo análisis.

### 12. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS

Nota: Todos los estudios de verificación del diseño se llevaron a cabo mediante análisis manual de muestras de extractos fecales (diluidas a 1:100) siguiendo el procedimiento de ELISA que se describe en la sección 9.

#### Precisión entre análisis y dentro del mismo análisis de los extractos fecales:

Precisión entre análisis, extractos fecales*		Precisión dentro del mismo análisis, extractos fecales**	
Concentración en heces (mg/kg)	% CV	Concentración en heces (mg/kg)	% CV
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\*Resultados medios de tres laboratorios distintos, cada uno de los cuales analizó dos lotes de kits distintos: se analizaron seis muestras un total de 10 veces a lo largo de cinco días

\*\* Resultados medios de tres laboratorios distintos, cada uno de los cuales analizó dos lotes de kits distintos: se analizaron seis muestras con 10 réplicas en una tanda

#### **Recuperación:**

Heces: 85-105 %; analizados con extracto fecal al que se añadió calprotectina purificada en cinco niveles distintos.

#### **Límite de cuantificación:**

5 ng/ml; analizados con extracto de heces y calprotectina purificada. Las muestras se analizaron cinco veces a lo largo de cinco días. El CV medio de las distintas muestras y determinaciones en este nivel fue del 12 %.

#### **Límite de detección:**

< 5 ng/ml; calculado como media (amortiguador para dilución de muestras; n = 32) + 5x DE.

#### **Interferencia**

No se observó interferencia en ELISA procedente de medicamentos de uso frecuente: prednisolona, imurel, salazopirina y ciprofloxacina.

#### **Precisión de la extracción**

Se extrajeron dos muestras de heces 10 veces cada una, siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 7.1.2, y los extractos se analizaron en ELISA. Resultados medios de tres laboratorios distintos y un lote de kits:

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/kg)</b>	<b>% CV</b>
Baja	130	8.7
Alta	1357	8.8

### Linealidad, extractos de heces

Los extractos de heces (n=10) se diluyeron a 1:100-1:1000 y se analizaron en ELISA. Resultados medios:

Dilución	% de dilución a 1:100
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Téngase en cuenta que se ha observado una variación de la muestra en cuanto a la linealidad.

### 13. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- De conformidad con el artículo 1, párrafo 2b de la Directiva europea 98/79/CE, el fabricante de los dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* persigue con su uso garantizar la idoneidad, resultados y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento de análisis, la información, las precauciones y las advertencias que figuran en las instrucciones de uso deben seguirse escrupulosamente. El uso de los kits con analizadores y aparatos similares aún debe validarse. No se autoriza ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento de análisis, como tampoco el uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de estos cambios. El fabricante no se hace responsable de resultados erróneos e incidentes debidos a estos motivos. El fabricante no se hace responsable de los resultados obtenidos por análisis visual de las muestras de pacientes.
- Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
- Todos los componentes de origen humano empleados para la elaboración de estos reactivos se han analizado en busca de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-VHC y antígeno de la hepatitis B (HBsAg); se ha determinado que no son reactivos. No obstante, todos los materiales deben considerarse potencialmente contaminados y tratarse como si lo fueran.
- No intercambiar reactivos o tiras de distintos lotes de producción.
- No usar reactivos de otros fabricantes con reactivos de este kit de análisis.
- No usar los reactivos tras la fecha de caducidad indicada en la etiqueta o después de un mes de haber convertido reactivos concentrados en soluciones de trabajo.

- Usar solo puntas de pipeta, dispensadores y material de laboratorio limpios.
- Para impedir la contaminación cruzada, no intercambiar los tapones de rosca de los viales de reactivos.
- Cerrar los viales de reactivos con firmeza justo después de su uso, para evitar la evaporación y la contaminación microbiana.
- Tras haberlos abierto y almacenado, comprobar si hay contaminación microbiana en los viales de conjugado, calibradores y control antes de seguir usándolos.
- Para evitar la contaminación cruzada y resultados falsamente elevados, pipetear los calibradores, controles y muestras de extracto fecal y dispensar el conjugado y sustrato de forma precisa en el fondo de los pocillos, sin salpicar.
- Algunos reactivos contienen menos de 0,1 % (m/v) de ácido de sodio y/o 0,1 % de Kathon.
- Almacenar la solución de sustrato en el frasco opaco original; la solución debe ser de color transparente a amarillo claro. Mezclar suavemente antes de usar.
- BIOHIT Calprotectin está diseñado para su uso por parte de personal cualificado que cuente con formación en buenas prácticas de laboratorio.

### **13.1 Consideraciones respecto a la eliminación**

Los residuos de productos químicos y preparaciones suelen considerarse peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada mediante leyes y normativas nacionales y regionales. Se recomienda ponerse en contacto con las autoridades o las empresas de tratamiento de residuos locales, que facilitarán información sobre cómo desechar los residuos peligrosos.

#### **14. GARANTIA**

Biohit deberá solucionar todo defecto hallado en cualquier Producto (el "Producto Defectuoso") causado por materiales inadecuados o negligencia en la manufacturación y que eviten el funcionamiento mecánico o el uso previsto de los Productos incluyendo, entre otros aspectos, las funciones indicadas en las especificaciones de Biohit para los Productos. SIN EMBARGO, EN CASO DE HALLARSE UNA FALTA CAUSADA POR TRATO INDEBIDO, USO INDEBIDO, DAÑO ACCIDENTAL, CONSERVACIÓN INCORRECTA O USO DE LOS PRODUCTOS PARA PROCEDIMIENTOS FUERA DE LAS LIMITACIONES INDICADAS O DE SUS ESPECIFICACIONES, CONTRARIOS A LAS INSTRUCCIONES PROPORCIONADAS EN EL MANUAL DE INSTRUCCIONES, CUALQUIER GARANTÍA SE CONSIDERARÁ NULA.

El periodo de esta garantía se indica en el manual de instrucciones de los Productos y entrará en vigor a partir de la fecha de expedición del Producto en cuestión

por parte de Biohit. Este kit de Diagnóstico de Biohit se ha elaborado en conformidad con los protocolos de gestión de calidad ISO 9001 / ISO 13485.

En caso de conflicto con respecto a su interpretación, se aplicará el texto en inglés.

En caso de algún incidente grave relacionado con el producto, póngase en contacto con el fabricante.

## 15. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Kit BIOHIT Calprotectin para análisis de calprotectina en heces

*Consultar las secciones 7-9 del prospecto del envase para obtener una descripción completa de los pasos prácticos.*

### Extracción

- Realizar la extracción de acuerdo con uno de los métodos que se describen en las secciones 7.1.1-7.1.2

### ELISA (procedimiento manual)

- Diluir los extractos fecales a 1:100 en amortiguador para dilución de muestras
- Añadir 100 µL de calibradores, controles, blanco y muestras a la placa de ELISA
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 40±5 minutos
- Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de amortiguador para lavado
- Añadir 100 µL de solución de conjugado a cada pocillo
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 40±5 minutos
- Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de amortiguador para lavado
- Añadir 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo
- Incubar con la placa tapada durante 20-30 minutos
- Opcativo: añadir 100 µL de 1M NaOH a cada pocillo
- Leer los valores de DO a 405 nm usando un lector de ELISA
- Usando un ajuste de curva de 4 parámetros, calcular los resultados (ng/ml)
- $\text{mg/kg en heces} = \text{ng/ml} \times 5$

Para plantear preguntas, ponerse en contacto con [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

# PORTUGUÊS

## INSTRUÇÕES DE USO

BIOHIT Calprotectin

REF 602260

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA.....	96
2. CONTEXTO .....	96
3. PRINCÍPIO DO TESTE .....	97
4. MATERIAIS .....	98
4.1. Reagentes fornecidos com o kit.....	98
4.2. Materiais fornecidos com o kit.....	99
4.3. Materiais necessários mas não fornecidos.....	99
5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO.....	100
6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES.....	100
6.1. Faixas da placa de titulação revestidas .....	100
6.2. Tampão de diluição da amostra .....	100
6.3. Tampão de lavagem.....	101
6.4. Tampão de extração de fezes.....	101
6.5. Calibradores, solução em branco e controlos.....	101
6.6. Solução do conjugado.....	101
6.7. Solução do substrato .....	101
7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	102
7.1. Amostras de fezes .....	102
7.1.1. Extração com os tubos de extração BIOHIT .....	103
7.1.2. Extração através do método de pesagem (sem disposi.....	103
(tivo de extração).....	103
8. DISPOSIÇÃO SUGERIDA DA PLACA.....	104
9. PROCEDIMENTO DE TESTE .....	104
9.1 Notas do procedimento.....	105
9.2 Procedimento ELISA.....	105
10. RESULTADOS .....	106
10.1 Valores de controlo de qualidade.....	106
10.2 Cálculo dos resultados .....	106
10.3 Interpretação dos resultados.....	108
11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.....	108
12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO .....	109
13. AVISOS E PRECAUÇÕES .....	111
13.1 Considerações relativas à eliminação.....	112
14. GARANTIA .....	112
15. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO .....	113
DATE OF ISSUE .....	114
REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÉRENCES /	
REFERENCIAS / REFERÊNCIAS.....	114
ORDERING INFORMATION.....	116

## 1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O teste BIOHIT Calprotectin é um imunoenensaio enzimático quantitativo *in vitro* que auxilia no diagnóstico de doença orgânica do intestino delgado, do intestino grosso ou do estômago como a doença inflamatória do intestino, colite ulcerosa ou doença de Crohn através da detecção de calprotectina em amostras de fezes. Além disso, o teste é utilizado para monitorizar a atividade da doença e a resposta ao tratamento em doentes com colite ulcerosa ou doença de Crohn. O teste pode ser realizado manualmente ou automaticamente e destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de saúde.

## 2. CONTEXTO

A Calprotectina é uma proteína transportadora de cálcio e zinco de 36 quilodaltons<sup>1)</sup> libertada sobretudo pelos leucócitos, em particular pelos granulócitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), para o lúmen intestinal durante a inflamação da mucosa intestinal. Os microrganismos do intestino estimulam a migração dos leucócitos para o lúmen intestinal. Uma vez aí, eles libertam os seus conteúdos, incluindo substâncias antimicrobianas como a Calprotectina. Esta proteína constitui cerca de 60 % das proteínas totais no citoplasma dos PMN<sup>2)</sup> e pode ser estimada de forma fiável em amostras de fezes armazenadas por um período máximo de sete dias à temperatura ambiente<sup>3)</sup>.

Vários tipos de doença, como as infeções bacterianas, a artrite reumatoide e o cancro, levam à ativação dos PMN e ao aumento dos níveis de Calprotectina no plasma, no líquido cefalorraquidiano, no líquido sinovial, no líquido sulcular, na urina ou em outros materiais humanos<sup>4)</sup>.

A concentração de Calprotectina nas fezes está correlacionada com o número de PMN que migram para o lúmen intestinal<sup>5)</sup> e pode ser detetada de forma fiável mesmo em pequenas amostras aleatórias de fezes (com menos de uma grama)<sup>3,6)</sup>. As doenças orgânicas do intestino emitem um sinal forte de Calprotectina, isto é, apresentam frequentemente elevações entre cinco e vários milhares de vezes superiores ao nível de referência mais alto nos indivíduos saudáveis<sup>3,7-9)</sup>, o que indica uma inflamação intestinal. As doenças inflamatórias do intestino (DII), como a colite ulcerosa e a doença de Crohn, podem surgir entre a primeira infância e a idade adulta tardia e o diagnóstico é muitas vezes tardio devido a sintomas vagos ou à relutância dos doentes em realizar uma endoscopia e uma biopsia.



Os distúrbios funcionais, como a síndrome do intestino irritável (SII), não provocam um aumento das concentrações de Calprotectina fecal, ao contrário dos distúrbios abdominais orgânicos, como as DII. Os doentes com distúrbios abdominais funcionais e orgânicos podem apresentar sintomas semelhantes e um simples exame clínico pode não ser suficiente para encontrar um diagnóstico específico. Um teste de Calprotectina fecal é um método objetivo, económico, não invasivo e simples que pode ajudar a determinar quais os doentes que devem ser submetidos a exames adicionais, como uma endoscopia. Os sintomas abdominais são muito comuns nas crianças e nos adultos e um resultado negativo obtido pelo BIOHIT Calprotectin pode excluir doenças inflamatórias do intestino com um elevado grau de probabilidade <sup>7)</sup>.

A recuperação da mucosa é o grande objetivo do tratamento das DII e um teste de Calprotectina fecal permite saber quando tal é conseguido. Muitos doentes que sofrem de DII em remissão clínica com níveis normais da proteína C reativa (PCR) apresentam ainda uma inflamação persistente <sup>10)</sup>, o que se reflete num aumento da Calprotectina fecal. Estes doentes apresentam um maior risco de recaída no espaço de alguns meses <sup>11)</sup>. Se for possível conseguir a recuperação da mucosa, o risco de recaída será reduzido, bem como a necessidade de uma grande cirurgia abdominal <sup>12,13)</sup>. A normalização dos níveis de Calprotectina significa que foi conseguida a recuperação da mucosa <sup>14)</sup>.

### **3. PRINCÍPIO DO TESTE**

O teste BIOHIT Calprotectin baseia-se na preparação de um extrato de fezes com o Tampão de extração de fezes. O nível de Calprotectina é determinado por meio da submissão do extrato a um teste num ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específico para a Calprotectina. No ELISA, as amostras e as soluções padrão são incubadas em poços de titulação separados revestidos com anticorpos monoclonais que ligam a Calprotectina. Após a incubação e a lavagem dos poços, permite-se que a Calprotectina ligada reaja com anticorpos específicos da Calprotectina purificados por imunoafinidade e marcados com enzima. Após esta reação, a quantidade de enzimas ligadas aos poços de titulação é proporcional à quantidade de Calprotectina na amostra ou na solução padrão, que é determinada por incubação com um substrato para a enzima que produz um produto colorido. A intensidade da cor é determinada por absorvância através da utilização de um leitor de placas ELISA e é proporcional à concentração de Calprotectina nas soluções calibradores

nas amostras. O ensaio é calibrado utilizando Calprotectina purificada de extrato de leucócitos.

#### 4. MATERIAIS

##### 4.1. Reagentes fornecidos com o kit

**Placa de titulação revestida:** 12 faixas, 8 poços por faixa, revestidas com anticorpos monoclonais de rato purificados por afinidade e específicos para a Calprotectina. A placa está armazenada numa embalagem selada com dessecante. Não combine tiras/poços de microplacas diferentes, mesmo que tenham o mesmo número de lote.

**DILBUF 5x** Tampão de diluição da amostra (conc. 5x) \*\*\*: 1 x 20 mL, concentrado 5x, para ser diluído com água destilada/desionizada; pH 8 ± 0,2, solução amarela, frasco com tampa azul.

**WASH 20x** Tampão de lavagem (conc. 20x) \*: 1 x 50 mL, concentrado 20x, para ser diluído com água destilada/desionizada, destinado à lavagem dos poços de titulação; pH 7,8 ± 0,2, solução límpida, frasco com tampa branca.

**FEC EXTRBUF 2.5x** Tampão de extração de fezes (conc. 2,5x) \*\*: 2 x 90 mL, concentrado 2,5x, para ser diluído com água destilada/desionizada; pH 8 ± 0,2, solução límpida, frascos com tampas brancas.

**CAL 1-5** calibradores de Calprotectina e **BLANK** \*\*\*: 6 frascos de 1 mL, prontos a utilizar; solução amarela, frascos com tampas de cores diferentes:

Solução em branco: tampa azul	0	ng/mL
Calibrador 1: tampa verde	7.8	ng/mL
Calibrador 2: tampa amarela	31.3	ng/mL
Calibrador 3: tampa vermelha	62.5	ng/mL
Calibrador 4: tampa branca	125	ng/mL
Calibrador 5: tampa preta	500	ng/mL

**CONTROL LOW** **CONTROL HIGH** Controlos “Baixo” e “Alto” \*\*\*: 2 frascos de 1 mL, prontos a utilizar; solução amarela; solução baixo: frasco com tampa castanha; Controlo alto: frasco com tampa roxa.

**CONJ** Solução do conjugado \*\*\*\*: 13 mL de anticorpos policlonais de

coelho purificados por imunoafinidade e marcados com fosfatase alcalina contra a Calprotectina, pronto a utilizar; solução vermelha, tubo de reagente Dynex de 25 mL com tampa branca.

**SUBS** **Solução do substrato (pNPP):** 113 mL, pronto a utilizar; solução de cor límpida a ligeiramente amarela, frasco opaco com tampa amarela.

*Nota:* em caso de utilização de um instrumento Dynex, é necessário transferir o substrato para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste.

- \* Contém Kathon a 0,1 %
- \*\* Contém azida de sódio a <0,1 %
- \*\*\* Contém Kathon a 0,1 % e azida de sódio a <0,1 %
- \*\*\*\* Contém metilisotiazolona a 0,02 % e bromonitrodioxano a 0,02 %

#### **4.2. Materiais fornecidos com o kit**

- 2 tampas de incubação
- 1 instruções de uso
- 1 disposição da placa

#### **4.3. Materiais necessários mas não fornecidos**

- Água destilada/desionizada
- Dispositivos de extração (consultar secção 7.1.1 e 7.1.2)
- Ansas de inoculação descartáveis e quebráveis (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)
- Balança digital de precisão (40 – 150 mg) (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)
- Tubos de poliestireno descartáveis com tampa de rosca, 5 mL (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)
- Agitador Vortex (com um adaptador de tubo) ou agitador até 1000 rpm quando usado para extrair uma amostra de fezes na seção 7.1.2
- Tubos descartáveis para diluição das amostras: tubos Eppendorf ou semelhantes (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Pipetas para distribuir volumes entre 10 e 1000 µL (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Pipeta repetitiva ou pipeta multicanal, 100 µL (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Lavador de poços de microplacas ou pipeta multicanal, 300 µL

- (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Agitador de placas (500 – 700 rpm) (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Temporizador (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Leitor de microplacas, filtro de 405 nm (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- 1M NaOH (solução de paragem; opcional)

## **5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO**

Se forem armazenados numa embalagem fechada à temperatura de 2—8 °C, os reagentes do kit permanecem estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo.

As placas, reagentes e tampões concentrados abertos permanecem estáveis por um máximo de três meses quando armazenados à temperatura de 2—8 °C.

Se forem preparadas em recipientes limpos, as soluções de trabalho (1x) do Tampão de lavagem, do Tampão de diluição da amostra e do Tampão de extração de fezes podem ser armazenadas à temperatura de 2—8 °C pelo período máximo de um mês.

Evitar a exposição a temperaturas elevadas e à luz solar direta.

## **6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES**

Todos os reagentes, amostras e controlos devem estar à temperatura ambiente (18—25 °C) antes da realização do teste.

### **6.1. Faixas da placa de titulação revestidas**

As faixas da placa prontas a utilizar estão revestidas com anticorpos monoclonais de rato purificados por afinidade e específicos para a Calprotectina. As faixas não utilizadas devem ser removidas da estrutura e fechadas imediatamente na bolsa de alumínio, juntamente com o dessecante fornecido. Armazenar a 2—8 °C.

### **6.2. Tampão de diluição da amostra**

Diluir o Tampão de diluição da amostra concentrado 5x através da adição de 1 parte (20 mL) a 4 partes (80 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 100 mL. Misturar bem. Armazenar o Tampão de diluição da amostra diluído num recipiente

fechado a 2—8 °C.

*Nota:* em caso de utilização de um sistema automático de ELISA Dynex DS2 ou DSX, é necessário transferir o Tampão de diluição da amostra para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste.

### **6.3. Tampão de lavagem**

Diluir o Tampão de lavagem concentrado 20x através da adição de 1 parte (50 mL) a 19 partes (950 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 1000 mL. Misturar bem. Armazenar o Tampão de lavagem diluído num recipiente fechado a 2—8 °C.

### **6.4. Tampão de extração de fezes**

Diluir o Tampão de extração de fezes concentrado 2,5x através da adição de 1 parte (90 mL) a 1,5 partes (135 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 225 mL. Misturar bem. Armazenar o tampão diluído num recipiente fechado a 2—8 °C.

### **6.5. Calibradores, solução em branco e controlos**

Os frascos rotulados com solução em branco, calibrador e controlos contêm 1 mL cada de uma solução pronta a utilizar. A concentração de Calprotectina está impressa no rótulo de cada frasco. Os frascos encaixam diretamente nos sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX.

### **6.6. Solução do conjugado**

O tubo contém 13 mL de anticorpos de coelho purificados por imunoafinidade e marcados com fosfatase alcalina (ALP) contra a Calprotectina num tampão com estabilizadores, conservantes e um corante vermelho inerte. A solução está pronta a utilizar. O tubo encaixa diretamente nos sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX.

### **6.7. Solução do substrato**

O frasco contém 13 mL de solução de p-nitrofenilfosfato (pNPP). A solução está pronta a utilizar e deve ser armazenada no frasco opaco original.

*Nota:* em caso de utilização de um sistema automático de ELISA Dynex DS2 ou DSX, é necessário transferir a Solução do substrato enzimático para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste.

## 7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O teste BIOHIT Calprotectin foi concebido e validado principalmente para amostras de fezes.

### 7.1. Amostras de fezes

Uma vez que a Calprotectina é muito estável em fezes, os doentes podem recolher pequenas amostras de fezes em casa. Recolher 1—5 g (aproximadamente uma colher de chá), colocar num recipiente limpo adequado e entregar no laboratório o mais rapidamente possível, no prazo máximo de quatro dias. Quando colocada num recipiente aprovado para transporte, a amostra pode ser enviada por correio normal, sem ser necessária refrigeração. Deve ser evitada a exposição a temperaturas superiores a 30 °C.

As amostras também podem ser armazenadas congeladas, a uma temperatura igual ou inferior a -20 °C por até 1,5 ano, até serem entregues ou enviadas por correio. As amostras congeladas devem ser descongeladas e estabilizadas à temperatura ambiente antes da extração e do teste. Tenha em atenção que a congelação de amostras de fezes pode provocar em alguns casos um aumento dos níveis de Calprotectina, muito provavelmente devido à libertação dos granulócitos.

*Nota:* antes da extração da pequena quantidade necessária, a amostra de fezes deve ser bem homogeneizada com uma espátula, por exemplo.

Para a extração, recomendamos a utilização dos tubos de extração BIOHIT ou do outro método descrito abaixo (capítulo 7.1.1 e 7.1.2). Realizar a extração de acordo com o folheto informativo do dispositivo/método de extração escolhido. Podem ser utilizados outros métodos e dispositivos validados pelo cliente.

### 7.1.1. Extração com os tubos de extração BIOHIT

Instruções de utilização: leia o folheto informativo do produto com a Ref. 602270.



### 7.1.2. Extração através do método de pesagem (sem dispositivo de extração)

1. Pesar (avaliar a tara de) um tubo com tampa de rosca vazio com uma ansa de inoculação.
2. Retirar aproximadamente 100 mg (entre 40 e 120 mg) de fezes com a ansa de inoculação e colocá-las no tubo com tampa de rosca. Evitar a extração de material sólido e não digerido, como fibras e sementes.
3. Pesar o tubo e a ansa com as fezes para obter o peso líquido das fezes.
4. Quebrar ou cortar a metade superior da haste da ansa e deixar a metade inferior no interior do tubo.
5. Adicionar o tampão de extração até obter uma relação peso/ volume de 1:50, por exemplo, 4,9 mL de tampão para 100 mg de fezes. Fechar o tubo.
6. Misturar energicamente durante 30 segundos num agitador vortex.
7. Continuar a mistura num agitador (a aprox. 1000 rpm) durante 30±5 minutos, com a ansa no interior do tubo a servir de agitador.
8. Deixar repousar alguns minutos na bancada para que as partículas assentem e pipetar cuidadosamente a partir da parte superior do tubo. Não é necessária centrifugação. No entanto, se for necessária uma solução sem partículas, pode ser realizado um pequeno ciclo de centrifugação.
9. O extrato, que representa uma diluição de 1:50 (peso/volume) da amostra de fezes, está pronto para a diluição e o teste.
10. Para armazenar, transferir cerca de 0,5 mL para um novo tubo. Os extratos podem ser armazenados a 2—8 °C durante, pelo menos, cinco dias ou congelados a menos de -20 °C por até 12 meses.

## 8. DISPOSIÇÃO SUGERIDA DA PLACA

	1	2	3	4	etc.	
<b>A</b>	Calibrador 5 500 ng/mL	Calibrador 5 500 ng/mL	Amostra 1	Amostra 1		
<b>B</b>	Calibrador 4 125 ng/mL	Calibrador 4 125 ng/mL	Amostra 2	Amostra 2		
<b>C</b>	Calibrador 3 62,5 ng/mL	Calibrador 3 62,5 ng/mL	Amostra 3	Amostra 3		
<b>D</b>	Calibrador 2 31,3 ng/mL	Calibrador 2 31,3 ng/mL	Amostra 4	Amostra 4		
<b>E</b>	Calibrador 1 7,8 ng/mL	Calibrador 1 7,8 ng/mL	Amostra 5	Amostra 5		
<b>F</b>	Solução em branco 0 ng/mL	Solução em branco 0 ng/mL	Amostra 6	Amostra 6		
<b>G</b>	Controlo "Baixo"	Controlo "Baixo"	Amostra 7	Sample 7		
<b>H</b>	Controlo "Alto"	Controlo "Alto"	Amostra 8	Amostra 8		

Disposição sugerida da placa ELISA para calibradores, controlos e amostras com procedimento manual. Recomenda-se a utilização de poços duplicados para maior fiabilidade dos resultados. Uma placa completa tem capacidade para 40 amostras.

## 9. PROCEDIMENTO DE TESTE

O seguinte procedimento destina-se aos testes manuais. Os protocolos validados para os sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX estão disponíveis mediante pedido. Tenha em atenção que os frascos dos calibradores, da solução em branco e do controlo positivo, bem como do tubo do conjugado, encaixam diretamente nos sistemas automáticos de ELISA DS2 ou DSX. Podem ser utilizados outros instrumentos ELISA automáticos, mas estes terão de ser validados pelo cliente.



## 9.1 Notas do procedimento

- Preparação: Leia cuidadosamente o instruções de uso antes de realizar o ensaio. A fiabilidade do resultado depende da observância rigorosa do protocolo de teste descrito. Antes de começar o ensaio, deve ser cuidadosamente estabelecida uma disposição da placa para todas as soluções em branco, calibradores, controlos e amostras, utilizando, por exemplo, a folha fornecida no kit. Selecione o número necessário de faixas de titulação. As faixas não utilizadas devem ser fechadas novamente na bolsa de alumínio e armazenadas segundo o procedimento descrito na Secção 6.1.
- Recomenda-se uma diluição de 1:100 dos extratos de fezes. Esta diluição proporcionará resultados da amostra entre 25 mg/kg (LoQ) e 2500 mg/kg nas fezes. Os extratos com valores mais elevados de Calprotectina podem ser mais diluídos (>1:100) e testados novamente, caso seja necessário um valor. Os extratos com valores baixos de Calprotectina podem ser menos diluídos (1:50). O fator de diluição ajustado deve ser tido em conta ao fazer a conversão entre ng/mL e mg/kg (consultar a secção 10 abaixo).
- Execute todos os passos do ensaio segundo a ordem indicada e sem qualquer atraso considerável entre eles.
- Deve ser utilizada uma ponta de pipeta descartável e limpa na distribuição de cada solução padrão, controlo e amostra.
- Para obter os resultados mais fiáveis, as soluções em branco, os controlos e as amostras do doente devem ser sempre processados em duplicado.
- Todas as amostras e reagentes do kit devem ser estabilizados à temperatura ambiente (18—25 °C) antes do início do teste.

## 9.2 Procedimento ELISA

1. Diluir as amostras dos extratos de fezes numa proporção de 1:100 (por exemplo, 10 µL de amostra + 990 µL do Tampão de diluição da amostra) e misturar bem por vortex.
2. Adicionar 100 µL de cada solução em branco, calibrador, controlo e amostra diluída a poços duplicados; consultar a disposição recomendada da placa na Secção 8.
3. Cobrir a placa com tampas de incubação e incubar à temperatura ambiente durante 40±5 minutos) num agitador de placas horizontal (aproximadamente 500—700 rpm).
4. Após o período de incubação, remover o líquido e lavar os poços através da adição de 300 µL de Tampão de lavagem a cada poço. Re-

mover o máximo de líquido possível e repetir até alcançar um total de três lavagens. Em caso de utilização de um lavador de placas, verificar se todas as sondas de aspiração e enchimento estão desobstruídas para garantir a lavagem eficaz de todos os poços. Após a última lavagem, inverter a placa e passar papel absorvente pelas aberturas dos poços para remover quaisquer vestígios de Tampão de lavagem.

5. Misturar cuidadosamente o conteúdo do frasco do Conjugado antes da utilização (não agitar). Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de conjugado a cada poço, de preferência com uma pipeta repetitiva ou multicanal.
6. Cobrir a placa com tampas de incubação e incubar à temperatura ambiente durante  $40\pm 5$  minutos) num agitador de placas horizontal (aproximadamente 500—700 rpm).
7. Repetir três vezes os passos de lavagem descritos acima com 300  $\mu\text{L}$  de Solução de lavagem por poço.
8. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de Solução do substrato a cada poço, de preferência com uma pipeta repetitiva ou multicanal.
9. Incubar a placa à temperatura ambiente (sem agitar) durante 20—30 minutos, protegido da luz.
10. Opcional: adicionar 100  $\mu\text{L}$  de solução de paragem 1M NaOH a cada poço, caso seja necessário um período de incubação fixo.
11. Ler os valores da densidade ótica (DO) a 405 nm com um leitor ELISA. Agitar brevemente a placa (2—3 segundos) antes da leitura, caso o leitor de placas tenha esta opção.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Valores de controlo de qualidade

- Deve ser incluída uma nova curva padrão em cada execução.
- Os controlos positivos devem ser incluídos em cada execução. O valor dos controlos deve estar dentro dos limites impressos nos rótulos dos frascos.
- Como ponto de referência, o valor de DO do Calibrador 5 (500 ng/mL) deve ser  $\geq 1,6$  e o valor de DO da Solução em branco (0 ng/mL) deve ser  $\leq 0,25$ . Na figura 1, é apresentada uma curva representativa do Calibrador.

### 10.2 Cálculo dos resultados

Cálculo da concentração de Calprotectina em amostras de fezes dos doentes:

1. Calcular os valores médios de DO de todos os poços duplicados (so-

lução em branco, calibradores e amostras).

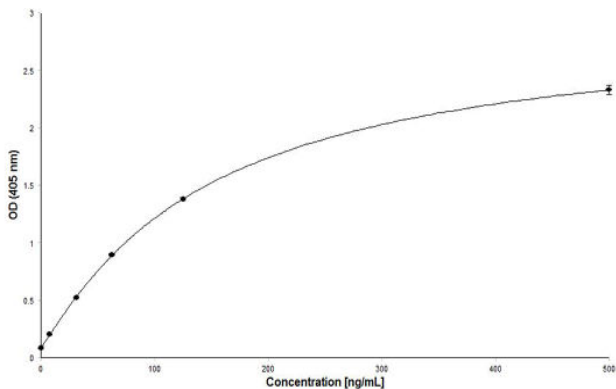
2. Representar graficamente o valor da solução em branco e de cada calibrador e concentração (ng/mL) no eixo x contra o seu valor médio de DO no eixo y para obter uma curva padrão. **Recomenda-se a utilização de uma função de ajuste da curva de 4 parâmetros** (ver figura 1 abaixo). Se for necessário um eixo x logarítmico, deve ser usado um valor de 0,001 ng/mL para a solução padrão A (0 ng/mL).
3. Utilizar a curva de calibração para determinar a concentração de Calprotectina nas amostras diluídas (ng/mL) com base nos seus valores de DO.
4. **Multiplicar a concentração de Calprotectina (ng/mL) nos extratos de fezes diluídos por 5 para fazer a conversão em mg/kg de Calprotectina na amostra de fezes original.**

Este fator corrige a diluição total de 1:5000 (1:50 durante o procedimento de extração e a diluição seguinte de 1:100 dos extratos) e converte o valor de ng/mL em mg/kg.

*Exemplo: se uma amostra de extrato diluída apresentar um valor de 100 ng/mL, a concentração na amostra de fezes original era de  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

*Nota: se os extratos tiverem sido diluídos numa proporção superior (ou inferior) à proporção de 1:100, o fator de diluição adicional deve ser tido em consideração no cálculo.*

Figura 1: Uma curva padrão representativa com um ajuste de curva de 4 parâmetros.



→ Calprotectin std: A=0.006151 B=1.0908 C=146.71 D=2.9173 d=0.0048461 r=0.99990

### 10.3 Interpretação dos resultados

A literatura publicada expôs os seguintes valores de Calprotectina em amostras de fezes <sup>3, 25</sup>:

Valor normal	5 – 50 mg/kg
Positive value	> 50 mg/kg
Valor médio em doentes com cancro colorretais sintomáticos	350 mg/kg
Doença inflamatória do intestino sintomática ativa	200 – 40 000 mg/kg

Tenha em atenção que um diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado de um único teste. O diagnóstico deve ter em consideração o historial clínico e os sintomas.

## 11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado de um único teste.

## 12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Nota: Todos os estudos de verificação do projeto foram realizados por meio de testes manuais em amostras de extratos de fezes (diluídas a 1:100) utilizando o procedimento ELISA descrito na Seção 9.

### Precisão interensaio e intraensaio dos extratos de fezes:

Precisão interensaio, extratos de fezes*		Precisão intraensaio, extratos de fezes**	
Concentração nas fezes (mg/kg)	% CV	Concentração nas fezes (mg/kg)	% CV
32.1	13	28.7	6.7
171	6.0	173	3.6
368	4.8	385	4.1
583	6.1	592	4.0
1215	6.8	1210	4.2
1977	7.9	1966	5.0

\*Resultados médios de três laboratórios distintos, com cada um a testar dois lotes de kit diferentes: foram testadas seis amostras num total de 10 vezes durante cinco dias

\*\* Resultados médios de três laboratórios distintos, com cada um a testar dois lotes de kit diferentes: foram testadas seis amostras com 10 réplicas numa execução

### Recuperação:

Fezes: 85—105 %; testadas com extrato de fezes fortificado com Calprotectina purificada em cinco níveis diferentes.

### Limite de quantificação:

5 ng/mL; testado com extrato de fezes e Calprotectina purificada. As amostras foram analisadas cinco vezes durante cinco dias. Neste nível, o CV médio das diferentes amostras e determinações era de 12 %.

### Limite de detecção:

< 5 ng/mL; calculado como média (Tampão de diluição da amostra; n=32) + 5x DP.

### **Interferência**

Não foi observada qualquer interferência sobre o ELISA por parte de medicamentos utilizados vulgarmente. Prednisolona, Imurel, Salazopirina e Ciprofloxacina.

### **Precisão de extração**

Foram extraídas duas amostras de fezes 10 vezes cada, segundo o procedimento descrito na secção 7.1.2, e os extratos foram analisados no ELISA. Resultados médios de três laboratórios distintos e um lote de kit:

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>	<b>% CV</b>
Low	130	8.7
High	1357	8.8

### **Linearidade, extratos de fezes**

Os extratos de fezes (n=10) foram diluídos a 1:100 e 1:1000 e analisados no ELISA. Resultados médios:

<b>Diluição</b>	<b>% da diluição de 1:100</b>
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Tenha em atenção que foi observada uma variação amostral na linearidade.

### 13. AVISOS E PRECAUÇÕES

- Em conformidade com o parágrafo 2b do artigo 1.º da diretiva europeia 98/79/CE, a utilização dos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro é prevista pelo fabricante para assegurar a adequação, o desempenho e a segurança do produto. Por conseguinte, o procedimento de teste, as informações, as precauções e os avisos presentes nas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidos. A utilização de kits de teste com analisadores e equipamento semelhante não foi validada. Não é permitida qualquer alteração a nível de conceção, composição e procedimento de teste, nem a utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante. O utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é responsável por resultados falsos e incidentes decorrentes dessas alterações. O fabricante não é responsável por quaisquer resultados obtidos por meio da análise visual das amostras do doente.
- Apenas para utilização no diagnóstico in vitro.
- Todos os componentes de origem humana utilizados na produção destes reagentes foram submetidos a um teste para deteção de anticorpos anti-VIH, anticorpos anti-VHC e antigénio da hepatite B (Bag) e revelaram-se não reativos. Não obstante, todos os materiais devem ser considerados e manuseados como potencialmente infecciosos.
- Não utilizar reagentes ou faixas de lotes de produção diferentes.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes com reagentes deste kit de teste.
- Não utilizar os reagentes depois do prazo de validade indicado no rótulo ou 1 mês depois da preparação de reagentes concentrados em soluções de trabalho.
- Utilizar apenas pontas de pipeta, distribuidores e acessórios de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas de rosca dos frascos de reagentes para evitar a contaminação cruzada.
- Fechar bem os frascos de reagentes imediatamente após a utilização para evitar a evaporação e a contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e o armazenamento posterior, verificar os frascos dos conjugados, das soluções calibradores e dos controlos quanto à existência de uma possível contaminação microbiana antes da reutilização.
- Para evitar a contaminação cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as soluções calibradores, os controlos e as amostras dos extratos de fezes e dispensar o conjugado e o substrato com precisão

no fundo dos poços de microplacas sem salpicos.

- Alguns reagentes contêm azida de sódio numa concentração inferior a 0,1 % (p/v) e/ou Kathon a 0,1 %.
- Armazenar a solução do substrato no frasco opaco original; a solução deve apresentar uma cor límpida a ligeiramente amarela. Misturar cuidadosamente antes da utilização.
- O BIOHIT Calprotectin foi concebido para ser utilizado por pessoal qualificado com formação em boas práticas de laboratório.

### **13.1 Considerações relativas à eliminação**

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A eliminação deste género de resíduos é regulamentada por leis e regulamentos nacionais e regionais. Contactar as autoridades ou empresas de gestão de resíduos locais para obter orientações em matéria de eliminação de resíduos perigosos.

### **14. GARANTIA**

O Biohit deve solucionar todos os defeitos detectados em qualquer Produto (o "Produto com defeito") que resultarem de materiais inadequados ou de fabricação negligente e que impeçam o funcionamento mecânico ou a utilização prevista dos Produtos, incluindo, sem limitação, as funções descritas nas especificações Biohit para os Produtos. NO ENTANTO, QUALQUER GARANTIA SERÁ CONSIDERADA NULA SE A FALHA FOR CAUSADA POR TRATAMENTO INADEQUADO, UTILIZAÇÃO INADEQUADA, DANOS ACIDENTAIS, ARMAZENAMENTO INCORRETO OU USO DOS PRODUTOS PARA OPERAÇÕES FORA DE SUAS LIMITAÇÕES ESPECIFICADAS OU FORA SUAS ESPECIFICAÇÕES, CONTRÁRIAS ÀS INSTRUÇÕES DETERMINADAS NO MANUAL DE INSTRUÇÕES.

O período dessa garantia é definido no manual de instruções dos Produtos e começará a partir da data em que o Produto relevante for enviado pela Biohit. Esse kit de diagnóstico Biohit foi fabricado de acordo com os protocolos de gestão de qualidade ISO 9001/ISO 13485.

Em caso de litígio de interpretação texto em Inglês aplica.

Em caso de qualquer incidente grave em relação ao produto, entre em contato com o fabricante.



## 15. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO

Kit BIOHIT Calprotectin para análise de Calprotectina nas fezes

*Consultar as secções 7—9 no folheto informativo para obter uma descrição completa dos passos práticos.*

### Extração

- Realizar a extração de acordo com um dos métodos descritos na secção 7.1.1 – 7.1.2

### ELISA (procedimento manual)

- Diluir os extratos de fezes na proporção de 1:100 no Tampão de diluição da amostra
- Adicionar 100 µL de calibradores, controlos, soluções em branco e amostras à placa ELISA
- Incubar num agitador de placas à temperatura ambiente durante 40±5 minutos)
- Lavar os poços três vezes com 300 µL de Tampão de lavagem
- Adicionar 100 µL de solução de Conjugado a cada poço
- Incubar num agitador de placas à temperatura ambiente durante 40±5 minutos)
- Lavar os poços três vezes com 300 µL de Tampão de lavagem
- Adicionar 100 µL de Solução de substrato a cada poço
- Incubar com uma cobertura durante 20—30 minutos
- Opcional: adicionar 100 µL de 1M NaOH a cada poço
- Ler os valores de DO a 405 nm com um leitor ELISA
- Calcular os resultados por meio da utilização de um ajuste de curva de 4 parâmetros (ng/mL)
- $\text{mg/kg nas fezes} = \text{ng/mL} \times 5$

Para qualquer pergunta, contactar [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

## **DATE OF ISSUE**

BIOHIT Calprotectin kit insert

Version 05, 09-2023

## **REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÈRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS**

1. Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134: 1-6. Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p. 187- 210.
2. Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798.
3. Johne B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50:113-123.
4. Røseth AG et al.: Correlation between fecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54.
5. Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292: 41-54.
6. Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
7. Bunn SK et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33: 14-22.
8. Bjarnason I and Sherwood R: Fecal calprotectin: A significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Paediatric Gastroenterology Nut* 2001; 33: 11-13.
9. Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. *Internist* 2010;51:1492-1498.
10. Tibble JA et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.

11. Schnitzler F et al.: Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1295-1301.
12. Björkesten CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(4): 947-953.
13. Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58:176-80.
14. Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. *Med Clin North Am*. 2010;94:1-18.
15. Pineton de Chambrun G et al.: Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(1):15-29.
16. Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:338-346.
17. Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics*, 2010;11(3):421-437.
18. Lin MV et al.: What is the optimal therapy for Crohn's disease: step-up or top-down? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):167-180.
19. Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010;15(2):309-322.
20. Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? *Dig Dis* 2010;28(3):548-555.
21. Schwartz M and Regueiro M: Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011 Feb;13(1):95-100.

## **ORDERING INFORMATION**

BIOHIT Calprotectin kit insert

REF 602260



Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

E-mail: [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

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