

RIDASCREEN[®] Calprotectin

Art. Nr.: G09036



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Anwendungsbereich

Für die *In-vitro*-Diagnostik. Der RIDASCREEN® Calprotectin ist ein Enzym-Immunoassay zum quantitativen Nachweis von humanem Calprotectin in Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Calprotectin ist ein Kalzium-bindendes Protein, das u.a. in neutrophilen Granulozyten gebildet und bei Entzündungsgeschehen freigesetzt wird.

Calprotectin im Stuhl dient als Biomarker für entzündliche Prozesse sowie für neoplastische Veränderungen im Gastrointestinaltrakt.

Calprotectin (auch MRP-8/14, Calgranulin A/B bzw. S100A8/A9 genannt) ist ein Kalzium- und Zink-bindendes Protein, das zur S100-Proteingruppe gehört.

Unter physiologischen Bedingungen bindet Calprotectin Kalzium; diese Kalziumbindung bedingt die hohe Stabilität gegenüber Hitze und Proteolyse.

Calprotectin wird sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch von Monozyten gebildet. Im Zytosol von Neutrophilen liegt Calprotectin in Konzentrationen von 5-15 mg/l vor und stellt etwa 60% der löslichen cytosolischen Proteine bzw. 5% des Gesamtproteins.

Die biologische Funktion von Calprotectin ist nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass Calprotectin eine Funktion beim Schutz der Zelle vor leukozytären und bakteriellen Proteasen ausübt. Außerdem wird aufgrund der Zink-bindenden Eigenschaft eine antibakterielle Wirkung angenommen. Auch zeigt Calprotectin intra- und extrazelluläre regulatorische Eigenschaften im Entzündungsgeschehen.

Bei Vorliegen einer entzündlichen intestinalen Erkrankung wandern Granulozyten ins Darmlumen und setzen Calprotectin frei, welches mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Die Konzentration von Calprotectin im Stuhl korreliert mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die in das Darmlumen migrieren und hier Calprotectin freisetzen. Somit ist die Konzentration von Calprotectin im Stuhl ein Maß für die Anzahl der Granulozyten im Darmlumen und zeigt auch das Ausmaß eines entzündlichen Geschehens im Darm an.

Die besondere klinische Relevanz der Bestimmung von Calprotectin im Stuhl liegt darin, Entzündungen im Darmtrakt sicher diagnostizieren zu können. Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) lassen sich symptomatisch häufig nur sehr schwer von Patienten unterscheiden, die unter dem Reizdarm-Syndrom leiden. Eine Bestimmung der Calprotectin-Konzentration im Stuhl gibt hier sicher Aufschluss über das Vorliegen einer Entzündung im Darm. Somit können vielen Reizdarm-Patienten durch den Einsatz dieses Biomarkers nicht erforderliche Koloskopien erspart werden.

Zahlreiche Publikationen konnten zeigen, dass der Nachweis von Calprotectin im Stuhl sehr gut mit den histologischen und endoskopischen Befunden der Krankheitsaktivität bei CED-Patienten korreliert. Deshalb dient die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl auch dazu, bei Patienten mit chronischen Entzündungen den Therapieerfolg objektiv zu dokumentieren sowie durch die Überwachung von Patienten im symptomfreien Intervall ein Rezidiv frühzeitig festzustellen und einzudämmen.

Bestimmung von Calprotectin im Stuhl

- sichere Differenzierung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Reizdarm-Syndrom
- frühzeitige Erkennung von Entzündungsschüben im Darmtrakt
- objektive Dokumentation der Entzündungsstärke zur Verlaufskontrolle unter Therapie
- Marker für akute Darmentzündungen

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Calprotectin werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen humanes Calprotectin gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschriff und eine zweite Inkubation zusammen mit einem monoklonalen Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei Anwesenheit von Calprotectin bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, Calprotectin und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschriff entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die gemessene Extinktion ist proportional zur in der Probe vorhandenen Calprotectin-Konzentration.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalem Antikörper (Maus) gegen humanes Calprotectin
Extract	2x 100 ml	Extraktionspuffer (3-fach konz.); Tris-Puffer; enthält 0,05% NaN ₃
Diluent 3	100 ml	Probenverdünnungspuffer; Protein-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1% NaN ₃ ; gebrauchsfertig; rot gefärbt
Wash	100 ml	Waschpuffer (10-fach konz.); Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1% Thimerosal, 0,1% Detergens
Calibrator <i>transparenter Deckel</i>	1 ml	Kalibrator (bei Verwendung der 1-Punkt-Kalibration zum Standardabgleich); enthält 0,1% NaN ₃ ; gebrauchsfertig;
Standard 1 bis Standard 5 <i>weißer Deckel</i>	1 ml	5 Standards (bei Verwendung der Standardkurve); Calprotectin-Konzentrationen der Standards 1 bis 5: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; enthält 0,1% NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Control + <i>roter Deckel</i>	1 ml	Positivkontrolle; enthält 0,1% NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Low control + <i>grüner Deckel</i>	1 ml	Low-Positivkontrolle; enthält 0,1% NaN ₃ ; gebrauchsfertig
Conjugate	12 ml	Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Antikörper (Maus) in stabilisierender Proteinlösung; gebrauchsfertig
SeroSC	12 ml	Substrat; Wasserstoffperoxid / Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem jeweiligen Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C für 4 Wochen haltbar. Der verdünnte Extraktionspuffer ist bei einer Lagerung bei 2 - 8 °C für 6 Monate, maximal bis zum Erreichen des Verfallsdatums des

Konzentrates, haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel, der die Mikrotiterstreifen enthält, ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Feinwaage oder RIDA[®]TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016)
- Vortex-Mixer (optional, siehe 9.4.)
- Mikropipette für 20 - 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm; Referenzfilter 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Die Stuhlproben sollten als potenziell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1% Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Kalibrator, Standards, Positivkontrolle, Low-Positivkontrolle, Extraktions- und Probenverdünnungspuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,05% bzw. 0,1% NaN_3 . Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid (Substrat) kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden! Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden. VORSICHT: Um die Bildung giftiger Gase zu vermeiden, muss Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Die Stuhlproben sollten wenn möglich gekühlt transportiert und bis zum Testbeginn bei 2 - 8 °C gelagert werden. Erfolgt die Abarbeitung nicht unmittelbar nach Eingang (innerhalb von 3 Tagen), wird eine Lagerung bei -20 °C oder kälter empfohlen. Beim Einfrieren der Stuhlprobe können in der Stuhlprobe vorhandene neutrophile Granulozyten aufplatzen und Calprotectin freisetzen. Deshalb kann die Konzentrationsbestimmung aus eingefrorenen im Vergleich zu frischen Proben zu leicht erhöhten Werten führen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Stuhlproben sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® Calprotectin auftreten können.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte Plate unbedingt auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zum Ausschluss von Kreuzkontamination zu vermeiden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrats **Wash** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:10). Hierfür werden 100 ml des Konzentrats in einen 1000 ml Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.3. Herstellung des Extraktionspuffers

1 Teil des Extraktionspuffer-Konzentrats **Extract** (100 ml) wird mit 2 Teilen destilliertem Wasser (200 ml) gemischt (1:3).

9.4. Vorbereitung der Proben

Die Stuhlproben sollten bis zur Abarbeitung möglichst durchgehend bei 2 - 8 °C gelagert werden. Bei einer längeren Aufbewahrung (> 3 Tage) sind diese bei -20°C oder kälter zu lagern. Gefrorene Proben sollten langsam auf Raumtemperatur gebracht werden.

9.4.1. Probenaufarbeitung und –suspension durch Einwaage

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen werden 100 mg Stuhlprobe eingewogen und anschließend 5 ml des verdünnten Extraktionspuffers dazu pipettiert (1:50-Verdünnung).

Es können zwischen 80 - 130 mg der Stuhlprobe eingewogen werden und zur Gewährleistung eines konstanten Verdünnungsverhältnisses (1:50) die Volumina der Extraktionspuffermengen in Abhängigkeit von der eingewogenen Stuhlprobe variabel eingesetzt werden (siehe Tab. 1).

Tab.1: Angaben zu den benötigten Mengen an verdünntem Extraktionspuffer, abhängig von der jeweils eingewogenen Stuhlmenge

Einwaage [mg]	Volumen [ml]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Bei Resuspension im konstanten Extraktionspuffervolumen von 5 ml muss der dabei variable Verdünnungsfaktor bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt werden (siehe Tab. 2).

Tab.2: Angaben des Verdünnungsfaktors bei konstanter Zugabe an verdünntem Exktraktionspuffer (5 ml), abhängig von der jeweils eingewogenen Stuhlmenge

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor [ml]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt unabhängig von der Einwaage-Methode durch gründliches Mischen auf einem Vortexer. Bei flüssigem Stuhl werden genau 100 µl in eine Pipette aufgesaugt und in genau 5 ml vorgelegtem, verdünnten Extraktionspuffer suspendiert.

Die Proben sollten nach Zugabe des Extraktionspuffers 5 min bei RT inkubieren und danach erneut gründlich gevortext werden. Im Anschluss muss das Homogenisat zur Sedimentation grober Stuhlpartikel für 10 Minuten bei mindestens 3000xg zentrifugiert werden. Der Überstand des Extraktes muss für den Testeinsatz direkt weiter verdünnt und eingesetzt werden.

a. Probenverdünnung bei manueller Abarbeitung

20 µl des geklärten Überstandes werden in 980 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer Diluent | 3 weiter verdünnt (1:50). 100 µl der endverdünnten Stuhlprobe werden anschließend im Test eingesetzt.

Als Alternative zur oben beschriebenen Aufarbeitung und Homogenisierung des Probenmaterials eignet sich das RIDA®TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016, siehe 9.4.2.).

b. Probenverdünnung bei Abarbeitung am Automaten

Erfolgt die Testdurchführung auf einem DSX-ELISA-Vollautomaten der Firma Dynex, wird das hierfür erforderliche Messprotokoll auf Anfrage von der R-Biopharm AG zur Verfügung gestellt und auf dem Gerät appliziert. Die Probe wird dann, wie folgend aufgeführt, vom Gerät automatisch verdünnt.

20 µl des geklärten Überstandes werden vom ELISA-Automaten in eine Deepwell-Platte pipettiert und mit 980 µl verdünntem **Diluent | 3** verdünnt (1:50). Es folgen zwei Misch-Zyklen. In den Halterahmen der RIDASCREEN® Calprotectin-Mikrotiterplatte **Plate** wird die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen eingesetzt. Aus der Deepwell-Platte werden jeweils 100 µl der Probenverdünnung in die RIDASCREEN® Calprotectin-Mikrotiterplatte **Plate** überführt (Endverdünnung 1:2500).

Zur Testdurchführung auf anderen ELISA-Pipettierautomaten wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG.

9.4.2. Probenaufarbeitung und –suspension mit RIDA®TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016)

Als schnelle und saubere Alternative zu der unter 9.4.1. beschriebenen Probenaufarbeitung und –suspension durch Einwaage der Stuhlprobe eignet sich das RIDA®TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016). Dieses wird als Zubehör zum RIDASCREEN® Calprotectin angeboten und vereinfacht die Probenaufarbeitung erheblich.

Das mit 2,5 ml gebrauchsfertigem Extraktionspuffer vorbefüllte RIDA®TUBE Calprotectin nimmt 10 mg Stuhlprobe auf. Bei flüssigen Stuhlproben können 10 µl der Stuhlprobe mit der Pipette abgemessen und direkt in den Extraktionspuffer pipettiert werden.

Die Probennahme und –extraktion ist in der Gebrauchsanweisung, die den RIDA®TUBE Calprotectin beiliegt, detailliert beschrieben und illustriert und kann alternativ unter www.r-biopharm.de heruntergeladen werden.

Die Stuhlextrakte dürfen nicht gelagert werden, sondern müssen nach der Verdünnung direkt in den Test eingesetzt werden.

a. Probenverdünnung bei manueller Abarbeitung

100 µl der mit dem RIDA®TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016) erhaltenen Stuhlsuspension werden - wie in der Gebrauchsanleitung von GZ3016 unter Punkt 8 beschrieben - in 900 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent|3** weiter verdünnt. 100 µl der endverdünnten Stuhlprobe werden direkt im Test eingesetzt.

b. Probenverdünnung bei Abarbeitung am Automaten

Erfolgt die Testdurchführung auf einem DSX-ELISA-Vollautomaten der Firma Dynex, wird das hierfür erforderliche Messprotokoll auf Anfrage von der R-Biopharm AG zur Verfügung gestellt und auf dem Gerät appliziert.

In den Halterahmen der RIDASCREEN® Calprotectin-Mikrotiterplatte **Plate** wird die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen eingesetzt. Die mit dem Stuhlröhrchen extrahierte Stuhlsuspension wird im ELISA-Automaten auf der Mikrotiterplatte **Plate** vom Gerät automatisch 1:10 verdünnt (Endverdünnung 1:2500). Hierzu werden 10 µl der Stuhlsuspension aus dem RIDA®TUBE Calprotectin (Art. Nr. GZ3016) direkt in die Calprotectin-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 90 µl Diluent 3 **Diluent | 3** verdünnt.

Zur Testdurchführung auf anderen ELISA-Pipettierautomaten wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG.

9.5. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl Kalibrator **Calibrator** (bei Verwendung der 1-Punktkalibration; empfohlen in Doppelbestimmung) **oder** je 100 µl Standard 1 bis Standard 5 **Standard 1** – **Standard 5** (bei Verwendung der Standardkurve; empfohlen in Doppelbestimmung), je 100 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** (=Negativ-Kontrolle), Positivkontrolle **Control | +** sowie der zu untersuchenden Stuhlprobenendverdünnung in die jeweiligen Vertiefungen. Bei Verwendung der Low-Positivkontrolle **Low control | +** werden hiervon ebenfalls 100 µl in den Test eingesetzt. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.6. Erster Waschschrift

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zum Erzielen korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 9.2.) gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu achten. Ferner sollte eine nicht komplett partikelfreie Stuhlsuspension vor dem ersten Waschen manuell durch Ausschleudern aus den Kavitäten entfernt werden, um Verstopfungen der Waschnadeln zu vermeiden.

Bei den Waschsritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte gründlich auf saugfähigem, sauberem Papier oder Labortüchern ausgeschlagen werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

9.7. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Konjugat **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.8. Zweiter Waschschrift

Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Konjugat in den Kavitäten zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

9.9. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt.

Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen. Diese Proben sollten 1:10 verdünnt und erneut in den Test eingesetzt (siehe 9.5.) werden (Endverdünnung der Stuhlprobe: 1:25000).

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle muss bei jeder Testdurchführung der Kalibrator **Calibrator** (bei Verwendung der 1-Punktkalibration; empfohlen in Doppelbestimmung) **oder** die Standards 1 bis Standard 5 **Standard 1** – **Standard 5** (bei Verwendung der Standardkurve; empfohlen in Doppelbestimmung), der RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** als Negativ-Kontrolle und die Positiv-Kontrolle **Control | +** mitgeführt werden, um Reagenzien-Stabilität und die korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Die Verwendung der Low-Positivkontrolle ist optional.

Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativ-Kontrolle bei 450 nm / 620 nm kleiner als 0,05 ist und der gemittelte Extinktionswert (OD) des Kalibrators (bei Auswertung über 1-Punkt-Kalibration) innerhalb des auf dem chargenspezifischen Datenblatt angegebenen Bereiches liegt. Die Positiv-Kontrolle gibt sowohl bei der Verwendung des Kalibrators als auch der fünf Standards Auskunft über die Validität des Testes und muss innerhalb des auf dem Datenblatt angegebenen chargenspezifischen Konzentrationsbereiches liegen.

Bei der Abarbeitung des RIDASCREEN® Calprotectin auf offenen ELISA-Vollautomaten kann, je nach Automat, der gemessene OD-Wert des Kalibrators **Calibrator** (bei Auswertung über 1-Punkt-Kalibration) von dem auf dem chargenspezifischen Zertifikat vorgegebenen Bereich abweichen. Auch auf ELISA-Vollautomaten ist allein die Positivkontrolle **Control | +** für die Validität der Testergebnisse ausschlaggebend und muss daher immer mitgeführt werden. Die Verwendung der Low-Positivkontrolle **Low control | +** ist nicht zwingend erforderlich.

Eine Abweichung von den geforderten Werten sowie eine Reagenzienrübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten können ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributeur.

11. Auswertung und Interpretation

Die Bestimmung der Konzentration von Calprotectin in mg/kg Stuhl erfolgt beim RIDASCREEN® Calprotectin ELISA entweder über die 1-Punkt-Kalibration (siehe 11.1.) nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell (4PL) oder über eine Standardkurve (siehe 11.2.).

Für die Ergebnisermittlung wird die Auswertesoftware RIDA®SOFT Win.net benötigt. Die RIDA®SOFT Win.net bzw. ein Update kann auf Anfrage von der R-Biopharm AG oder über Ihren lokalen R-Biopharm-Distributeur bezogen werden.

Alternativ zur RIDA®SOFT Win.net kann auch andere Auswertesoftware, die das 4-Parameter-logistic-log-Modell zur Verfügung stellt, verwendet werden.

11.1. Ein-Punkt-Kalibrierung mit Quantifizierung nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell

Die für die 4PL-Berechnung benötigten Parameter (A - D) der Standardkurve sowie der Sollwert für Kalibrator, Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle sind auf dem, dem Testkit beiliegenden, chargenspezifischen Datenblatt aufgeführt und müssen vor einer Messung jeweils mit den Werten in der Auswertesoftware abgeglichen werden.

Die R-Biopharm AG ermittelt in der Qualitäts-Endkontrolle unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge die Standardkurve (inkl. der Parameter A - D) sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten OD-Bereich für den Kalibrator bzw. einen erlaubten Konzentrationsbereich für Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle. Der Kalibrator wird mitgeführt, um Testschwankungen

auszugleichen und um die Qualität des Testlaufes prüfen zu können. Die Positivkontrolle gibt Auskunft über die Validität des Testes.

Aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung des Kalibrators und dessen Sollwert wird durch die RIDA®SOFT Win.net intern ein Korrekturfaktor F berechnet und mit den Extinktionen der Stuhlproben verrechnet. Innerhalb der Grenzen der Standardkurve ist eine sichere und zuverlässige Bewertung der Testergebnisse möglich.

11.2. Quantifizierung über die Standardkurve

Die Auswertung des RIDASCREEN® Calprotectin kann über eine Standardkurve, die dann bei jedem Lauf mitgeführt werden muss, erfolgen. Der beispielhafte Verlauf einer Standardkurve kann dem beigefügten chargen-spezifischen Datenblatt entnommen werden.

Die R-Biopharm AG ermittelt in der Qualitäts-Endkontrolle unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge jeweils einen Sollwert und einen erlaubten Konzentrationsbereich für Positivkontrolle und Low-Positivkontrolle. Bei der Quantifizierung über die Standardkurve gibt die Positivkontrolle Auskunft über die Validität des Testes. Der vorgegebene Konzentrationsbereich der Positivkontrolle muss erreicht werden.

11.3. Testergebnis

Ab einem Cut-off Wert von > 50 mg/kg des humanen Calprotectin im Stuhl ist das Ergebnis als positiv zu bewerten. Liegen die Ergebnisse unterhalb des Cut-off Wertes, sind die Proben als negativ zu werten.

Der für Erwachsene vorgeschlagene Cut-off Wert von 50 mg/kg kann auch für Kinder im Alter zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Es wird empfohlen Proben, die bei Auswertung über 1-Punkt-Kalibrierung oder Standardkurve Calprotectin-Konzentrationen über 600 mg/kg aufweisen, weiterzuverdünnen (1:5 in Diluent 3) und erneut im Test zu vermessen.

Darüber hinaus wird empfohlen Proben, die bei Auswertung über 1-Punkt-Kalibrierung OD-Werte über 3,0 aufweisen, ebenfalls weiterzuverdünnen (1:5 in Diluent 3) und erneut im Test zu vermessen.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Calprotectin weist Epitope von humanem Calprotectin in Stuhlproben nach. Eine Diagnose darf nicht alleine aufgrund der Bestimmung der Calprotectin-Konzentrationen vorgenommen werden, sondern muss unter Einbeziehung der anamnestischen Daten des Patienten erfolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Präzision

13.1.1. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay Präzision wurde mit 4 Referenzen in je 40 Replikaten in einem Lauf getestet. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die Calprotectin-Konzentrationen über den Kalibrator bzw. die Standardkurve ermittelt und daraus die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe errechnet.

Tab. 3: Intra-Assay-Präzision RIDASCREEN® Calprotectin

	Kalibrator			Standardkurve		
	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)
Referenz A	53,8	2,9	5,4	56,6	3,0	5,3
Referenz B	96,6	5,5	5,7	102,4	6,3	6,2
Referenz C	136,5	5,6	4,1	130,5	5,2	4,0
Referenz D	246,7	14,1	5,7	267,6	15,0	5,6

13.1.2. Inter-Assay-Präzision

Die Inter-Assay Präzision wurde mit 4 Referenzen in 20 Läufen (2 Läufe pro Tag) an verschiedenen Tagen von 3 Technikern in Duplikaten getestet. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die Calprotectin-Konzentrationen über den Kalibrator bzw. die Standardkurve ermittelt und daraus die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe errechnet.

Tab. 4: Inter-Assay-Präzision RIDASCREEN® Calprotectin

	Kalibrator			Standardkurve		
	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)
Referenz A	55,7	4,3	7,7	57,5	4,1	7,1
Referenz B	106,5	7,2	6,8	112,8	8,3	7,3
Referenz C	129,6	7,8	6,0	138,5	7,6	5,5
Referenz D	260,9	28,3	10,9	284,7	22,7	8,0

13.2. Extraktionspräzision

Die Extraktionspräzision wurde mit 3 Stuhlproben, die über dem Cut off liegen, in 10 Läufen (5 Tage, 2 Läufe pro Tag) an verschiedenen Tagen von 2 Technikern in Duplikaten getestet. Die Proben wurden vor jedem Lauf extrahiert und entsprechend weiterverdünnt. Aus den OD-Werten dieser Messungen wurden die Calprotectin-Konzentrationen über den Kalibrator bzw. die Standardkurve ermittelt und daraus die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen für jede Probe errechnet.

Tab. 5: Inter-Assay-Extraktionspräzision

	Kalibrator			Standardkurve		
	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)	MW (mg/kg)	SD (mg/kg)	VK (%)
Probe A	64,0	5,0	7,9	67,4	5,0	7,5
Probe B	114,1	10,3	9,0	123,2	10,7	8,7
Probe C	264,0	33,3	12,6	284,8	22,1	7,8

14. Literatur

Johne B et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1997; 50: 113-123.

Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 268: 353-363.

Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.

Tibble J et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.

Summerton CB et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 841: 841-845.

Striz I, Trebichavski I. Calprotectin – a pleiotropic molecular in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004; 53: 245-253.

Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohns disease. *Gut* 2005; 54: 364–368.

Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 450-455.

Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(6): 524-534.

Schopfer AM et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn' s disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 162–169.

Van Rheenen PF et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010; 341:c3369.