



Quantitative Fecal Calprotectin

KAPEPKT849

LOT : 150924/1



Quantitative Fecal Calprotectin ELISA

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

KAPEPKT849

IN VITRO DIAGNOSTIC

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

INTENDED USE

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

INTRODUCTION

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

ASSAY PRINCIPLE

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

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

REAGENTS: Preparation and Storage

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

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

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

1.

TLT

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

2.

Ab	HRP	CONC
----	-----	------

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

3.

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

Wash Concentrate
One bottle contains 30 mL of 30-fold concentrate. Before use the contents must be diluted with **870 mL** of demineralized water and mixed well. Upon dilution, this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide, non-mercury preservative. The diluted wash solution may be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.
4.

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

TMB Substrate
One bottle contains 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.
5.

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

Stop Solution
One bottle contains 12 mL of 2N Hydrochloric Acid (HCl). This reagent may be stored at 2 – 8°C or room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.
Caution: this component contains potentially hazardous material
6.

CAL	N
-----	---

Calprotectin Calibrators
Seven vials containing human calprotectin in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide, non-mercury preservative. **Refer to vials for exact concentration for each calibrator.** These reagents should be stored at 2 – 8 °C and are stable until the expiration date on the kit box.
7.

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

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

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

Tracer Antibody diluent
One vial containing 12 mL ready to use buffer. It should be used only for tracer antibody dilution according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.
9.

INC	BUF
-----	-----

Assay Buffer
One bottle containing 12 mL ready to use buffer. It should be used according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.
10.

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

Extraction Buffer Concentrate
One bottle containing 30 mL of 20-fold concentrate. Before use the contents must be diluted with **570 mL** of demineralized water and mixed well. Upon dilution, this yields a ready-to-use Extraction Buffer for fecal sample extraction and dilution. The diluted Extraction Buffer may be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

SAFETY PRECAUTIONS

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION

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

Note: The validation data of this test was generated by using Fecal Sample Collection Tube! To order this tube, please order Fecal Calprotectin/NGAL Sample Collection kit. Each kit contains 48 tubes filled with extraction buffer. A different Calprotectin test result may be obtained by using a different type of fecal sample collection tube.

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

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

Fecal Sample Weight (mg)	Extraction Buffer Volume (ml)
50	2.0
55	2.2
60	2.4
65	2.6
70	2.8
75	3.0
80	3.2
85	3.4
90	3.6
95	3.8
100	4.0

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

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

ASSAY PROCEDURE

1. Reagent Preparation

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

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

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

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

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

2. Patient Sample Preparation

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

3. Assay Procedure:

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

PROCEDURAL NOTES

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

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

INTERPRETATION OF RESULTS

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

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

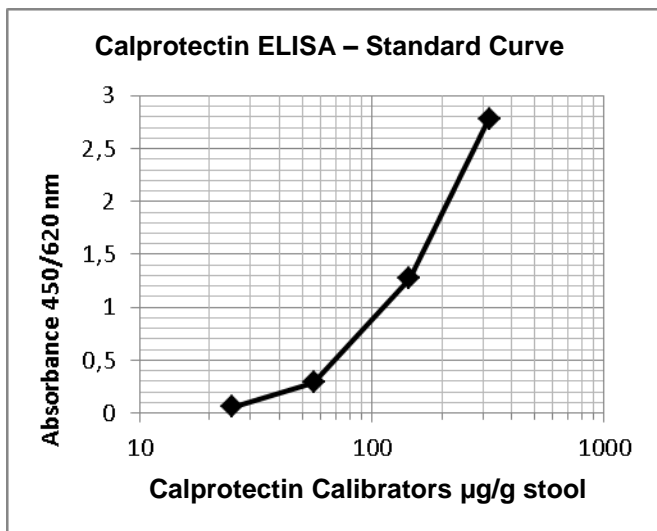
The fecal human calprotectin concentrations for the controls and the patient samples are read directly from the standard curve using their respective corrected absorbance.

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

EXAMPLE DATA AND STANDARD CURVE (low)

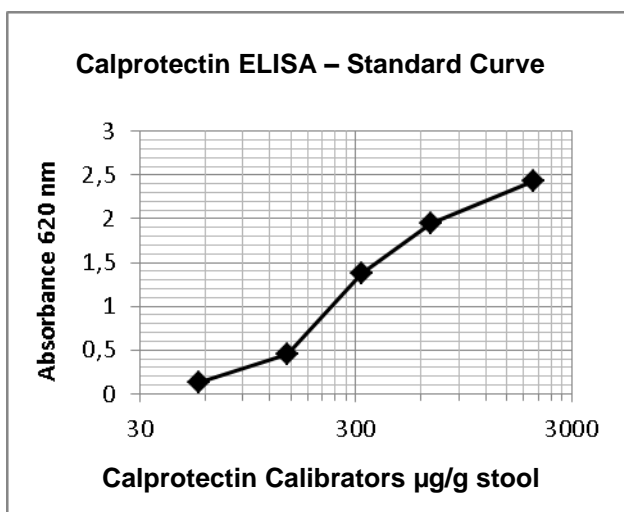
A typical absorbance data and the resulting standard curve from this fecal human calprotectin ELISA are represented. **This curve should not be used in lieu of standard curve run with each assay.**

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



EXAMPLE DATA AND STANDARD CURVE (high)
 A typical absorbance data and the resulting standard curve from this fecal human calprotectin ELISA are represented. **This curve should not be used in lieu of standard curve run with each assay.**

Well I.D.	OD 620 nm Absorbance			Results
	Readings	Average	Corrected	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/mL)	0.043 0.041	0.042	0.000	
Cal-2: 56.2 µg/g (156 ng/mL)	0.132 0.120	0.126	0.084	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/mL)	0.494 0.420	0.457	0.415	
Cal-4: 321 µg/g (892 ng/mL)	1.368 1.380	1.374	1.332	
Cal-5: 669 µg/g (1860 ng/mL)	1.945 1.950	1.948	1.906	
Cal-6: 2000 µg/g (5560 ng/mL)	2.415 2.448	2.432	2.390	
Control 2	1.145 1.149	1.147	1.105	266.3 µg/g (740 ng/ml)
Control 3	1.778 1.779	1.779	1.737	423.1 µg/g (1176 ng/ml)



EXPECTED VALUES

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

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

Note: **Calprotectin ng/mL X 0.36 = Calprotectin µg/g**
 Calprotectin µg/g X 2.78 = Calprotectin ng/mL

Please program ELISA reader by selecting assay calibrators concentration either in "µg/g" or "ng/mL to avoid manual calculation!

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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

QUALITY CONTROL

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

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

High Dose "hook" effect

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

Precision

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

Mean Calprotectin Value (µg/g)	CV (%)
5.74	2.9
26.59	3.5
54.70	2.5

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

Mean Calprotectin Value (µg/g)	CV (%)
21.64	8.6
70.31	2.0

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

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

Linearity

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

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

Spike Recovery

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

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

WARRANTY

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

REFERENCES

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

Calprotectin ELISA: Condensed Assay Protocol

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

Revision date : 2015-09-24



Quantitative Fecal Calprotectin ELISA

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

KAPEPKT849

DIAGNÓSTICO IN VITRO

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

USO PREVISTO

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

INTRODUCCIÓN

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

PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

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

REACTIVOS: Preparación y Almacenaje

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

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

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

- | | | |
|---|---|---|
| U | U | U |
|---|---|---|

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

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

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

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

Solución de parada
Una botella contiene 12 ml de ácido clorhídrico (HCl) 2N. Este reactivo puede almacenarse a 2 – 8°C o a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.
Precaución: este componente contiene material potencialmente peligroso
- | | |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

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

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

8. DIL BUF

Diluyente del anticuerpo maracdo

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

9. ASS BUF

Tampón del ensayo

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

10. EXTR SOLN CONC

Tampón concentrado de extracción

Una botella con 30 ml de tampón concentrado 20 veces. Antes de utilizar el contenido debe diluirse y mezclarse bien con **570 ml** de agua desmineralizada. Una vez diluido se obtiene un tampón de extracción listo para su uso para la extracción y dilución de la muestra fecal. El tampón de extracción diluido puede almacenarse a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit.

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

Cada kit contiene 48 tubos lleno de tampó de extracción. Podría obtenerse un resultado diferente de la prueba de Calprotectina si se utiliza un tubo para toma de muestra fecal diferente.

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

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

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

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

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

Peso de la muestra fecal (mg)	Volumen del tampón de extracción (ml)
50	2,0
55	2,2
60	2,4
65	2,6
70	2,8
75	3,0
80	3,2
85	3,4
90	3,6
95	3,8
100	4,0

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.Preparación de reactivos

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

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

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

TOMA DE LA MUESTRA

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

(4) Configuración de la prueba

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

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

Tira N°	Diluyente del anticuerpo marcado	Anticuerpo marcado
1	1 ml	50 µl
2	2 ml	100 µl
3	3 ml	150 µl
4	4 ml	200 µl
5	5 ml	250 µl
6	6 ml	300 µl
7	7 ml	350 µL
8	8 ml	400 µl
9	9 ml	450 µl
10	10 ml	500 µl
11	11 ml	550 µl
12	12 ml	600 µl

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

2. Preparación de la muestra del paciente

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

3. Procedimiento del ensayo:

- (1) Agregue **50 µl** de tampón del ensayo a los pocillos designados. Golpee suavemente la placa para recubrir los pocillos de forma pareja
- (2) Agregue **50 µl** de calibradores, controles y muestras extraídas de los pacientes a los pocillos designados.
- (3) Selle los pocillos en la placa de forma segura con aluminio u otro material para proteger de la luz y colóquela en un agitador para placas de microvaloración (con radio orbital pequeño) por 1 hr. ± 5 minutos de 400 a 450 rpm.
- (4) Justo antes de terminar la incubación, diluya la cantidad adecuada del anticuerpo marcado para el ensayo.

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

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

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

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

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

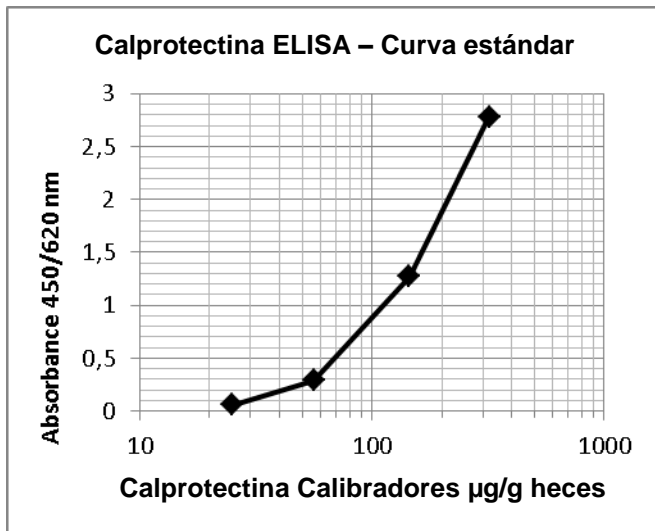
Las concentraciones de calprotectina humana fecal en los controles y las muestras de pacientes se leen directamente de la curva estándar utilizando las absorbancias respectivas corregidas.

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

EJEMPLO DE DATOS Y CURVA ESTANDAR (bajo)

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

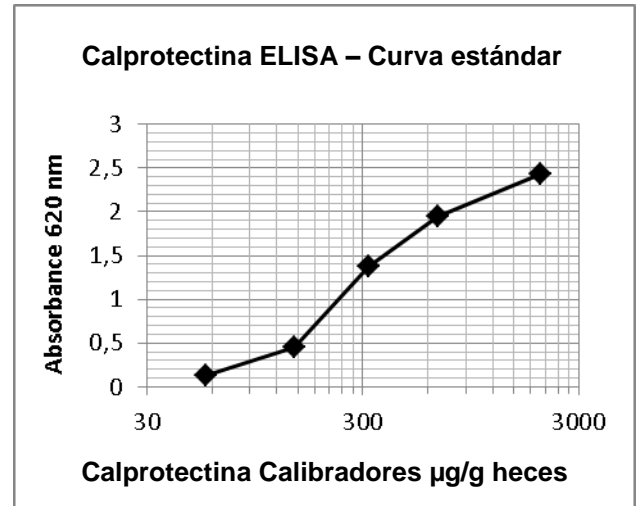
Pocillo I.D.	DO 450 nm Absorbancia			Resultados
	Lecturas	Promedio	Corregido	
Cal-0: 0 µg/g (0 ng/ml)	0,026 0,027	0,027	0,000	
Cal-1: 25 µg/g (69.5 ng/ml)	0,061 0,058	0,059	0,032	
Cal-2: 56.2 µg/g (156 ng/ml)	0,305 0,279	0,292	0,265	
Cal-3: 145 µg/g (403 ng/ml)	1,388 1,156	1,272	1,245	
Cal-4: 321 µg/g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



EJEMPLO DE DATOS Y CURVA ESTÁNDAR (alto)

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

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



VALORES ESPERADOS

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

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

Nota: Calprotectina ng/ml X 0,36 = Calprotectina µg/g

Calprotectina µg/g X 2,78 = Calprotectina ng/ml

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

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

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

CONTROL DE CALIDAD

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

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Sensibilidad

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

Efecto de "gancho" por dosis alta

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

Precisión

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

Valor Promedio de Calprotectina (µg/g)	CV (%)
5,74	2,9
26,59	3,5
54,70	2,5

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

Valor promedio de Calprotectina (µg/g)	CV (%)
21,64	8,6
70,31	2,0

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

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

Linealidad

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

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

Recuperación del refuerzo

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

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

GARANTÍA

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

REFERENCIAS

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

Calprotectina ELISA: Protocolo resumido del ensayo

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

Fecha de revisión : 24-09-2015

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado