



BÜHLMANN fCAL[®] turbo

Kalprotektin turbidimetrické stanovení
pro profesionální použití

Reagenční souprava

B-KCAL-RSET
Verze A4

Pro *in vitro* diagnostiku



BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch
Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

POUŽITÍ TESTU

BÜHLMANN fCAL[®] turbo je automatizovaný *in vitro* diagnostický test, který je určen pro kvantitativní stanovení kalprotektinu ve vzorcích extraktů z lidské stolice sloužící jako pomoc při posouzení střevního zánětu [1-3]. Výsledky testu slouží jako pomůcka při diagnostice k rozlišení organických zánětlivých onemocnění gastrointestinálního traktu (zánětlivého onemocnění střev (IBD), specificky Crohnovy choroby (CD) nebo ulcerózní kolitidy (UC)) od funkčních onemocnění (syndrom dráždivého tračníku (IBS)) [4-10] u pacientů s chronickou bolestí břicha a také pomoc při monitorování IBD onemocnění [10-22].

Pouze pro laboratorní použití.

PRINCIP ANALÝZY

BÜHLMANN fCAL[®] turbo je vylepšená část imunoturbidimetrické metody (PETIA), která umožňuje získat kvantitativní hodnoty kalprotektinu ve vzorcích stolice na klinických chemických analyzátoch. Vzorky stolice se extrahují pomocí extrakčního pufru (B-CAL-EX) s použitím extrakčních zkumavek CALEX[®] Cap extrakčního zařízení (B-CALEX-Cx) nebo manuálně metodou vážení do celkového naředění v poměru 1:500. Extrakty se inkubují s extrakčním pufrem a míchají s polystyrenovými nanočásticemi pokrytými kalprotektin specifickými protilátkami (imunočásticemi). Kalprotektin dostupný ve vzorku zprostředkovává aglutinaci imunitních částic. Zákal vzorku, měřený absorbancí světla, s tvorbou komplexu kalprotektinu imunočástice a je úměrný koncentraci kalprotektinu. Získaná absorbance světla umožňuje kvantifikovat koncentraci kalprotektinu díky interpolaci na stanovené kalibrační křivce.

DODÁVANÉ REAGENCIE

Reagencie	Množství	Kat.č.	Komentáře
Reakční pufr (R1) MOPS pufr solný	1 lahvička 35 mL	B-KCAL- R1	Připraveno k použití
Imunočástice (R2) Polystyrénové částice pokryté ptačími protilátkami proti lidskému kalprotektinu	1 lahvička 7 mL	B-KCAL- R2	Připraveno k použití

Tabulka 1: Reagencie dodávané

UCHOVÁVÁNÍ A SKLADOVÁNÍ REAGENCIÍ

Neotevřené reagencie
Skladujte při 2-8 °C. Nepoužívejte soupravu po uplynutí data vytištěného na štítku.
Stabilita po otevření
Skladujte maximálně 3 měsíce při 5-12 °C

Tabulka 2: Uchovávání a skladování reagentů

Reagencie nezmrazovat!

POTŘEBNÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Reagencie	Množství	Kat.č.
BÜHLMANN fCAL® turbo Kalibrační souprava Kalibrátory pro 1-6 kalibrací šestibodové kalibrační křivky	1 x 6 vials 1 mL/vial	B-KCAL-CASET
BÜHLMANN fCAL® turbo Kontrolní souprava Kontroly nízké a vysoké hladiny	3 x 2 vials 1 mL/vial	B-KCAL-CONSET
CALEX® Cap device Extrakční zařízení plněné extrakčním pufrem	50 tubes 200 tubes 500 tubes	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Extraction Kit Extrakční pufr	3 bottles 12 bottles 125 mL/bottle	B-CAL-EX3 B-CAL-EX12

Tabulka 3: Potřebný, ale nedodávaný materiál

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ TÝKAJÍCÍ SE REAGENCIÍ

- Tento test je určen pouze pro diagnostiku *in vitro*.
- Imunočástice obsahují potenciálně infekční látky živočišného původu a je třeba s nimi zacházet s náležitou opatrností dle Správné laboratorní praxe (SLP).
- R2 obsahuje polystyrénové nanočástice.
- Tato souprava obsahuje součásti klasifikované v souladu se Směrnicí (EC) No. 1272/2008: 2-methyl-4-isothiazolin-3-one hydrochloride (conc. \geq 0.0015%), a proto mohou reagencie způsobit alergickou kožní reakci (H317).
- Vyhněte se kontaktu reagensů s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke kontaktu i přesto dojde, ihned postižené místo opláchněte dostatečným množstvím vody, jinak může dojít k podráždění

Technická opatření

- Reagencie, kontroly, kalibrátory a vzorky nechejte teplotně vyrovnat, jak je uvedeno v návodu.
- Odpařování kalibrátorů a kontrol na analyzátoru může vést k nesprávným výsledkům. Proveďte test ihned po naplnění analyzátoru.
- Nemíchejte reagencie R1 a R2 různých šarží ani nevyměňujte víčka mezi reagensy.

- Jakmile je činidlo R2 zmrazené, již je nelze přistě použít.
- Test je určen pro vzorky fekálního extraktu připravené pomocí specifického extrakčního pufru BÜHLMANN.
- Před provedením testu se ujistěte, že vzorky neobsahují bubliny.
- Přenos vzorků záleží na klinickém chemickém analyzátoru. Více informací naleznete v poznámce k aplikaci konkrétního analyzátoru.

ODBĚR A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Pro proces extrakce je potřeba méně než 1 g nativní stolice. Odeberte vzorky do prázdných zkumavek.

Důležité: vzorky musí být odebrány bez použití chemických nebo biologických aditiv.

Transport vzorku

Vzorky stolice musí být doručeny k laboratornímu zpracování do 3 dnů od jejich odběru. Vzorky stolice lze odesílat při pokojové teplotě nebo chlazené.

Skladování vzorku

Vzorky stolice musí být uchovávány chlazené při 2-8 °C a extrahovány do 3 dnů od přijetí do laboratoře. Neskladujte vzorky při vyšší teplotě.

EXTRAKCE VZORKU STOLICE A UCHOVÁVÁNÍ EXTRAKTU

CALEX[®] Cap

Postupujte podle návodu ke kitu CALEX[®] Cap. Extrakty připravené v CALEX[®] Cap mají finální ředění 1:500 a jsou připraveny k použití.

Vzorky tekuté stolice mohou být napipatovány přímo do zkumavky CALEX[®] Cap. Odšroubujte modrý uzávěr a napipetujte 10 µl vzorku stolice přímo do zkumavky. Opět zašroubujte CALEX[®] Cap a pokračujte krokem vortexování popsaném v návodu a vyobrazeném v návodu pro použití dodaném s CALEX[®] Cap.

Důležité: před zahájením BÜHLMANN fCAL[®] turbo analýzy zcentrifugujte zkumavky CALEX[®] 10 min při 1000 – 3000 g.

Fekální kalprotektin v získaných vzorcích pomocí BÜHLMANN CALEX[®] Cap je stabilní při pokojové teplotě (23 °C) po dobu 7 dnů, při 2 – 8 °C po 15 dnů a při – 20 °C po dobu alespoň 23 měsíců.

Extrakty v CALEX[®] Cap mohou být přímo zamrazeny a skladovány v CALEX[®] Cap. Extrakty mohou podstoupit 4 cykly zamražení – rozmražení. Před měřením je nutné všechny zmražené extrakty vytemperovat na

pokožkovou teplotu, vortexovat po dobu 10 sekund a následně centrifugovat dle návodu.

Extrakční souprava

Při manuální extrakci postupujte podle návodu k extrakční soupravě. Extrakty stolice připravené extrakční soupravou budou mít konečné ředění 1:50. Nařed'te extrakty stolice 1:10 extrakčním BÜHLMANN pufrem z extrakční soupravy (např. 50 µl extraktu a 450 µl extrakčního pufru) před zahájením analýzy BÜHLMANN fCAL® turbo.

Fekální kalprotektin v extraktech (1:50) získaný manuální extrakcí je stabilní po dobu 7 dnů při 2 – 8 °C po dobu 36 měsíců při -20 °C

POSTUP ANALÝZY

APLIKAČNÍ POZNÁMKY / INSTALACE

Testovací postupy pro BÜHLMANN fCAL® turbo jsou určeny pro různé biochemické analyzátoary. Ověřené aplikační manuály popisující instalaci a analýzu na konkrétních přístrojích jsou na vyžádání k dispozici u firmy BioVendor. Podle odpovídajícího manuálu k přístroji se postupuje při nastavování, údržbě, provozu a bezpečnostních opatřeních.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Dodané reagentie jsou připraveny ihned k použití. Před vložením do přístroje jemně promíchejte. Reagenční láhve se mohou zasunout přímo do přístroje, pokud není v návodu uvedeno jinak.

STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

K sestavení standardní šestibodové křivky se používá Kalibrátor BÜHLMANN fCAL® turbo dle návodu v manuálu. Kalibrátory jsou šaržované. Pro každou novou šarži a kalibrátor musí být provedena nová kalibrace. V opačném případě by kalibrace měla být prováděna každý 1 až 2 měsíce dle přístrojového manuálu. Ke kalibrátorům jsou přiřazeny hodnoty, které naleznete v QC-listu dodávaném pro BÜHLMANN fCAL® turbo. Pokud nelze přístroj správně nakalibrovat, kontaktujte technickou podporu.

KONTROLA KVALITY

Kit BÜHLMANN fCAL® turbo Control Kit musí být testován každý den před spuštěním extraktů vzorků stolice pacienta, aby byla validována kalibrační křivka. Kontroly mají přiřazeny rozsahy hodnot uvedené v QC listu dodávaném s každou šarží sady BÜHLMANN fCAL® turbo Control Kit.

Kontrolní měření musí být v rozmezí uvedených hodnot, aby se získaly platné výsledky pro extrakty vzorků stolice pacienta.

Pokud kontrolní hodnoty nejsou platné, opakujte měření s čerstvými kontrolami. Pokud kontrolní hodnoty zůstanou neplatné, proveďte recalibraci testu. Pokud platné kontrolní hodnoty nelze reprodukovat po provedení výše popsaných kroků, kontaktujte podporu BÜHLMANN.

Měření extraktu vzorku stolice pacienta

Jakmile je kalibrační křivka stanovena a validována pomocí kontrol, mohou být měřeny extrakty stolice pacienta. Proveďte měření fekálního extraktu pacienta podle aplikační poznámky a příručky k přístroji.

VÝSLEDKY

Výsledky jsou automaticky přepočítány na analyzátoru a prezentovány v $\mu\text{g/g}$, pokud není v aplikačním protokolu k přístroji uvedeno jinak.

STANDARDIZACE A METROLOGICKÁ NÁVAZNOST

Ve vzorku stolice nejsou žádné mezinárodně nebo národně uznávané referenční materiály nebo měřicí postupy pro kalprotektinový analyt. BÜHLMANN fCAL[®] turbo je standardizovaný podle interně stanoveného referenčního materiálu a hodnoty kontrol a kalibrátorů jsou přiřazeny podle protokolu o přenosu hodnot (viz 23,24), aby byla zaručena metrologická sledovatelnost. 95% interval spolehlivosti kombinované nejistoty produktů kalibrátorů byl stanovený nižší než 3.7%, kombinovaná nejistota kontrol nižší než 6.9%.

OMEZENÍ

- Interpretace výsledků by měla probíhat v souladu s dalšími dostupnými informacemi a posouzením stavu pacienta dalšími diagnostickými procesy.
- Pro monitoring IBD bylo navrženo provádět vícenásobná měření prováděná nejlépe v intervalu 4 týdnů, aby byla predikce klinického relapsu pacienta co nejpřesnější (ref. 25 – 26).
- Příjem nesteroidních antiflogistik (NSAID) může vést ke zvýšeným hodnotám kalprotektinu.
- Hodnocení výsledků není klinicky použitelné u dětí mladších 4 let, které mají hodnoty kalprotektinu fyziologicky zvýšené (ref. 27 – 30).

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

I. ROZLIŠENÍ ORGANICKÉ A FUNKČNÍ NEMOCI GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU

Stanovení hodnot fekálního kalprotektinu je možné použít jako spolehlivý a jednoduchý prostředek k rozlišení organické a funkční choroby střev (viz 4 – 10). BÜHLMANN doporučuje aplikovat stejné cut- off hodnoty jako u metody BÜHLMANN fCAL® ELISA:

Klinické hodnoty

Koncentrace kalprotektinu	Interpretace výsledku	Sledování
< 80 µg/g	Normální	Žádné
80 - 160 µg/g	Šedá zóna – hraniční výsledky	Opakovat vyšetření za 4 až 6 týdnů
> 160 µg/g	Zvýšené hodnoty	Opakovat dle potřeby

Tabulka 4: BÜHLMANN fCAL® turbo diagnostické rozmezí.

Doporučená interpretace je dána výsledky klinických studií prováděných firmou BÜHLMANN a jsou to doporučení firmy BÜHLMANN. Všechny výsledky testů je nutné hodnotit v souladu se stavem pacienta, jeho anamnézou a dalšími klinickými a laboratorními nálezy:

HODNOTY KALPROTEKTINU POD 80 µg/g

Hodnoty kalprotektinu <80 µg/g neindikují zánět v gastrointestinálním traktu. Pacienti s nízkými hladinami kalprotektinu s největší pravděpodobností nepotřebují použití invazivních procedur pro určení příčin zánětu (ref. 4).

HODNOTY KALPROTEKTINU MEZI A PŘESNĚ 80 A 160 µg/g

Hodnoty kalprotektinu mezi a přesně 80 a 160 µg/g, tzv. šedá zóna, neindikuje přímo aktivní zánět vyžadující následné invazivní testování. Ovšem přítomnost zánětu nelze přímo vyloučit. Při stanovení těchto hodnot se doporučuje opakovat měření za 4 – 6 týdnů.

HODNOTY KALPROTEKTINU NAD 160 µg/g

Hodnoty kalprotektinu >160 µg/g svědčí o infiltraci neutrofilů do gastrointestinálního traktu, tudíž signalizují přítomnost aktivního zánětu. Doporučuje se další vyšetření k určení celkové diagnózy.

KLINICKÉ HODNOCENÍ

Schopnost soupravy BÜHLMANN fCAL® turbo rozlišit pacienty s IBD od dalších chorob nepodmíněných zánětlivým procesem, včetně IBS, byla zhodnocena použitím klinických vzorků 295 pacientů a jejich extrakcí

pomocí CALEX® Cap. 127 pacientů mělo jako konečnou diagnózu IBD (Crohnovu chorobu, ulcerózní kolitidu nebo neurčenou kolitidu). 103 pacientů mělo IBS a 65 abdominální bolesti a/nebo průjem nebo další nezánettivá onemocnění spojená s gastrointestinálním traktem. Konečná diagnóza byla podpořena endoskopickým vyšetřením nebo dalšími klinickými nálezy.

Optimální cut-off kombinace pro tyto skupiny pacientů by mohla být definována ROC analýzou při 80 µg/g a 160 µg/g kalprotektinu (tabulka 6 a 8), což je o něco přísnější, než kombinace citlivější spodní mezní hodnoty 50 µg/g s nižší specificitou a horní mezní hodnoty 200 µg/g s mírně nižší senzitivitou (tabulka 7 a 9).

Konečná diagnóza	Distribuce výsledků pacientů v číslech (procentech) pomocí BÜHLMANN fCAL® turbo diagnostických rozmezí			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
IBD	11 (8.7%)	8 (6.3%)	108 (85.0%)	127 (100%)
IBS	75 (72.8%)	11 (10.7%)	17 (16.5%)	103 (100%)
Ostatní GI	42 (64.6%)	8 (12.3%)	15 (23.1%)	65 (100%)

Tabulka 5: Klasifikace výsledků pacientů v diagnostických rozsazích BÜHLMANN fCAL® turbo

IBD vs. non-IBD	Hodnoty pro klinické rozhodnutí	
	80 µg/g	160 µg/g
Senzitivita (95% CI)	91.3% (85.0%, 95.6%)	85.0% (77.6%, 90.7%)
Specificity (95% CI)	69.6% (62.1%, 76.5%)	81.0% (74.2%, 86.6%)
PPV (95% CI)	69.5% (61.9%, 76.3%)	77.1% (69.3%, 83.8%)
NPV (95% CI)	91.4% (85.1%, 95.6%)	87.7% (81.5%, 92.5%)
ROC AUC (95% CI)	0.912 (0.878, 0.946)	

Tabulka 6: Charakteristiky klinického výkonu BÜHLMANN fCAL® turbo při rozlišování IBD od jiných než IBD - IBS a jiných poruch souvisejících se GI, při 80 µg / ga 160 µg / g klinických hodnotách.

IBD vs. non-IBD	Clinical decision point	
	50 µg/g	200 µg/g
Senzitivita (95% CI)	94.5% (89.0%, 97.8%)	80.3% (72.3%, 86.8%)
Specificita (95% CI)	62.5% (54.7%, 69.8%)	85.7% (79.5%, 90.6%)
PPV (95% CI)	65.6% (58.2%, 72.4%)	81.0% (73.0%, 87.4%)
NPV (95% CI)	93.8% (87.5%, 97.5%)	85.2% (78.9%, 90.2%)

Tabulka 7: Charakteristiky klinického výkonu BÜHLMANN fCAL® turbo při rozlišování IBD od jiných než IBD - IBS a jiných poruch souvisejících se GI, při 50 µg/g a 200 µg/g klinických rozhodovacích hodnotách.

IBD vs. IBS	Hodnoty pro klinické rozhodnutí	
	80 µg/g	160 µg/g
Senzitivita (95% CI)	91.3% (85.0%, 95.6%)	85.0% (77.6%, 90.7%)
Specifická (95% CI)	72.8% (63.2%, 81.1%)	83.5% (74.9%, 90.1%)
PPV (95% CI)	80.6% (73.1%, 86.7%)	86.4% (79.1%, 91.9%)
NPV (95% CI)	87.2% (78.3%, 93.4%)	81.9% (73.2%, 88.7%)
ROC AUC (95% CI)	0.925 (0.892, 0.958)	

Tabulka 8: Charakteristiky klinického výkonu BÜHLMANN fCAL® turbo při rozlišování IBD od IBS při 80 µg/g a 160 µg/g klinických rozhodovacích hodnotách.

IBD vs. IBS	Hodnoty pro klinické rozhodnutí	
	50 µg/g	200 µg/g
Senzitivita (95% CI)	94.5% (89.0%, 97.8%)	80.3% (72.3%, 86.8%)
Specifická (95% CI)	67.0% (57.0%, 75.9%)	88.3% (80.5%, 93.8%)
PPV (95% CI)	77.9% (70.5%, 84.2%)	89.5% (82.3%, 94.4%)
NPV (95% CI)	90.8% (81.9%, 96.2%)	78.4% (69.9%, 85.5%)

Tabulka 9: Charakteristiky klinického výkonu BÜHLMANN fCAL® turbo při rozlišování IBD od IBS při 50 µg/g a 200 µg/g klinických rozhodovacích hodnotách.

CI – interval spolehlivosti

PPV – pozitivní prediktivní hodnota

NPV – negativní prediktivní hodnota

ROC AUC – oblast s největší plochou pod křivkou (Area Under Curve – AUC)

II. IBD monitoring

Klinické rozmezí a hodnocení

Stanovení fekálního kalprotektinu je spolehlivým a jednoduchým způsobem, který napomáhá sledování pacientů s IBD (viz 10-22).

Korelace hladin kalprotektinu a zánětlivého stavu střevní sliznice pacienta, podle endoskopických hodnocení, byla stanovena ve třech nezávislých studiích s použitím testů BÜHLMANN kalprotektin (viz tabulka 10).

Diagnostická hodnota kalprotektinu při predikci klinické remise a relapsu podle symptomů pacienta, ukazatelů klinické aktivity, neplánované potřeby eskalace terapie, hospitalizace nebo nouzové situace byla stanovena ve třech studiích pomocí testů BÜHLMANN kalprotektin (tabulka 11).

Kalprotektin ¹ vs. IBD aktivita určená endoskopií	Studie 1 Španělsko (ref. 12)	Studie 1 Španělsko (ref. 13)	Study 3 Austrálie NZ (ref.14)
Počet pacientů a demografie	89 (CD ²) 32-58 let 44% mužif	123 (UC ³) 18-85 let 66.4% muži:	99 (CD ² after resection) 29-47 let 46.5% muži:
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80.3%	53%

Tabulka 10: Korelace hladin kalprotektinu s aktivitou IBD onemocnění stanovenou endoskopickým vyšetřením.

¹Výsledky studií 1 a 2 byly získány pomocí testů laterálního průtoku BÜHLMANN (Quantum Blue[®] fCAL a Quantum Blue[®] fCAL high range). Výsledky ve studii 3 byly získány pomocí BÜHLMANN fCAL[®] ELISA).

² CD = pacienti s Crohnovou chorobou

³ UC = pacienti s ulcerózní kolitidou

Kalprotektin ¹ vs. budoucí klinická remise nebo relaps	Studie 4 UK (ref. 15)	Studie 5 Španělsko (ref. 16)	Studie 6 Španělsko (ref. 17)
Počet pacientů a demografie	92 (CD ²) 38% muži	30 (CD ²) adalimumab therapy 24-64 let 43.3% muži	33 (CD ²) 20 (UC ³) terapie infliximabem 18-68 let 47.2% muži
Doba sledování po měření kalprotektinu	12 měsíců	4 měsíce	12 měsíců
Pacienti s klinickým relapse po sledování	11%	30%	23%
Cut-off	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96.8%	100%	96.1%
PPV	27.6%	75%	68.7%

Tabulka 11: Stanovení diagnostické hodnoty kalprotektinu při predikci klinické remise a relapsu IBD onemocnění.

¹ Výsledky studie 4 byly získány pomocí testu BÜHLMANN fCAL[®] ELISA. Výsledky studií 5 a 6 byly získány pomocí testů laterálního průtoku BÜHLMANN (Quantum Blue[®] fCAL a Quantum Blue[®] fCAL high range).

² CD = pacienti s Crohnovou chorobou

³ UC = pacienti s ulcerózní kolitidou

Uvedené kategorie výsledků jsou doporučení a jejich stanovení je založeno na znalostech publikovaných mezních hodnot a studiích klinického výkonu. Doporučuje se, aby zdravotníci stanovili individuální prahové hodnoty pro pacienta stanovením základní hladiny kalprotektinu pacienta během remise onemocnění.

Hodnoty kalprotektinu pod 100 µg/g

Hladiny kalprotektinu ve stolici pod 100 µg/g mohou spolehlivě indikovat pacienty s nízkým rizikem klinického relapsu, u endoskopické remise ty, u kterých se lze vyhnout invazivním endoskopickým výkonům (viz 10-22).

Hodnoty kalprotektinu mezi 100-300 µg/g

Hladiny kalprotektinu v stolici mezi 100 - 300 µg/g mohou naznačovat nutnost přísnější kontroly v následujícím období pro posouzení tendencí vývoje onemocnění.

Hodnoty kalprotektinu nad 300 µg/g

Hladiny kalprotektinu ve stolici nad 300 µg/g by se měly opakovat, a pokud jsou zvýšené hladiny potvrzeny, použít další vyšetřovací postupy (viz 10-22).

CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

Prezentované výkonnostní charakteristiky byly stanoveny na přístroji Roche cobas® 6000 c501. Výkonové charakteristiky ostatních analyzátorů klinické chemie najdete v manuálu ke specifickým aplikacím analyzátoru klinické chemie.

Porovnání metod – fCAL® turbo CALEX® Cap vs fCAL® ELISA CALEX® Cap

Srovnávací studie metod byla provedena podle směrnice CLSI EP09-A3. Sto devadesát devět (199) klinických vzorků bylo měřeno pomocí jedné šarže BÜHLMANN fCAL® turbo po dobu 18 dnů v jednom kalibračním cyklu. Referenční hodnoty s konečným koncentračním intervalem kalprotektinu 30.3 – 1672.5 µg/g byly stanoveny pomocí BÜHLMANN fCAL® ELISA. Vzorky byly extrahovány pomocí zařízení CALEX® Cap. Jednotlivá stanovení z CALEX® Cap extraktů byla provedena oběma metodami. Systematická chyba byla stanovena pomocí Passing-Bablok lineární regrese a Bland-Altmanovy analýzy.

Bland-Altmanova analýza			Passing-Bablok lineární regrese				
Průměrná systematická chyba (95% CI)	Dolní LoA (95% CI)	Horní LoA (95% CI)	Sklon (95% CI)	Intercept [µg/g] (95% CI)	Systematická chyba při 80 µg/g (95% CI)	Systematická chyba při 160 µg/g (95% CI)	r
0.68% (-2.6%, 4.0%)	-46.0% (-51.6%, -40.3%)	47.3% (41.6%, 53.0%)	1.139 (1.104, 1.172)	-18.3 (-24.4, -13.2)	-9.0% (-15.1%, -3.1%)	2.4% (-1.2%, 5.4%)	0.982

Porovnání metod - manuální extrakce – fCAL® turbo CALEX® Cap vs fCAL® ELISA

Srovnávací studie metod byla provedena podle směrnice CLSI EP09-A3. Sto šedesát osm (168) klinických vzorků bylo extrahováno pomocí tří šarží zařízení CALEX® Cap a měřeno pomocí jedné šarže BÜHLMANN fCAL® turbo po dobu 18 dnů v jednom kalibračním cyklu. Referenční hodnoty s konečným koncentračním intervalem kalprotektinu 30.5 – 1573.8 µg/g byly stanoveny pomocí metody manuální extrakce a měření extraktu pomocí BÜHLMANN fCAL® ELISA. Extrakty byly měřeny v jediném stanovení v obou metodách. Chybovost byla stanovena pomocí Passing-Bablok lineární regrese a Bland-Altmanovy analýzy.

Bland-Altmanova analýza			Passing-Bablok lineární regrese				
Průměrná systematická chyba (95% CI)	Dolní LoA (95% CI)	Horní LoA (95% CI)	Sklon (95% CI)	Intercept [µg/g] (95% CI)	Systematická chyba při 80 µg/g (95% CI)	Systematická chyba při 160 µg/g (95% CI)	r
11.1% (5.5%, 16.6%)	-60.7% (-70.3%, -51.2%)	82.8% (73.3%, 92.4%)	1.336 (1.265, 1.429)	-31.7 (-44.1, -19.4)	-6.0% (-16.4%, 7.1%)	13.8% (8.1%, 23.2%)	0.955

Reproducibilita (studie pro zhodnocení přesnosti na více místech: 3.2-9.1% CV

Reproducibilita byla stanovena podle směrnice CLSI EP05-A3 s použitím studie 3 laboratorní místa x 5 dnů x 5 replikátů. Bylo testováno osm extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí od 47.2 – 5475.6 µg/g.

Přesnost mezi šaržemi: 2.4 – 8.2% CV

Reproducibilita byla stanovena podle směrnice CLSI EP05-A3 s pomocí studie 3 šarže x 5 dní x 5 replik. Bylo testováno osm extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 45.2 – 5303.1 µg/g

Opakovatelnost: 0.7 – 8.3% CV

Přesnost v rámci laboratoře: 1.4 - 9.1% CV

Opakovatelnost a přesnost v rámci laboratoře byly stanoveny podle směrnice CLSI EP05-A3 pomocí standardizovaného návrhu studie 20 dny x 2 cykly x 2 replikáty. Bylo testováno osm extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 42.9 – 5405.6 µg/g.

Extrakční reprodukovatelnost – CALEX® Cap: 8.1% – 19.7% CV

Reprodukovatelnost extrakce byla stanovena podle směrnice CLSI EP05-A3 pomocí studie 2 dny x 2 operátory x 3 šarže CALEX® Cap x 2 extrakce x 3 replikace. Bylo testováno dvanáct klinických vzorků stolice, včetně vzorků s pevnou, polotuhou a kapalnou konzistencí, s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 42.7 – 3440.0 µg/g.

Přesnost/výtěžnost: 93.6 – 102% CV

Sedm extraktů vzorků stolice z klinických vzorků s hladinami kalprotektinu v rozmezí mezi 44.1 – 1076.3 µg/g bylo spikováno s 56.9 µg/g nebo 227.8 µg/g kalprotektinu v materiálu kalibrátoru. Spikování bylo prováděno při 10% extrakčního objemu vzorku. “Základní” vzorky byly spikovaný odpovídajícím objemem vzorku bez analytu. “Základní” vzorky a “vzorky se spike” byly měřeny ve čtyřech replikátech.

Přenos vzorku

Přenos vzorku byl stanoven podle směrnice CLSI EP10-A2. Nebyl zjištěn statisticky významný přenos vzorku pomocí testu BÜHLMANN fCAL® turbo na přístroji Roche cobas® 6000 c501.

Mez detekce (LoD): 23.7 µg/g

LoD byl stanoven podle směrnice CLSI EP17-A2 a s poměry falešně pozitivních záchytů (α) pod 5% a falešně negativních záchytů (β) pod 5% na základě 120 stanovení, s 60 slepými replikáty a 60 replikáty s nízkou hladinou; a **LoB 16.7 µg/g**.

Mez kvantifikace (LoQ): 23.7 µg/g

LoQ byl stanoven podle směrnice CLSI EP17-A2 na základě 90 stanovení a cíli přesnosti 20%. Odhad LoQ byl nalezen pod odhadem LoD, a proto se uvádí, že se rovná odhadovanému LoD.

Rozsah linearity: 9.13 – 13'339 µg/g

Lineární rozsah BÜHLMANN fCAL[®] turbo byl stanoven podle směrnice CLSI EP06-A. Vzorčky s koncentrací nad 2000 µg/g byly analyzátorem automaticky zředěny 1:10. Byla povolena maximální odchylka od linearity 10%. Pro hodnoty pod 75 µg/g byl povolen absolutní rozdíl menší než 7.5µg /g.

Hook efekt

Vzorčky s teoretickými koncentracemi až do 45'715 µg/g lze měřit bez omezení měřicího rozsahu testu.

Interferující látky

Citlivost testu BÜHLMANN fCAL[®] turbo na perorální léčiva, výživové doplňky, hemoglobin a také na enteropatologické mikroorganismy byla hodnocena podle směrnice CLSI EP07-A2. Systémová chyba ve výsledcích přesahujících 10 % byla považována za interferenci.

Nebyla zjištěna žádná interference s následujícími látkami [koncentrace v mg/50 mg stolice]; gyno- Tardyferon (0.11), Prednison (0.31), Imurek (0.19); Salofalk (5.21), Asacol (2.50), Agopton (0.18), Vancocin (2.00), Sulfamethoxazol (1.6), Trimethoprim (0.35), Ciproxin (1.25), Vitamin E (0.30), Bion 3 (1.06), Hemoglobin (1.25).

Nebyla detekována žádná interference s následujícími enteropatologickými mikroorganismy [Koncentrace v jednotkách tvořících kolonie (CFU)/ ml extraktu stolice]; *Escherichia coli* (3.3×10^7), *Salmonella enterica subsp. Enterica* (9.0×10^7), *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (5.3×10^7), *Citrobacter freundii* (12.9×10^7), *Shigella flexneri* (5.0×10^7), *Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica* (9.8×10^7).

LITERATURA

1. Nilsen T et al.: J Clin Lab Anal 2017 ; 31(4). doi: 10.1002/jcla.22061
2. Mandic-Havelka A et al.: Clin Lab. 2017 ; 63(5):907-913.
3. Noebauer B et al. : Biochem Med (Zagreb) 2017 ; 27(3):030710.
4. Fagerhol MK: Lancet 2000; 356, 1783-4.
5. Tibble JA et al.: Gut 2000; 47, 506-13.
6. Tibble JA et al.: Gastroenterol 2002; 123, 450-60.
7. Jahnsen J et al.: Tidsskr Nor Lægeforen 2009; 129(8), 743-5.
8. Manz M. et al.: BMC Gastroenterology 2012; 12, 5.
9. Pavlidis P. et al. Scand J Gastroenterol. 2013; 48(9), 1048-54.
10. Konikoff MR and Denson LA: Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6), 524-34.
11. Lin et al.: Inflamm Bowel Dis 2014; 20: 1407-15.
12. Lobatón T et al.: J Crohns Colitis 2013, 641-51.
13. Lobatón T et al.: Inflamm Bowel Dis 2013; 19(5), 1034-42.
14. Wright et al.: Gastroenterology 2015; 148(5), 938-947.
15. Naismith GD et al.: J Crohns Colitis 2014; 8, 1022-9.
16. Ferreiro-Iglesias R et al.: Scand J Gastroenterol 2015, 23, 1-6.
17. Ferreiro-Iglesias R1 et al. : J Clin Gastroenterol 2015; 50(2),147-51.
18. Guardiola J. et al. Clinical Gastroenterology & Hepatology 2014; 12(11) 1865-70.
19. Lasson A et al.: United European Gastroenterol J 2015, 3(1) 72-9.
20. Bressler B et al.: Can J Gastroenterol Hepatol 2015, 29(7), 369-72.
21. Peyrin-BL et al.: Am J Gastroenterol 2015, 110, 1324-38.
22. Ricciuto A et al.: Crit Rev Clin Lab Sci. 2019; 56(5):307-320.
23. Blirup-Jensen et al.: Clin Chem Lab Med 2001; 39, 1110-22
24. Blirup-Jensen et al.: Clin Chem Lab Med 2008; 46, 1470-9
25. Molander P et al.: Journal of Crohn's and Colitis 2015, 33-40.
26. De Vos M et al.: Inflamm Bowel Dis. 2013; 19, 2111-2117.
27. Fagerberg UL et al.: J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40, 450-5.
28. Li F. et al.: PLoS ONE 10(3) (2015).
29. Zhu Q. et al. PLoS ONE 11 (3) (2016).
30. Peura S. et al.: Scand J Clin Lab Invest 2018; 78(1-2): 120-124.

SEZNAM ZMĚN

Datum	Verze	Změna
2022-02-28	A4	Aktualizace kapitoly “varování a opatření”, revize kapitoly "symboly", Úvod kapitoly “standardizace a metrologická sledovatelnost”, zařazení čísla notifikovaného subjektu do označení CE – postupu posuzování shody dle IVDR 2017/746

HLÁŠENÍ POTÍŽÍ V ČLENSKÝCH ZEMÍCH EU

IPokud se vyskytnou závažné problémy s tímto zařízením, bez odkladu prosím vše ohlašte výrobci a příslušnému orgánu ve vaší zemi.

POŠKOZENÍ PŘI PŘEPRAVĚ

Informujte prosím svého distributora, pokud byl produkt dodán poškozený.

SYMBOLY

Společnost BÜHLMANN používá symboly a značky uvedené a popsané v normě ISO 15223-1.

