BÜHLMANN fCAL® turbo

Turbidymetryczny test do ilościowego
oznaczania kalprotektyny
do użytku profesjonalnego

Zestaw reagentów

B-KCAL-RSET
Wersja A6

Do diagnostyki *In Vitro*

Producent

BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch
Szwajcaria
Tel.: +41 61 487 1212
Faks: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

PRZEZNACZENIE

Zestaw BÜHLMANN fCAL® turbo to zautomatyzowany test diagnostyczny in vitro do ilościowego oznaczania kalprotektyny w próbkach kału pochodzenia ludzkiego, mający na celu pomoc w ocenie zapalenia błony śluzowej jelit (ref. 1-3). Wyniki testu można wykorzystać jako pomoc w diagnozie w odróżnieniu organicznej, zapalnej choroby przewodu pokarmowego (choroba zapalna jelit, NZJ, szczególnie choroba Crohna (CD) lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC)) od choroby funkcjonalnej (zespół jelita drażliwego, SJD) (ref. 4-10), u pacjentów z przewlekłym bólem brzucha i jako pomoc w monitorowaniu choroby NZJ (ref. 10-22). Test BÜHLMANN fCAL® turbo przeznaczone do stosowania w analizatorach chemii klinicznej. Tylko do użytku laboratoryjnego.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Zestaw BÜHLMANN fCAL® turbo to turbidymetryczny test immunologiczny wzmocniony cząsteczkami (PETIA), który pozwala na automatyczną ocenę ilościową kalprotektyny w ekstraktach próbek kału przy zastosowaniu analizatorów biochemicznych. Próbki kału są ekstrahowane buforem ekstrakcyjnym przy wykorzystaniu ekstrakcji CALEX® Cap lub za pomocą ekstrakcji ręcznej uzyskując końcowe rozcieńczenie 1:500. Ekstrakty inkubuje się w buforze reakcyjnym i miesza się z nanocząsteczkami polistyrenu pokrytymi przeciwciałami swoistymi dla kalprotektyny (immunocząsteczki). Kalprotektyna obecna w próbce pośredniczy w aglutynacji immunocząsteczkowej. Mętność próbki, mierzona za pomocą absorbancji światła, wzrasta wraz z tworzeniem kompleksu kalprotektyna-immunocząsteczka i jest proporcjonalna do stężenia kalprotektyny. Wartość absorbancji światła umożliwia ilościowy pomiar stężenia kalprotektyny poprzez interpolację na ustalonej krzywej kalibracyjnej.

ODCZYNNIKI DOSTARCZONE W ZESTAWIE

Odczynniki	Ilość	Kod produktu	Komentarz
Bufor reakcyjny (R1) Sól fizjologiczna buforowana kwasem MOPS	1 fiolka 35 mL	B-KCAL-R1	Gotowe do użycia
Immunocząsteczki (R2) Granulki polistyrenu pokryte ptasimi przeciwciałami przeciwko ludzkiej kalprotektynie	1 fiolka 7 mL	B-KCAL-R2	Gotowe do użycia

Tabela 1: Odczynniki dostarczone w zestawie

PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ ODCZYNNIKÓW

Nieotwarte odczynniki
Przechowywać w temperaturze 2-8 °C. Nie używać zestawu po upływie daty ważności wydrukowanej na etykiecie
Stabilność na pokładzie
Przechowywać maksymalnie 90 dni w temperaturze 2-15 °C.

Tabela 2: Przechowywanie i trwałość odczynników

Nie zamrażać reagentów!

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

- Wymienione odczynniki wyroby nie są dostarczane z zestawem i należy je zamówić osobno:

Odczynniki	Ilość	Kod produktu
BÜHLMANN fCAL® turbo Zestaw kalibratorów Kalibratory 1-6 do wyznaczenia sześciopunktowej krzywej kalibracyjnej	1 x 6 fiolek 1mL/fiolka	B-KCAL-CASET
BÜHLMANN fCAL® turbo Zestaw kontroli Kontrole niska i wysoka	3 x 2 fiolki 1 mL/fiolka	B-KCAL-CONSET
CALEX® Cap Urządzenie ekstrakcyjne wypełnione buforem ekstrakcyjnym	50 probówek 200 probówek 500 probówek	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Zestaw do ekstrakcji Bufor ekstrakcyjny	3 butelki 12 butelek 125 mL/butelka	B-CAL-EX3 B-CAL-EX12

Tabela 3: Materiały wymagane, ale niedostarczane z zestawem

- Zwykły sprzęt laboratoryjny
- Analizator chemii klinicznej
- Wirówka

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Test służy wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
- Immunocząsteczki zawierają potencjalnie zakaźne substancje pochodzenia zwierzęcego i należy obchodzić się z nimi zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną (GLP), stosując odpowiednie środki ostrożności.
- R2 zawiera nanocząsteczki polistyrenu.
- Ten zestaw zawiera składniki sklasyfikowane zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008: chlorowodorek 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu (stęż. ≥ 0,0015%), z tego względu odczynniki mogą powodować alergiczne reakcje skórne (H317).
- Odczynniki: Unikać kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu natychmiast spłukać dużą ilością wody, w przeciwnym razie może wystąpić podrażnienie.

Środki techniczne

- Przed pomiarem należy zrównoważyć reagenty, kontrole, kalibratory i próbki zgodnie z opisem w nocie aplikacyjnej.
- Odparowanie kalibratorów i kontroli na analizatorze może prowadzić do nieprawidłowych wyników. Test należy uruchomić natychmiast po wprowadzeniu do analizatora.
- Nie mieszać reagentów R1 i R2 o różnych numerach partii i nie wymieniać nakrętek między nimi.
- Reagent R2 po zamrożeniu nie może zostać użyty.
- Test przeznaczony jest dla próbek ekstraktu kału przygotowanych przy użyciu dedykowanego buforu ekstrakcyjnego firmy BÜHLMANN.
- Przed uruchomieniem testu, należy upewnić się, że próbki nie mają pęcherzyków.
- Przeniesienie próbki zależy od konkretnego analizatora biochemicznego. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się z notą aplikacyjną analizatora.

POBIERANIE PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

Do procedury ekstrakcji wymagane jest mniej niż 1 g natywnej próbki kału. Próbki kału należy zbierać do zwykłych pojemników na kał.
Ważne: Próbkę kału należy pobrać bez dodatków chemicznych i biologicznych.

Transport próbek

Próbki muszą być dostarczone do laboratorium w ciągu 3 dni od pobrania. Próbki kału mogą być wysyłane w temperaturze pokojowej lub schłodzone.

Przechowywanie próbek

Otrzymane próbki kału należy przechowywać w temperaturze 2-8 °C i ekstrahować je w ciągu trzech dni od momentu dostarczenia ich do laboratorium. Próbki kału nie mogą być przechowywane w podwyższonych temperaturach.

EKSTRAKCJA PRÓBEK KAŁU I STABILNOŚĆ EKSTRAKTÓW

CALEX® Cap

Postępować zgodnie z instrukcją użytkowania dołączoną do zestawu CALEX® Cap. Ekstrakty próbek kału przygotowane za pomocą CALEX® Cap osiągną końcowe rozcieńczenie 1:500 i będą gotowe do użycia.

Próbki płynnego kału można pipetować bezpośrednio do CALEX® Cap. W tym celu odkręcić niebieską nakrętkę i wprowadzić 10 µL próbki kału do urządzenia. Ponownie zamknąć CALEX® Cap i przejść do etapu worteksowania zgodnie z procedurą ekstrakcji opisaną i zilustrowaną w instrukcji użytkowania dostarczonej z CALEX® Cap.

Ważne: Przed przystąpieniem do procedury BÜHLMANN fCAL® turbo należy odwirować CALEX® Cap przez 10 minut przy 1000 – 3000 x g.

Kalprotektyna z próbek kału w ekstraktach otrzymanych przez CALEX® Cap jest stabilna w temperaturze pokojowej (23 °C) przez 7 dni, w temperaturze 2-8 °C przez 15 dni i w temperaturze -20 °C przez okres do 23 miesięcy.

Ekstrakty przygotowane przy użyciu CALEX® Cap można bezpośrednio zamrażać i przechowywać w CALEX® Cap. Ekstrakty można poddać czterem cyklom zamrażania i rozmrażania. Przed wykonaniem oznaczenia, zamrożone ekstrakty należy doprowadzić do temperatury pokojowej, dokładnie zworteksować przez 10 sekund i odwirować zgodnie z instrukcją użycia testu.

Zestaw do ekstrakcji

W przypadku manualnej ekstrakcji, należy postępować zgodnie z instrukcją użytkowania dostarczoną z zestawem do ekstrakcji. Ekstrakty próbek kału przygotowane przy użyciu zestawu do ekstrakcji uzyskają końcowe rozcieńczenie 1:50. Przed uruchomieniem testu BÜHLMANN fCAL® turbo, należy rozcieńczyć ekstrakty kału w stosunku 1:10 z buforem ekstrakcyjnym firmy BÜHLMANN, który dostarczany jest w zestawie do ekstrakcji (np. 50µL ekstraktu i 450 µL buforu ekstrakcyjnego).

Kalprotektyna w ekstraktach kału (1:50), przygotowana przez ekstrakcję manualną jest stabilna w temperaturze 2-8 °C do 7 dni lub w temperaturze -20 °C przez okres do 36 miesięcy.

PROCEDURA

Uwagi dotyczące aplikacji / instalacji testu

Procedura testowa dla BÜHLMANN fCAL® turbo została opracowana dla kilku klinicznych analizatorów biochemicznych. Na prośbę klienta BÜHLMANN udostępnia zwalidowaną aplikację opisującą instalację i analizę na konkretnym analizatorze. Przy konfiguracji, konserwacji, obsłudze i środkach ostrożności należy wziąć pod uwagę odpowiednią instrukcję obsługi sprzętu.

Przygotowanie reagenta

Dostarczone reagenty są gotowe do użycia. Przed załadowaniem do analizatora należy je delikatnie wymieszać. Butelki z reagentami mogą zmieścić się bezpośrednio w analizatorze, chyba, że w nocie aplikacyjnej zamieszczono inną informację.

Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej

The BÜHLMANN fCAL® turbo Calibrator służy do wygenerowania sześciopunktowej krzywej kalibracyjnej zgodnie z instrukcją obsługi danego analizatora. Wartości kalibratora są specyficzne dla danej partii. Nową kalibrację należy przeprowadzić dla każdej nowej partii kalibratora i reagentów. W przeciwnym razie kalibracja powinna być przeprowadzona co miesiąc lub dwa zgodnie z uwagami zamieszczonymi w aplikacji. Dokładne wartości kalibratorów znajdują się w załączonej z zestawem BÜHLMANN fCAL® turbo Calibrator Kit karcie danych QC. W przypadku, gdy kalibracja nie może zostać wykonana, skontaktuj się z pomocą techniczną BÜHLMANN.

Kontrola QC

Aby potwierdzić krzywą kalibracyjną zestaw BÜHLMANN fCAL® turbo Control Kit należy testować każdego dnia przed analizą ekstraktów próbek kału pochodzących od pacjentów. Dokładne zakresy wartości dla danej partii kontroli są wskazane w karcie QC dostarczanej z każdą partią zestawu BÜHLMANN fCAL® turbo Control Kit. Aby uzyskać prawidłowe wyniki dla ekstraktów próbek kału pochodzących od pacjentów, pomiary kontrolne muszą mieścić się we wskazanych zakresach. W przypadku, gdy wartości kontroli nie mieszczą się w zakresie to należy powtórzyć pomiar przy użyciu świeżych kontroli. Jeżeli wartości kontrolne wciąż są nieprawidłowe, należy ponownie skalibrować test. Jeśli wartości kontrolne nadal nie mieszczą się we wskazanym zakresie, po wykonaniu czynności opisanych powyżej, należy skontaktować się z pomocą techniczną BÜHLMANN.

Pomiar ekstraktu próbki kału

Po wyznaczeniu krzywej kalibracyjnej i zatwierdzeniu jej za pomocą kontroli można zmierzyć ekstrakty kału pochodzące od pacjenta. Pomiar ekstraktu kału pochodzącego od pacjenta należy wykonać zgodnie z notą aplikacyjną i według instrukcji obsługi analizatora.

Wyniki

Wyniki obliczane są automatycznie na analizatorze biochemicznym i wyświetlane są w jednostkach µg/g, chyba, że w nocie aplikacyjnej zamieszczono inną informację.

STANDARYZACJA I ZGODNOŚĆ METROLOGICZNA

Nie ma międzynarodowych LUB krajowych materiałów referencyjnych ani referencyjnych procedur pomiarowych dla analitu kalprotektyny w próbce kału. BÜHLMANN fCAL® turbo jest standaryzowany względem wewnętrznie ustalonego materiału referencyjnego, a wartości kontroli i kalibratorów są przypisywane zgodnie z protokołem transferu wartości (ref. 23-24), aby zagwarantować spójność metrologiczną. W 95% przedział ufności łącznej niepewności kalibratorów produktu został określony jako mniejszy niż 3,7%, łączna niepewność kontroli JEST mniejsza niż 6,9%.

OGRANICZENIA

- Wyniki badań należy interpretować w połączeniu z informacjami dostępnymi z oceny klinicznej pacjenta i innych badań diagnostycznych.
- W przypadku monitorowania choroby NZJ zasugerowano, iż wielokrotne pomiary kalprotektyny w odstępach 4 tygodniowych dają najlepszą dokładność w przewidywaniu nawrotu klinicznego choroby u pacjentów (ref. 25-26).
- Pacjenci, którzy regularnie przyjmują leki z grupy NLPZ (Niesteroidowych Leków Przeciwzapalnych), mogą wykazywać podwyższone stężenie kalprotektyny w kale.
- Wyniki badania mogą nie mieć zastosowania klinicznego u dzieci poniżej 4 roku życia, ze względu na fizjologicznie występujące podwyższenie poziomu kalprotektyny w kale (ref. 27-30).

INTERPRETACJA WYNIKÓW

I. Odróżnienie choroby organicznej od choroby funkcjonalnej przewodu pokarmowego

Oznaczenie stężenia kalprotektyny w kale można wykorzystać jako wiarygodną i prostą metodę dla odróżniania choroby organicznej od czynnościowej choroby przewodu pokarmowego (ref. 4-10). BÜHLMANN zaleca stosowanie takich samych wartości cut-off jak w przypadku testu BÜHLMANN fCAL® ELISA:

Progi kliniczne

Stężenie kalprotektyny	Interpretacja	Zalecenia
< 80 µg/g	Normalna	Brak
80 – 160 µg/g	Strefa szara/granica	Ponowne badanie za 4 – 6 tygodni
> 160 µg/g	Podwyższona	Powtórzyć w razie potrzeby

Tabela 4: Zakresy diagnostyczne dla BÜHLMANN fCAL® turbo.

Kategorie wynikowe oparte są na danych z badań klinicznych przeprowadzonych przez laboratorium BÜHLMANN i jednocześnie są zaleceniami firmy BÜHLMANN. Wszystkie wyniki badań należy interpretować w połączeniu z informacjami dostępnymi z oceny klinicznej pacjenta, wywiadu medycznego oraz innych badań klinicznych i diagnostycznych:

Wartości kalprotektyny poniżej 80 µg/g

Stężenia kalprotektyny w kale poniżej < 80 µg/g wskazują na brak stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym. Pacjenci z niskim stężeniem kalprotektyny prawdopodobnie nie będą potrzebować procedur inwazyjnych w celu ustalenia przyczyny zapalenia (ref. 4).

Wartości kalprotektyny między 80 a 160 µg/g

Stężenia kalprotektyny w kale w zakresie od 80 µg/g do 160 µg/g, zwane również poziomami szarej strefy, nie wskazują bezpośrednio na aktywny stan zapalny, który wymaga natychmiastowego zastosowania badań inwazyjnych. Jednakże, nie można wykluczyć obecności stanu zapalnego. Zalecana jest ponowna ocena stężenia kalprotektyny po 4 – 6 tygodniach celem rozpoznania istniejącego stanu zapalnego.

Wartości kalprotektyny powyżej 160 µg/g

Oznaczenie stężenia kalprotektyny w kale powyżej > 160 µg/g wskazuje na naciek neutrofili w przewodzie pokarmowym, co może świadczyć o aktywnej chorobie zapalnej. W takim przypadku specjalista powinien określić dalsze procedury badawcze, aby uzyskać ogólną diagnozę kliniczną.

Ocena kliniczna

Zdolność testu BÜHLMANN fCAL® turbo do odróżniania pacjentów z NZJ, a innymi niezapalnymi zaburzeniami przewodu pokarmowego, w tym SJD, została przetestowana w badaniu klinicznym z udziałem łącznie 295 pacjentów, których próbki wyekstrahowano za pomocą CALEX® Cap. Stu dwudziestu siedmiu (127) pacjentów otrzymało ostateczną diagnozę NZJ (choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub nieokreślone zapalenie jelita grubego), 103 pacjentów cierpiało na SJD i 65 pacjentów miało bóle brzucha i/lub biegunkę lub inne związane z układem pokarmowym, stany niezapalne. Ostateczną diagnozę poparły wyniki badań endoskopowych oraz inne ustalenia kliniczne.

Optymalna kombinacja punktu cut off dla tej puli pacjentów można określić w oparciu o analizę ROC przy 80 µg/g i 160 µg/g kalprotektyny (tab. 6 i 8), co jest nieco bardziej przekonywujące niż kombinacja bardziej czułego dolnego punktu cut off 50 µg/g z niższą swoistością, i górnym punktem cut off wynoszącym 200 µg/g z nieco mniejszą czułością (tab. 7 i 9).

Ostateczna diagnoza	Rozkład wyników pacjentów w liczbach (%) w zakresie diagnostycznym BÜHLMANN fCAL® turbo.			
	< 80 µg/g	80 – 160 µg/g	> 160 µg/g	Łącznie
NZJ	11 (8,7%)	8 (6,3%)	108 (85,0%)	127 (100%)
SJD	75 (72,8%)	11 (10,7%)	17 (16,5%)	103 (100%)
Inne GI	42 (64,6%)	8 (12,3%)	15 (23,1%)	65 (100%)

Tabela 5: Rozkład wyników pacjentów przy zastosowaniu BÜHLMANN fCAL® turbo

NZJ vs. nie-NZJ	Punkt decyzji klinicznej	
	80 µg/g	160 µg/g
Czułość (95% CI)	91,3% (85,0%; 95,6%)	85,0% (77,6%; 90,7%)
Swoistość (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)	

Tabela 6: Charakterystyka wydajności klinicznej zestawu BÜHLMANN fCAL® turbo w rozróżnieniu NZJ od nie-NZJ-SJD i innych zaburzeń związanych z GI (przewodem pokarmowym) przy punktach decyzji klinicznej 80 µg/g i 160 µg/g

NZJ vs. nie-NZJ	Punkt decyzji klinicznej	
	50 µg/g	200 µg/g
Czułość (95% CI)	94,5% (89,0%; 97,8%)	80,3% (72,3%; 86,8%)
Swoistość (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%)

Tabela 7: Charakterystyka wydajności klinicznej zestawu BÜHLMANN fCAL® turbo w rozróżnieniu NZJ od nie-NZJ-SJD i innych zaburzeń związanych z GI (przewodem pokarmowym) przy punktach decyzji klinicznej 50 µg/g i 200 µg/g

NZJ vs. SJD	Punkt decyzji klinicznej	
	80 µg/g	160 µg/g
Czułość (95% CI)	91,3% (85,0%; 95,6%)	85,0% (77,6%; 90,7%)
Swoistość (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)	

Tabela 8: Charakterystyka wydajności klinicznej zestawu BÜHLMANN fCAL® turbo w rozróżnieniu NZJ od SJD przy punktach decyzji klinicznej 80 µg/g i 160 µg/g

NZJ vs. SJD	Punkt decyzji klinicznej	
	50 µg/g	**200 µg/g**
Czułość (95% CI)	94,5% (89,0%; 97,8%)	80,3% (72,3%; 86,8%)
Swoistość (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%)

Tabela 9: Charakterystyka wydajności klinicznej zestawu BÜHLMANN fCAL® turbo w rozróżnieniu NZJ od SJD przy punktach decyzji klinicznej 50 µg/g i 200 µg/g

CI – przedział ufności
PPV – dodatnia wartość predykcyjna
NPV – negatywna wartość predykcyjna
ROC AUC – powierzchnia pod krzywą charakterystyczna dla operatora

II. Monitorowanie NZJ

Progi kliniczne i ocena

Oznaczanie kalprotektyny w kale jest wiarygodnym i prostym sposobem wspomagania monitorowania pacjentów NZJ (ref. 10-22).
Korelacje poziomów kalprotektyny i stanu zapalnego błony śluzowej jelit pacjentów, zgodnie z ocenami endoskopowymi, została ustalona w trzech niezależnych badaniach z wykorzystaniem testów na oznaczenie kalprotektyny firmy BÜHLMANN (tabela 10). Wartość diagnostyczną kalprotektyny w przewidywaniu remisji klinicznej i nawrotu choroby, zgodnie z objawami pacjenta, wskaźnikami aktywności klinicznej, nieplanowaną potrzebą eskalacji terapii, hospitalizacji lub nagłego wypadku określono w trzech badaniach z użyciem testów na oznaczenie kalprotektyny firmy BÜHLMANN (tabela 11).

Kalprotektyna względem aktywności NZJ potwierdzonego endoskopowo	**Badanie 1 Hiszpania (odn. 12)**	**Badanie 2 Hiszpania (odn. 13)**	**Badanie 3 Polska (odn. 14)**
Liczba pacjentów i dane demograficzne	89 (CD[2]) Wiek: 32-58 44% mężczyzn	123 (UC[3]) Wiek: 18-85 66,4% mężczyzn	57 (CD[2]) Średnia wieku: 35,3 48% mężczyzn
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	238,5 µg/g
NPV	98%	86%	88%
PPV	76%	80,3%	73%

Tabela 10: Korelacja poziomów kalprotektyny z aktywną chorobą NZJ określona na podstawie ocen endoskopowych.

[1] Wyniki badań 1 i 2 uzyskano za pomocą testów przepływu bocznego firmy BÜHLMANN (Quantum Blue® fCAL i Quantum Blue® fCAL high range). Wyniki badania 3 uzyskano z użyciem testów BÜHLMANN fCAL® ELISA i Quantum Blue® fCAL high range).
[2] CD = pacjenci z chorobą Crohna
[3] UC = wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Kalprotektyna vs. przyszła remisja kliniczna lub nawrót choroby	Badanie 4 UK (odn. 15)	Badanie 5 Hiszpania (odn. 16)	Badanie 6 Hiszpania (odn. 17)
Liczba pacjentów i dane demograficzne	92 (CD[2]) 38% mężczyzn	30 (CD[2]) terapia adalimumabem Wiek: 24-64 43,3% mężczyzn	33 (CD[2]) 20 (UC[3]) terapia infiksimabem Wiek: 18-68 47,2% mężczyzn
Czas obserwacji po pomiarze kalprotektyny	12 miesięcy	4 miesiące	12 miesięcy
Pacjenci u których nastąpił nawrót po obserwacji	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%

Tabela 11: Określenie diagnostycznej wartości kalprotektyny w przewidywaniu remisji klinicznej i nawrotu choroby NZJ..

[1] Wyniki badania 4 uzyskano za pomocą BÜHLMANN fCAL® ELISA. Wyniki badań 5 i 6 uzyskano za pomocą testów przepływu bocznego firmy (Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range).

[2] CD = pacjenci z chorobą Crohna

[3] UC = wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Przedstawione kategorie wyników są rekomendacjami, a ich ustalenie opiera się na skondensowanej wiedzy z opublikowanych punktów odcięcia (cut off) i badań klinicznych. Zaleca się, aby pracownicy służby zdrowia ustalili progi dla poszczególnych pacjentów, określając wyjściowy poziom kalprotektyny u danego pacjenta podczas remisji choroby.

Wartości kalprotektyny poniżej 100 µg/g

Stężenia kalprotektyny w kale poniżej 100 µg/g mogą wiarygodnie wskazywać pacjentów z niskim ryzykiem nawrotu klinicznego, w remisji endoskopowej, u których można uniknąć inwazyjnych procedur endoskopowych (ref. 10-22).

Wartości kalprotektyny między 100 a 300 µg/g

Stężenia kalprotektyny w kale między 100 a 300 µg/g mogą wskazywać na konieczność ściślejszej kontroli w następnym okresie w celu oceny tendencji rozwoju choroby.

Wartości kalprotektyny powyżej 300 µg/g

Jeżeli stężenia kalprotektyny w kale wynoszą powyżej 300 µg/g, to badanie należy powtórzyć, a jeśli podwyższone poziomy się potwierdzą, należy niezwłocznie przeprowadzić dalsze procedury badawcze (ref. 10-22).

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

Przedstawione parametry wydajności zostały ustalone za pomocą analizatora Roche cobas® 6000 c501. Informacje na temat charakterystyki działania innych analizatorów biochemicznych znajdują się w uwagach dotyczących zastosowania analizatora biochemicznego.

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

Badanie porównawcze metod przeprowadzono zgodnie z wytycznymi EP09-A3 CLSI. W ciągu 18 dni w jednym cyklu kalibracji zmierzono sto dziewięćdziesiąt dziewięć (199) próbek klinicznych przy użyciu jednej partii BÜHLMANN fCAL® turbo. Wartości referencyjne, z ostatecznym przedziałem stężenia kalprotektyny wynoszącym 30,3 – 1672,5 µg/g, ustalono za pomocą testu BÜHLMANN fCAL® ELISA. Próbki ekstrahowano przy użyciu CALEX® Cap. Ekstrakty CALEX® Cap mierzono w pojedynczych oznaczeniach za pomocą obu metod. Odchylenie określono za pomocą regresji liniowej Passing-Bablok i analizy Bland-Altman.

Analiza Bland-Altman			Analiza regresji Passing-Bablok				
Średnie odchylenie (95% CI)	**Niższe LoA (95% CI)**	**Wyższe LoA (95% CI)**	**Nachylenie (95% CI)**	**Punkt przecięcia [µg/g] (95% CI)**	**Odchylenie przy 80 µg/g (95% CI)**	**Odchylenie przy 160 µg/g (95% CI)**	**r**
0,7% (-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

Porównanie metod – fCAL® turbo CALEX® Cap vs fCAL® ELISA ekstrakcja manualna

Badanie porównawcze metod przeprowadzono zgodnie z wytycznymi EP09-A3 CLSI. W ciągu 18 dni w jednym cyklu kalibracji zmierzono sto sześćdziesiąt osiem (168) próbek klinicznych pobranych przy użyciu CALEX® Cap o trzech różnych numerach partii z wykorzystaniem jednej partii BÜHLMANN fCAL® turbo. Wartości referencyjne, z ostatecznym przedziałem stężenia kalprotektyny wynoszącym 30,5 – 1573,8 µg/g, ustalono za pomocą manualnej ekstrakcji z wykorzystaniem testu BÜHLMANN fCAL® ELISA. Ekstrakty mierzono w pojedynczych oznaczeniach za pomocą obu metod. Odchylenie określono za pomocą regresji liniowej Passing-Bablok i analizy Bland-Altman.

Analiza Bland-Altman			Analiza regresji Passing-Bablok				
Średnie odchylenie (95% CI)	**Niższe LoA (95% CI)**	**Wyższe LoA (95% CI)**	**Nachylenie (95% CI)**	**Punkt przecięcia [µg/g] (95% CI)**	**Odchylenie przy 80 µg/g (95% CI)**	**Odchylenie przy 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

Odtwarzalność (Wieloośrodkowe badanie oceny precyzji):
3,2 – 9,1% CV
Odtwarzalność została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP05-A3 przy wykorzystaniu projektu badania 3 laboratoria x 5 dni x 5 powtórzeń. Oznaczono osiem połączonych ekstraktów kału o stężeniach kalprotektyny w zakresie od 47,2 – 5475,6 µg/g.

Precyzja między partiami: 2,4 – 8,2% CV
Precyzja między partiami została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI przy Wykorzystaniu projektu badania 3 partie x 5 dni x 5 powtórzeń. Oznaczono osiem połączonych ekstraktów kału o stężeniach kalprotektyny w zakresie 45,2 – 5303,1 µg/g.

Powtarzalność: 0,7 – 8,3% CV
Precyzja wewnątrzlaboratoryjna: 1,4 – 9,1% CV
Powtarzalność i precyzja wewnątrzlaboratoryjna zostały wyznaczone zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI przy wykorzystaniu standardowego projektu badania trwającego 20 dni x 2 serie x 2 powtórzenia. Oznaczono osiem połączonych ekstraktów kału o stężeniach kalprotektyny w zakresie 42.9 – 5405.6 µg/g.

Powtarzalność ekstrakcji – CALEX® Cap: 8,1 – 19,7% CV
Powtarzalność ekstrakcji została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI przy wykorzystaniu projektu badania 2 dni x 2 operatorów x 3 partie CALEX® Cap x 2 ekstrakcje x 3 powtórzenia. Oznaczono 12 klinicznych próbek kału, w tym próbki o stałej, półstałej i płynnej konsystencji, o stężeniach kalprotektyny w zakresie 42,7 – 3440.0 µg/g.

Dokładność / Odzysk: 93,6 – 102% CV
Siedem ekstraktów próbek kału o stężeniach kalprotektyny w zakresie 44,1 – 1076,3 µg/g wzbogacono kalprotektyną w stężeniach 56,9 µg/g lub 227,8 µg/g w materiale kalibratora. Wzbogacenie przeprowadzono przy 10% objętości ekstraktu próbki. Próbki „wyjściowe” wzbogacono o odpowiednią objętość wolnej od analitu próbki. Próbki „wyjściowe” i „wyjściowe + wzbogacone” oznaczono w czterech powtórzeniach.

Przeniesienie próbki
Przeniesienie próbki wyznaczono zgodnie z wytycznymi EP10-A2 CLSI. Nie wykryto statystycznie istotnego przeniesienia próbki za pomocą testu BÜHLMANN fCAL® turbo na analizatorze Roche cobas® 6000 c501.

Granica wykrywalności (LoD): 23,7 µg/g
LoD wyznaczono zgodnie z wytycznymi EP17-A2 CLSI i przy proporcjach fałszywie dodatnich (α) mniejszych niż 5% i fałszywie ujemnych (β) mniejszych niż 5% na podstawie 120 oznaczeń, z 60 powtórzeniami próby ślepej i 60 powtórzeniami niskiego poziomu; i **LoB 16,7 µg/g**.

Granica oznaczalności (LoQ): 23,7 µg/g
LoQ wyznaczono zgodnie z wytycznymi EP17-A2 CLSI, w oparciu o 90 oznaczeń i precyzji wynoszącej 20% CV. Ocena LoQ została wyznaczona poniżej LoD i dlatego też wskazana jest jako równa LoD.

Zakres liniowości: 15,6 – 12216 µg/g
Zakres liniowości dla BÜHLMANN fCAL® turbo został wyznaczony zgodnie z wytycznymi EP06-A CLSI. Próbki o stężeniu powyżej 2000 µg/g zostały automatycznie rozcieńczone 1:10 przez analizator. Dopuszczono maksymalne odchylenie od liniowości wynoszące 10%. Dla wartości poniżej 75 µg/g dopuszczono różnicę bezwzględną mniejszą niż 7,5 µg/g.

Efekt wysokiej dawki
Próbki o stężeniach teoretycznych do 45715 µg/g można mierzyć bez ograniczenia zakresu pomiarowego testu.

Substancje interferujące
Wrażliwość testu BÜHLMANN fCAL® turbo na doustne farmaceutyki, suplementy diety, hemoglobinę oraz mikroorganizmy enteropatologiczne wyznaczono zgodnie z wytycznymi EP07-A2 CLSI. Za interferencję uznano odchylenie wyników powyżej 10%.

Nie wykryto interferencji z następującymi substancjami [Stężenie w mg/50 mg kału]; gyno-Tardyferon (0,11), Prednisone (0,31), Imurek (0,19), Salofalk (5,21), Asacol (2,50), Agopton (0,18), Vancocin (2,00), sulfametoksazol (1,6), trimetoprim (0,35), Ciproxine (1,25), Witamina E (0,30), Bion 3 (1,06), Hemoglobina (1,25).

Nie wykryto interferencji z następującymi mikroorganizmami enteropatologicznymi [Stężenie w jednostkach tworzących kolonię (CFU)/ mL ekstraktu kału]; *Escherichia coli* (3,3 x 10^7), *Salmonella enterica subsp. Enterica* (9,0 x 10^7), *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (5,3 x 10^7), *Citrobacter freundii* (12,9 x 10^7), *Shigella flexneri* (5,0 x 10^7), *Yersinia enterocolitica subsp*. *Enterocolitica* (9,8 x 10^7).

REFERENCJE

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 Legeforen 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. Moniuszko A et al.: Polish Arch. Intern. Med. 127, 312-318 (2017).
15. Naismith GD et al.: J Crohns Colitis 2014; 8, 1022-9.
16. Ferreiro-Iglesias R et al.: Scand J Gastroenterol 2016, 23, 1-6.
17. Ferreiro-Iglesias R1 et al. : J Clin Gastroenterol 2016; 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.

LISTA ZMIAN

Data	Wersja	Zmiana
2025-09-01	A6	Sprecyzowanie rozdziału *Przeznaczenie* przez dodanie platformy testowej. Edycja rozdziałów *Przechowywanie i trwałość odczynników*, *Materiały wymagane, ale niedostarczane*, *Ostrzeżenia i środki ostrożności*, *Progi kliniczne i ocena (tabela 10)* oraz *Referencje*. Zaktualizowano rozdział *Charakterystyka wydajności* (podrozdziały *Porównanie metod* i *Zakres liniowości*).

RAPORTOWANIE WYPADKÓW W PAŃSTWACH CZŁONKOWSKICH UE

W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek poważnego wypadku z udziałem tego urządzenia, należy bezzwłocznie zgłosić to producentowi i właściwemu organowi państwa członkowskiego.

USZKODZENIE PRZESYŁKI

Jeżeli produkt został uszkodzony należy poinformować o tym dystrybutora.

SYMBOLE

Firma BÜHLMANN stosuje symbole i oznaczenia wymienione i opisane w normie ISO 15223-1.
Definicje symboli można znaleźć w słowniczku symboli na stronie:
www.buhlmannlabs.ch/support/downloads/

Części zestawów i procedury przedanalityczne są chronione patentem przez EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2)

CE 0123