BÜHLMANN fCAL® ELISA

Calprotectin ELISA

Pro in vitro diagnostiku

EK-CAL	96 testů
EK-CAL2	192 testů

Datum vydání: 2022-11-16
Verze A3

Výrobce
BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Švýcarsko
Tel.: +41 61 487 1212
Fax:+41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

ČESKY

POUŽITÍ TESTU

Test BÜHLMANN fCAL® ELISA je *in vitro* diagnostický test pro kvantitativní stanovení kalprotektinu ve vzorcích lidské stolice při hodnocení zánětu střevní sliznice.
Stanovení slouží jako pomůcka při diagnostice k rozlišení organických zánětlivých onemocnění gastrointestinálního traktu (zánětlivého onemocnění střev (IBD), Crohnovy choroby (CD) nebo ulcerózní kolitidy (UC)) od funkčních onemocnění (syndrom dráždivého tračníku (IBS)) (1-7) u pacientů s chronickou bolestí břicha a také pro podporou při monitoringu zacíleného na IBD onemocnění (7-18).

Pouze pro laboratorní použití.

PRINCIP TESTU

BÜHLMANN fCAL® ELISA umožňuje selektivní měření kalprotektinu ve fekálních extraktech sendvičovým testem ELISA. Mikrotitrační destička BÜHLMANN fCAL® ELISA je potažena monoklonální protilátkou (mAb) vysoce specifickou pro heterodimerní a polymerní komplexy kalprotektinu. Vzorky pacientských extraktů, kontroly pro stanovení přijatelnosti testu ELISA a kalibrátory jsou naneseny do jamek mikrotitrační destičky. Po 30 minutové inkubaci při pokojové teplotě a promývacích krocích je detekční protilátka (Ab) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) a detekují se molekuly kalprotektinu vázané na protilátce na destičce. Po inkubaci a dalších promývacích krocích se přidá chromogenický HRP substrát, tetramethylbenzidin (TMB) (tvorba modré barvy), po které následuje zastavení reakce (změna na žlutou barvu). Absorpce se měří při 450 nm. Konečná koncentrace kalprotektinu v µg/g stolice ve vzorcích pacienta se stanoví pomocí kalibrační křivky získané z naměřených hodnot kalibrátorů.

DODÁVANÉ REAGENCIE A PŘÍPRAVA

Reagencie	Množství		Kat. č.	Příprava
	EK-CAL	EK-CAL2		
Extrakční pufr	3 láhve x 125 mL	6 lahví x 125 mL	B-CAL-EX	Připraven k použití
Mikrotitrační deska Potažena anti-kalprotektinem mAb	12 x 8 jamek	2 x 12 x 8 jamek	B-CAL-MP	Připraven k použití
Krycí fólie na destičku	3 kusy	6 kusů	-	Připraven k použití
Koncentrát promývacího pufru (10x) s konzervačními látkami	1 láhev x 100 mL	2 láhve x 100 mL	B-CAL-WB	Každou z nich zřeďte 900 mL deionizované H_2O
Inkubační pufr s konzervačními látkami	2 láhve x 125 mL	3 láhve x 125 mL	B-CAL-IB	Připraven k použití
Kalibrátory A až E[1) 2)] Kalprotektin získaný ze séra v pufr matrici s konzervačními látkami	5 lahviček x 1 mL	5 lahviček x 1 mL	B-CAL-CASET	Připraven k použití
Kontrola nízká/vysoká[3)] Kalprotektin získaný ze séra v pufr matrici s konzervačními látkami	2 lahvičky x 1 mL	2 lahvičky x 1 mL	B-CAL-CONSET	Připraven k použití
Enzymový marker Anti-kalprotektin Ab konjugovaný k HRP	1 lahvičky x 12 mL	2 lahvičky x 12 mL	B-CAL-EL	Připraven k použití
TMB Substrát TMB v citrátovém pufru	1 lahvičky x 12 mL	2 lahvičky x 12 mL	B-TMB12	Připraven k použití
Zastavovací roztok 0,25 M kyseliny sírové	1 lahvičky x 12 mL	2 lahvičky x 12 mL	B-STS12	Připraveno k použití **Korozivní složka**

Tabulka 1

1) Současné koncentrace kalprotektinu standardů A až E jsou 4, 12, 40, 120 and 240 ng/mL. Pro postup ELISA s nižším rozsahem musí být hodnoty kalibrátoru nastaveny takto: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g kalprotektinu. Toto přiřazení odpovídá konečnému ředění vzorku v poměru 1:2500 u postupu ELISA nižšího rozsahu.

2) Pokud si vyberete rozšířený ELISA postup, musí být použity následující koncentrace kalibrátorů v příslušném protokolu: 30, 90, 300, 900 a 1800 µg/g kalprotektinu. Toto přiřazení odpovídá konečnému ředění vzorku 1:7500 u postupu ELISA s rozšířeným rozsahem.

3) Kontroly obsahují šaržově specifická množství nativního lidského kalprotektinu. Aktuální koncentrace naleznete v příloze kontroly kvality.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA REAGENCIÍ

Uzavřené / Neotevřené reagencie	
Skladujte při 2–8°C. Nepoužívejte po vypršení doby expirace uvedené na štítcích.	
Otevřené / naředěné reagencie	
Extrakční pufr	Skladujte při 2–8 °C až 6 měsíců.
Mikrotitrační destička	Nepoužité stripy ihned vraťte do fólie obsahující vysoušecí balíčky a uzavřete podél celé hrany zipu. Skladujte až 6 měsíců při 2–8 °C.
Ředěný promývací pufr	Skladujte až 6 měsíců při 2-8 °C.
Inkubační pufr	
Kalibrátory	
Kontroly	
Enzymový marker	
TMB-substrát	
Zastavovací roztok	

Tabulka 2

REAGENCIE DODÁVANÉ NA VYŽÁDÁNÍ

Zařízení pro fekální extrakci

Zařízení na odběr stolice popsané v tabulce 3 nejsou dodávány spolu se soupravou. Vybraná extrakční zařízení je třeba objednat samostatně.

Extrakční zařízení	Množství	Kat.číslo
CALEX® Cap	Balení 50, 200, 500 ks zkumavek, každá naplněna 5mL extrakčním pufrem,	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 zkumavek, špachtle a nádobky	B-CAL-RD

Tabulka 3

POŽADOVANÉ MATERIÁLY NEDODÁVANÉ SE SOUPRAVOU

Postup extrakce

- 100 µL a 1000 µL přesných pipet s jednorázovými špičkami
- Jednorázové polystyrenové nebo polypropylenové zkumavky pro přenos extraktů (nepovinné
- Laminární box
- Vortex mixér pro více zkumavek / Vortex mixer
- Mikrocentrifuga (≥3000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)
- Extrakční zařízení (viz tab.3 výše) nebo pro postup manuální extrakce:
  - 10 µL jednorázové očkovací smyčky
  - 15 mL polypropylenové zkumavky se šroubovacími uzávěry
  - přesná váha (10-200 mg)

ELISA prostup

- 10 µL, 100 µL a 1000 µL přesné pipety s jednorázovými špičkami
- Jednorázové polystyrenové nebo polypropylenové zkumavky pro přípravu roztoků vzorku.
- 1000 mL odměrný válec k ředění promývacího pufru.
- Promývačka mikrotitračních destiček (viz Poznámky k postupu) nebo mačkací lahve na promývací pufr.
- Rotátor mikrotitrační destičky (viz Poznámky k postupu)
- Savý papír
- Čtečka mikrotitračních destiček pro měření a absorpci při 450 nm.

VAROVÁNÍ A OPATŘENI

Bezpečnostní opatření

- Kalibrátory a kontroly této soupravy obsahují látky lidského původu. Ikdyž byly testovány s negativním výsledkem na povrchový antigen HBV, stejně tak protilátky HCV a HIV1/2, mělo by se s těmito látkami zacházet, jako s potenciálně infekčními a mělo by se s nimi zacházet v souladu se Správnou laboratorní praxí (GLP) za použití příslušných opatření.
- Tato souprava obsahuje komponenty klasifikované v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008:

  2-methyl-4-isothiazolin-3-one hydrochlorid (konc. ≥ 0,0015%), proto mohou činidla vyvolat alergické kožní reakce (H317).

  Kyselinu sírovou (konc. ≥2,5 - <5 %), proto mohou činidla způsobit podráždění kůže (H315) a vážné podráždění očí (H319).
- Vyhněte se kontaktu reagencií s kůží, očima a sliznicemi. Po kontaktu s očima nebo kůží, opláchněte velkým množstvím vody, může se objevit podráždění a popálení.
- S reagenciemi a chemikáliemi se musí zacházet jako s nebezpečným odpadem podle vnitrostátních pokynů nebo nařízení o biologicky nebezpečném odpadu.

TECHNICKÁ OPATŘENÍ

Součásti soupravy

- Zbytky v jamkách mikrotitrační destičky jsou výsledkem výrobního procesu. Odstraní se v promývacím kroku (postup testu krok 3) a neovlivní výsledky.
- Součásti soupravy nesmí být použity po datu expirace vyznačeném na štítku.
- Nemíchejte různé šarže reagencií.
- Veškeré úsilí by mělo vést k zajištění toho, aby mezi reagenciemi, vzorky nebo jamkami nenastala zkřížená kontaminace.
- Nechte reagencie ustálit na pokojovou teplotu. Dobře promíchejte (vortex) reagencie před použitím.
- Mikro jamky nesmí být použity víckrát.

Proces manuální extrakce

- K získání kvantitativních výsledků je důležité homogenizovat celý vážený vzorek stolice v extrakčním pufru. Vyhněte se kontaminaci na vrchní části zkumavky. Po extrakci může zůstat malé množství nerozpustných (nestrávených) částí ve zkumavce.

ELISA postup

- V postupu ELISA jsou promývací kroky stěžejní pro garanci reprodukovatelnosti výsledků. Nechejte promývací pufr inkubovat v jamkách alespoň 20 vteřin před odstraněním.
- Při použití automatické promývačky se důrazně doporučuje použít „plate mode“, tj. každý krok postupu (ředění/aspirace) je proveden na všech stripech, než přístroj pokračuje dalším mycím cyklem. Tím je zaručen minimální inkubační čas.
- Uvedený počet promývacích cyklů je povinný pro zajištění reprodukovatelnosti výsledků.
- Rotátor destičky (shaker) musí mít 450 pm (7,5 Hz). Vyšší rotační frekvence může způsobit slabou ředicí linearitu při hodnotách mezi 300/900 a 600/1800 µg/g. Místo horizontálního pohybu by měl být použit pohyb rotační.
- Aby byla zajištěna úplná interakce antigen / protilátka, inkubační doba v kroku 5 musí být nejméně 30 minut. Mírně delší doba inkubace (až o 5 minut) nemá vliv na konečný výsledek.
- Označený enzym je inaktivováno kyslíkem a je vysoce citlivý na azid sodný, thimerosal, kyselinu chlornou a aromatické chlorovodíky, které se často nacházejí v

laboratořích ve vodě. Proto používejte pouze deionizovanou vysoce jakostní vodu.

- Pokaždé, když je proveden test, musí být vždy vygenerována nová standardní křivka (každá destička, nebo částečně).
- Pokud je počáteční koncentrace neznámého vzorku vyšší než koncentrace nejvyššího kalibrátoru (Kalibrátor E), vzorek může být dále naředěn inkubačním pufrem a testován dál podle postupu testu. Výsledný ředicí faktor musí být zohledněn při kalkulaci výsledku.

ODBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKU

Při použití extrakčního zařízení je pro extrakci zapotřebí méně než 1 g vzorku nativní stolice. Vzorky stolice by měly být shromažďovány do obyčejných tub.

Důležité: Vzorek musí být odebrán bez chemických nebo biologických příměsí.

Přeprava vzorků

Vzorky stolice by měly být dopraveny do laboratoře 3 dny od odběru. Vzorky mohou být přepravovány při pokojové teplotě nebo zmražené.

Skladování vzorků

Získané vzorky stolice by měly být uchovávány v chladničce při 2-8 °C a extrahovány do 3 dnů od přijetí v laboratoři. Vzorky neskladujte při zvýšených teplotách.

EXTRAKCE VZORKŮ STOLICE A STABILITA EXTRAKTU

1. CALEX® Cap

1.1 Postup extrakce

Postupujte podle návodu k použití u CALEX® Cap (ozn B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Zařízení CALEX® Cap: Tekuté vzorky stolice lze pipetovat přímo do zařízení CALEX® Cap. Odšroubujte modrý uzávěr a napipetujte 10 µL vzorku stolice do zařízení. CALEX® Cap znovu zavřete a pokračujte krokem vortexování podle postupu extrakce popsaného a znázorněného v návodu k použití dodaném se zařízením CALEX® Cap.

Důležité: Po extrakci odstřeďte zařízení CALEX® Cap po dobu 5 minut při 500-3000 x g a pokračujte v postupu stanovení.

1.2 Extract storage Stabilita extraktu

Kalprotektin v extraktech získaných pomocí CALEX® Cap je stabilní při pokojové teplotě (23 ° C) po dobu 7 dnů, při teplotě 2-8 ° C až po dobu 15 dnů. Pro delší uskladnění zmrazte vzorky na -20 °C. Zmrazené vzorky jsou stabilní po dobu až 23 měsíců. CALEX® Cap extrakty mohou být mraženy přímo a skladovány v CALEX® Cap zařízení. Extrakty mohou být podrobeny čtyřem cyklům zmrazování a rozmrazování. Před měřením nechte zmrazené extrakty vyrovnat na pokojovou teplotu, důkladně je 10 sekund vortexujte a odstřeďujte 5 minut při 500-3000 x g.

2. Other extraction devices Další extrakční zařízení

2.1 Extraction procedures Extrakční postupy

Postupujte podle návodu k použití dodaného s příslušným extrakčním zařízením:

- Zařízení pro extrakci stolice Roche (kód 10745804322) nebo BÜHLMANN Smart-Prep (kód: B-CAL-RD).

Důležité: Po extrakci pomocí BÜHLMANN Smart Prep odstřeďujte zkumavky 5 minut při 3000 x g. Případně homogenát přeneste do 2 mL zkumavky Eppendorf a odstřeďujte jej v mikrocentrifuze 5 minut při 3000 x g. Supernatant dekantujte do nové, označené zkumavky a pokračujte v postupu stanovení.

2.2 Extract storage

Extrakty fekálního kalprotektinu získané pomocí Smart-Prep jsou stabilní při teplotě 2-8 °C po dobu ≤7 dnů nebo při -20 °C po dobu 36 měsíců.

3. Manuální extrakce

3.1 Postup extrakce

1. Označte a zvažte prázdnou polypropylenovou zkumavku společně s inokulační kličkou. Zapište si hodnotu (tára).
2. Vyjměte 50 až 100 mg vzorku stolice pomocí inokulační kličky a vložte ji do předem zvážené zkumavky (hrubá hmotnost). Vyhněte se zachycení vlákniny ve vzorku během odběru.
3. Vypočítejte čisté množství vzorku odečtením táry od hmotnosti, odlomte inokulační kličku a nechte spodní část smyčky ve zkumavce.
4. Přidejte extrakční pufr podle vzorce x mg stolice x 49 = y µL extrakčního pufru (např. 50 mg stolice+ 2450 µL pufru) a zkumavku uzavřete.
5. Extrahujte vzorky pomocí
   - Extrakční zkumavku obsahující pufr a vzorek stolice intenzivně vortexujte (při nejvyšších otáčkách) po dobu 30 sekund.
   - Poté inkubujte extrakční zkumavku 25 +/-5 minut na třepačce při cca 400 rpm. Očkovací smyčka uvnitř zkumavky slouží k posílení míchání.
   - Extrakční zkumavku opět intenzivně vortexujte po dobu 30 sekund.
6. Přeneste 1,5 mL homogenátu do 2 mL zkumavky Eppendorf a centrifugujte v mikrocentrifuze po dobu 5 minut při 3000 x g.
7. Odeberte supernatant do čisté, označené zkumavky a pokračujte v postupu analýzy nebo uchovávejte (viz skladování extraktů).

3.2 Skladování extraktů

Fekální kalprotektin získaný manuální extrakcí lze skladovat při 2-8 °C pro dobu maximálně 7 dní nebo při -20 °C po dobu 36 měsíců.

PRACOVNÍ ROZSAH

Test může být proveden podle následujících postupů; pro nižší nebo rozšířený rozsah ELISA. Postup, který má být zvolen, závisí na očekávané koncentraci kalprotektinu ve vzorcích:

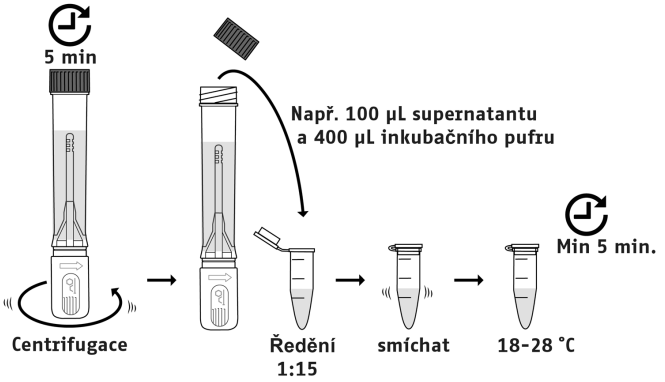
- U vzorků do 600 µg / g zvolte postup nižšího rozsahu (pracovní rozsah 10-600 µg/g).
- Pokud vzorky mají tendenci přesahovat 600 µg/g, zvolte postup rozšířeného rozsahu (pracovní rozsah 30-1800 µg/g).

POSTUP STANOVENÍ

Důležité: Před použitím nechte reagencie vytemperovat na 18-28 ° C. Řeďte pouze extrakty stolice. Kalibrátory a kontroly jsou připraveny k použití.

1. Možnost zředění vzorku 1:
Pracovní rozsah 10-600 µg/g

1.1. CALEX® Cap: Extrakt stolice zřeďte 1:5 inkubačním pufrem (např. 100 µL extraktu a 400 µl inkubačního pufru) a dobře promíchejte. Nechte vzorky ustálit po dobu nejméně 5 minut při teplotě 18-28 °C než přejdete ke kroku 4c.

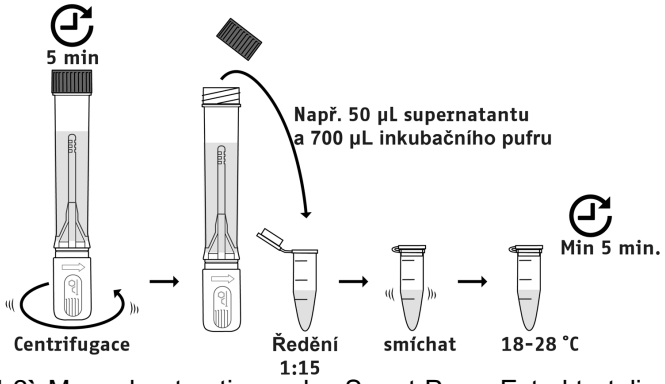


1.2 Manual extraction nebo Smart-Prep: Zřeďte extrakty stolice v poměru 1:50 s inkubačním pufrem (např. 20 µL extraktu a 980 µL inkubačního pufru) a dobře promíchejte. Než přejdete ke kroku 4c, nechte vzorky alespoň 5 minut ustálit při teplotě 18-28 °C.

1.` Možnost zředění vzorku 2:
Pracovní rozsah 30-1800 µg/g

Pracovní rozsah může být prodloužen 3krát, pokud zředíte vzorky 1: 7500 místo 1: 2500. Tento postup se doporučuje, pokud lze očekávat vysokou koncentraci kalprotektinu.

1.1` Zařízení CALEX® Cap: Extrakty stolice zřeďte inkubačním pufrem 1:15 (např. 50 µL extraktu a 700 µL inkubačního pufru) a dobře promíchejte. Předtím, než přejdete ke kroku 4c, nechte vzorky ustálit po dobu nejméně 5 minut při teplotě 18-28 °C.

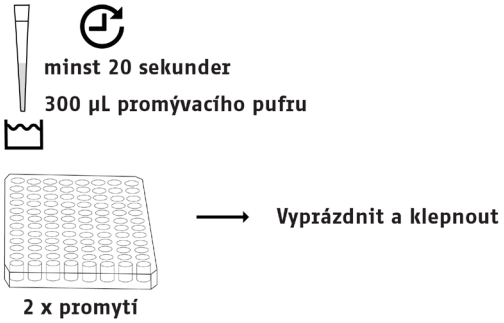


1.2` Manual extraction nebo Smart-Prep: Extrakt stolice zřeďte 1:50 inkubačním pufrem (např. 20 µL extraktu a 2980 µL inkubačního pufru) a dobře promíchejte. Předtím než přejdete ke kroku 4c, nechte vzorky ustálit po dobu nejméně 5 minut při teplotě 18-28 °C.

2. Připravte desku s dostatečným množstvím proužků pro otestování požadovaného počtu kalibrátorů, kontrol a zředěných vzorků. Odstraňte přebytečné proužky z držáku a neprodleně je utěsněte do fóliového sáčku společně s vysoušeči. Uchovávejte v chladu.

3. Dvakrát potažené jamky promyjte nejméně 300 µL promývacího pufru na jamku. Vyprázdněte jamky pevným poklepem na blotovací papír.

Důležité: Pro každý ze tří promývacích kroků musí být zajištěna minimální doba inkubace 20 sekund s promývacím pufrem v jamkách.



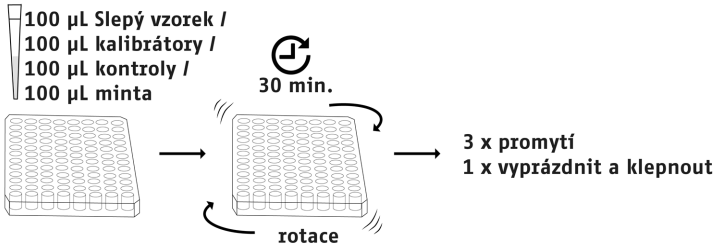
4a. Pipetujte 100 µL inkubačního pufru (blank) a do příslušných jamek pipetujte 100 µL kalibrátoru A-E.

4b. Pipetujte 100 µL nízké a vysoké kontroly do příslušných jamek.

4c. Pipetujte 100 µL každého zředěného vzorku do následujících jamek.

5. Desku zakryjte fólií a inkubujte 30 + max. 5 minut na rotátoru nastaveném na 450 otáček za minutu při 18-28 °C (viz Technická opatření - postup ELISA).

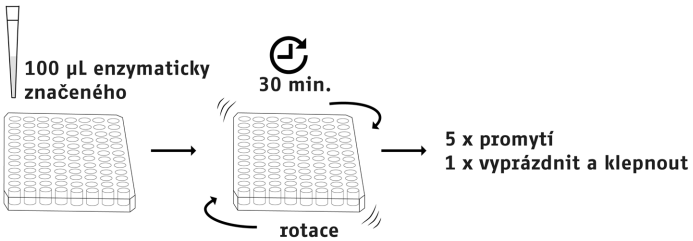
6. Odstraňte a zlikvidujte těsnicí fólii. Vyprázdněte jamky a promyjte třikrát nejméně 300 µL promývacího pufru na jamku (viz Technická opatření - postup ELISA). Vyprázdněte jamky pevným poklepem na blotovací papír.



7. Do každé jamky pipetujte 100 µL značeného enzymu.

8. Desku zakryjte fólií a inkubujte 30 ± 5 min na rotátoru nastaveném na 450 ot / min při 18-28 °C.

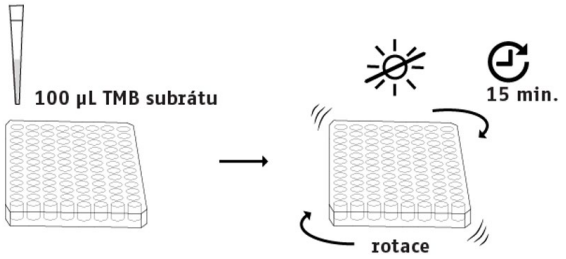
9. Odstraňte těsnicí fólii. Destičky vyprázdněte a pětkrát promyjte nejméně 300 µL promývacího pufru na jamku. Vyprázdněte jamky pevným poklepem na blotovací papír.



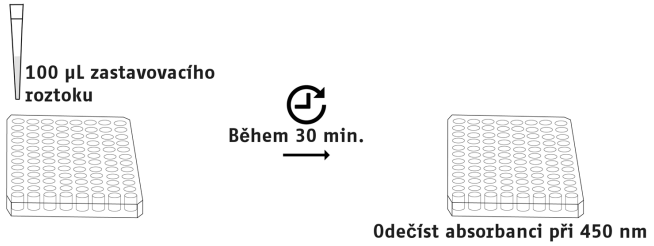
Důležité: Roztok substrátu TMB nechte temperovat na 18-28 °C.

10. Do všech jamek pipetujte 100 µL roztoku substrátu TMB.

11. Přikryjte desku těsnicí fólií, chraňte desku před přímým světlem a inkubujte po dobu 15 ±2 min na rotátoru nastaveném na 450 ot / min při 18 až 28 °C.



12. Do všech jamek pipetujte 100 µL zastavovacího roztoku. Odstraňte vzduchové bubliny špičkou pipety. Za 30 minut pokračujte krokem 13.
13. Odečtěte absorbanci při 450 nm na čtečce mikrotitračních destiček.



KONTROLA KVALITY

Důkladné pochopení tohoto návodu je nezbytné pro úspěšné použití soupravy. Spolehlivé výsledky budou získány pouze přesnými laboratorními technikami (platnými pokyny GLP) a přesně podle tohoto návodu pro použití.

BÜHLMANN fCAL® ELISA se dodává se dvěma kontrolami: nízkou a vysokou. Odpovídající referenční hodnoty kontrol jsou uvedeny v listu s údaji o kontrole kvality dodávaném s každou soupravou. Hodnoty a rozsahy uvedené v QC listu s údaji o kontrole kvality se vždy vztahují k aktuální šarži soupravy a měly by být použity pro přímé porovnání výsledků. Pokud jsou výsledky nízkých a/nebo vysokých hodnot kontrol mimo rozsah uvedený v listu s údaji o kontrole kvality, doporučuje se považovat celou sérii za neplatnou.

Kromě kontrolních vzorků soupravy se doporučuje používat také interní kontrolní vzorky v souladu s místními a vnitrostátními předpisy. Použití interních kontrolních vzorků se doporučuje k zajištění každodenní platnosti výsledků. Vzhledem k tomu, že není komerčně dostupná žádná kontrola fekálního kalprotektinu, doporučujeme pro interní kontrolu kvality použít soubor extraktů stolice s normálními a patologickými hladinami.

Reprodukovatelnost standardních parametrů křivky a kontrolních hodnot by měla být v rámci stanovených limitů laboratorní přijatelnosti. Pokud test nesplňuje stanovené limity a opakování vyloučilo chyby v technice, zkontrolujte následující: i) pipetování, řízení teploty a časování ii) nastavení čtečky ELISA iii) data expirací reagencií iv) podmínky skladování a inkubace v) roztok substrátu TMB musí být bezbarvý vi) čistotu vody, vii) aspirační a promývací postupy.

STANDARDIZACE A METROLOGICKÁ NÁVAZNOST

Pro analyt kalprotektinu ve vzorku stolice neexistují žádné mezinárodně nebo národně uznávané referenční materiály nebo referenční postupy měření. Hodnoty kalibrátoru BÜHLMANN fCAL® ELISA jsou přiřazeny v několika měřeních s použitím interního referenčního materiálu na bázi lidského séra a postupu měření BÜHLMANN fCAL® ELISA. Koncentrace kalprotektinu v interním referenčním materiálu byla stanovena pomocí purifikovaného MRP8/14 z lidských granulocytů jako primárního referenčního materiálu.
Byl stanoven 95% interval spolehlivosti kombinované nejistoty kalibrátorů produktu nižší než 13,3%, kombinovaná nejistota kontrol produktu nižší než 16,4%.

VÝSLEDKY A VÝPOČET

Standardní křivka

Doporučuje se použít softwarový program, který je schopen provést následující výpočty; pro výpočet hodnoty kalibrátoru odečtěte hodnotu OD slepé jamky od každé jamky kalibrátoru. Sestavte standardní křivku pomocí čtyřparametrové logistické (4 PL) křivky.

Kontroly a vzorky

Doporučuje se použít softwarový program, který je schopen provést následující výpočty; odečtěte hodnotu OD slepého vzorku od každé kontrolní jamky/jamky se vzorkem. Vypočítejte koncentraci kalprotektinu v každé jamce kontroly/vzorku v µg/g pomocí stanovené standardní křivky.

Pracovní rozsah 10-600 µg/g

Pokud zvolíte postup ELISA s nižším rozsahem, musí být koncentrace kalibrátoru nastaveny jako: 10, 30, 100, 300 a 600 µg/g kalprotektinu. Dodatečné ředicí faktory (při použití jiného konečného ředění než 1: 2500) musí být vynásobeny s výsledky, aby se získaly konečné výsledky.

Viz tabulka 12 a obrázek 1 pro typická data (výsledky a standardní křivka). Tyto výsledky a standardní křivka jsou poskytovány pouze pro demonstrační účely. Pro testování každé sady vzorků musí být stanovena standardní křivka.

Pracovní rozsah 30-1800 µg/g

Pokud zvolíte postup rozšířeného rozsahu ELISA, je třeba nastavit následující jmenovité hodnoty kalibrátoru: 30, 90, 300, 900 a 1800 µg/g kalprotektinu. Dodatečné ředicí faktory (při použití jiného konečného ředění než 1: 7500) musí být vynásobeny s výsledky, aby se získaly konečné výsledky.
Typické údaje (výsledky a standardní křivka) jsou uvedeny v tabulce 15 a na obrázku 3. Tyto výsledky a standardní křivka jsou uvedeny pouze pro demonstrační účely. Standardní křivka musí být vytvořena pro každou sadu vzorků, které mají být testovány.

OMEZENÍ

- Reagencie dodávané s kitem BÜHLMANN fCAL® ELISA jsou určeny pouze pro stanovení hladin kalprotektinu v lidských vzorcích stolice.
- Výsledky testů by měly být interpretovány ve spojení s informacemi dostupnými z klinického hodnocení pacienta a dalších diagnostických postupů.

- Pro sledování onemocnění IBD bylo navrženo několik měření fekálních kalprotektinů prováděných v intervalech až 4 týdnů, které mají nejlepší diagnostickou přesnost při předpovědi klinického relapsu u pacientů (viz 19-20).
- Výsledky nelze klinicky použít u dětí mladších 4let, které mají mírně zvýšenou hladinu kalprotektinu ve stolicii (viz 21-24).
- Někteří pacienti, kteří užívají nesteroidní protizánětlivé (NSAID) léky pravidelně, mohou mít zvýšenou hladinu kalprotektinu ve stolici.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

I. Odlišení organického onemocnění od funkčního gastrointestinálního onemocnění

Kategorie výsledků vycházejí z údajů klinických studií provedených společností BÜHLMANN a jsou doporučením společnosti BÜHLMANN. Všechny výsledky testů by měly být interpretovány ve spojení s informacemi dostupnými z klinických příznaků pacienta, anamnézy a dalších klinických a laboratorních nálezů.

Klinické prahové hodnoty

Pro získání hodnot popsaných v tabulce 4 byly analyzovány výsledky 58 klinických vzorků od pacientů s diagnózou IBS a 131 klinických vzorků od pacientů s diagnózou IBD z mezinárodní klinické studie.

Koncentrace kalprotektinu	Interpretace	Další postup
< 80 µg/g	Normální	Žádný
80 – 160 µg/g	Šedá zóna/Hraniční	Opakování během 4 – 6 týdnů
> 160 µg/g	Zvýšená	Opakování dle potřeby

Tabulka 4

Hodnoty kalprotektinu nižší než 80 µg/g

Hodnoty fekálního kalprotektinu <80 µg/g nesvědčí o zánětu v gastrointestinálním traktu. U pacientů s nízkými hodnotami kalprotektinu není pravděpodobné, že by potřebovali invazivní zákroky ke zjištění příčiny zánětu.

Hodnoty kalprotektinu v rozmezí 80 až 160 µg/g

Střední hodnoty kalprotektinu ve stolici mezi 80 a 160 µg/g, nazývané také hodnoty v šedé zóně, přímo neindikují aktivní zánět, který by vyžadoval okamžité sledování pomocí invazivního vyšetření. Přítomnost zánětu však nelze vyloučit. Ke stanovení zánětlivého stavu se doporučuje opětovné vyhodnocení hladin fekálního kalprotektinu po 4 až 6 týdnech.

Hodnoty kalprotektinu nad 160 µg/g

Hodnoty fekálního kalprotektinu >160 µg/g svědčí o infiltraci neutrofilů v gastrointestinálním traktu; mohou tedy signalizovat přítomnost aktivního zánětlivého onemocnění. K dosažení celkové klinické diagnózy se navrhují další vhodné vyšetřovací postupy u specialistů.

Klinické hodnocení

Schopnost testu BÜHLMANN fCAL® ELISA rozlišovat mezi pacienty s IBD a jinými nezánětlivými poruchami trávicího traktu, včetně IBS, byla testována v klinické studii s celkem 337 dospělými a dětskými pacienty. Sto třicet pět (135) pacientů mělo konečnou diagnózu IBD (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida nebo neurčitá kolitida), 130 pacientů trpělo IBS a 72 pacientů mělo bolesti břicha a/nebo průjem nebo jiné nezánětlivé stavy související s trávicím traktem (viz tabulka 5). Konečná diagnóza byla podpořena endoskopickými a dalšími klinickými nálezy.

Při rozlišení mezi IBD a nezánětlivými stavy souvisejícími s trávicím traktem, včetně IBS, lze dosáhnout klinické senzitivity 93,3% při 80 µg/g a klinické specificity 83,7% při 160 µg/g. Výsledkem analýzy křivky ROC je AUC 0,923 (viz tabulka 6).

Při rozlišení IBD a IBS lze dosáhnout klinické senzitivity 93,3% při 80 µg/g a klinické specificity 85,4% při 160 µg/g. Výsledkem analýzy křivky ROC je AUC 0,933 (viz tabulka 8).

Optimální kombinaci hodnot pro tyto skupiny pacientů lze definovat pomocí analýzy ROC při kalprotektinu 80 µg/g a 160 µg/g, která je o něco přísnější než kombinace **citlivější dolní hranice 50 µg/g** s nižší výkonností ve specificitě a **horní hranice 200 µg/g** s o něco nižší citlivostí (tabulka 7 a 9).

II. IBD monitoring

Klinické prahové hodnoty a zhodnocení

Stanovení fekálního kalprotektinu je také spolehlivým a jednoduchým způsobem, jak napomoci monitorování pacientů s IBD (viz 7-18).
Korelace hladin kalprotektinu a zánětlivého stavu střevní sliznice pacienta podle endoskopických hodnocení byla stanovena ve třech nezávislých studiích s použitím kalprotektinových testů BÜHLMANN (tabulka 10). Diagnostická hodnota kalprotektinu při předpovědi klinické remise a relapsu podle symptomů pacienta, klinických ukazatelů aktivity, neplánované potřeby eskalace terapie, hospitalizace nebo nouzové situace byla stanovena ve třech studiích s použitím kalprotektinových testů BÜHLMANN (tabulka 11).
Uvedené kategorie výsledků jsou doporučením a jejich stanovení vychází ze zkrácených znalostí publikovaných hraničních hodnot a studií klinické výkonnosti. Doporučuje se, aby zdravotníci stanovili individuální hraniční hodnoty pro jednotlivé pacienty stanovením výchozí hladiny kalprotektinu u pacienta v době remise onemocnění.

Hodnoty kalprotektinu pod 100 µg/g

Fekální hladiny kalprotektinu pod 100 µg/g mohou spolehlivě indikovat pacienty s nízkým rizikem klinického relapsu při endoskopické remisi, u které lze zabránit invazivním endoskopickým postupům (viz 7-18).

Hodnoty kalprotektinu mezi 100 and 300 µg/g

Stupně kalprotektinu ve 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

Při zjištění hladiny fekálního kalprotektinu vyšší než 300 µg/g by se testy měly opakovat, a pokud se potvrdí zvýšené hladiny, měly by se provést další vyšetřovací postupy (ref. 7-18).

CHARAKTERISTIKY VÝKONU

Výkonnostní charakteristiky testu BÜHLMANN fCAL® ELISA byly stanoveny pomocí manuální extrakční metody, pokud není uvedeno jinak.

Pracovní rozsah: 10 - 600 µg/g

Opakovatelnost: 1,9 – 8,0% CV

Přesnost v rámci laboratoře: 5,5 – 14,0% CV

Opakovatelnost a vnitrolaboratorní přesnost byly stanoveny na základě pokynu CLSI EP05-A2 s použitím studie 22 dní x 2 opakování. Bylo testováno deset extrahovaných vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 13,2 - 501,4 µg/g (tabulka 13).

Detekční limi (LoD): 4,2 µg/g

LoD byla stanovena podle pokynu CLSI EP17-A a s podílem falešně pozitivních výsledků (α) menším než 5% a falešně negativních výsledků (β) menším než 5% na základě 240 stanovení s 80 slepými pokusy (extrakční pufr) a 160 nízkoúrovňovými replikáty; a **LoB 0,29 µg/g.**

Mez kvantifikace (LoQ): 9,8 µg/g

Limit LoQ byl stanoven na základě údajů získaných v rámci studie přesnosti v laboratoři, včetně dodatečného vzorku stolice o koncentraci 7,4 µg/g. LoQ byla stanovena jako koncentrace kalprotektinu, při níž nelineární shoda celkových údajů o přesnosti protíná cíl přesnosti 20% CV.

Linearita: 10 - 600 µg/g

Lineární rozsah testu BÜHLMANN fCAL® ELISA byl stanoven podle pokynu CLSI EP06-A. Byla povolena maximální odchylka od linearity ±20%. Pro hodnoty nižší než 75 µg/g byla povolena absolutní odchylka menší než ±15 µg/g (tabulka 14).

Přesnost/obnovení

Celková odchylka: -1,1%;

Dolní mez shody: -17,5%,

Horní mez shody: 15,4%

Čtyři negativní extrahované vzorky stolice byly obohaceny o zvyšující se množství kalprotektinu ze vzorků séra. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 2.

Hook efekt při vysoké dávce

Vzorky s teoretickou koncentrací až ~60'000 µg/g lze analyzovat bez omezení měřicího rozsahu testu.

Pracovní rozsah: 30 - 1800 µg/g

Opakovatelnost: 1,7 – 5,8% CV

Přesnost v rámci laboratoře: 3,1 – 9,4% CV

Opakovatelnost a vnitrolaboratorní přesnost byly stanoveny podle pokynu CLSI EP05-A3 za použití studie 10 dní x 2 série x 4 opakování. Bylo testováno sedm směsných extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 38,5 - 918,0 µg/g (tabulka 16).

Přesnost mezi jednotlivými šaržemi: 4,2 – 9,7% CV

Přesnost mezi jednotlivými šaržemi byla stanovena podle pokynu CLSI EP05-A3 s použitím studie 3 šarže x 5 dní x 5 opakování a modelu náhodných efektů složek rozptylu. Bylo testováno šest extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 46,4 - 1476,1 µg/g (tabulka 17).

Reprodukovatelnost (studie hodnocení přesnosti na více místech): 6,4 – 19,0% CV

Reprodukovatelnost byla stanovena podle pokynu CLSI EP05-A3 s použitím studie 3 laboratorní pracoviště x 2 operátoři x 5 dní x 2 cykly denně x 4 replikáty. Ve studii byly použity tři šarže reagencií. Bylo testováno pět směsných extraktů vzorků stolice s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 42,1 - 1053,3 µg/g (tabulka 18).

Mez detekce (LoD): 12,6 µg/g

LoD byla stanovena podle pokynu CLSI EP17-A2 a s podílem falešně pozitivních výsledků (α) menším než 5% a falešně negativních výsledků (β) menším než 5% na základě 120 stanovení s 60 slepými pokusy (extrakční pufr) a 60 nízkoúrovňovými replikáty; a **LoB 8,3 µg/g**.

Mez kvantifikace (LoQ): 21,3 µg/g

LoQ byla stanovena podle pokynu CLSI EP17-A2 na základě 60 stanovení a cíle přesnosti 20% CV.

Linearita: 30 - 1800 µg/g

Lineární rozsah testu BÜHLMANN fCAL® ELISA byl stanoven podle pokynu CLSI EP06-A. Byla povolena maximální odchylka od linearity ±20%. Pro hodnoty nižší než 75 µg/g byla stanovena absolutní odchylka menší než ±15 µg/g (tabulka19).

Přesnost / výtěžnost: 96,4 – 102,2%

Sedm extraktů vzorků stolice s hladinami kalprotektinu v rozmezí 46,5 - 990,2 µg/g bylo obohaceno o 180 µg/g kalprotektinu v kalibračním materiálu. Spikování bylo provedeno na 10% objemu extraktu vzorku. "Základní" vzorky byly spikovány odpovídajícím množstvím inkubačního pufru. Vzorky "základní" a "základní + spike" byly měřeny ve třech opakováních (tabulka 20).

Preanalytika

Výkonnostní charakteristiky testu BÜHLMANN fCAL® ELISA s ohledem na preanalytické postupy byly stanoveny s použitím pracovního rozsahu 30 – 1800 µg/g.

Reprodukovatelnost extrakce - manuální extrakce: 9,5 – 20,5%

Reprodukovatelnost extrakce byla stanovena podle pokynu CLSI EP05-A3 za použití studie 10 extrakcí x 2 opakování. Bylo testováno devět klinických vzorků stolice, včetně pevných, polotuhých a tekutých konzistencí vzorků, s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 51,2 – 1783,7 µg/g (tabulka 21).

Reprodukovatelnost extrakce – CALEX® Cap: 7,9 – 16,9%

Reprodukovatelnost extrakce byla stanovena podle pokynu CLSI EP05-A3 s použitím 3 šarží přípravku CALEX® Cap x 4 extrakce x 4 opakování. Bylo testováno pět klinických vzorků stolice, včetně pevných, polotuhých a tekutých konzistencí vzorků, s koncentracemi kalprotektinu v rozmezí 42,5 – 2949,9 µg/g (tabulka 22).

Srovnání metod CALEX® Cap vs. manuální extrakce

Odchylka při 80 µg/g: 5,9% (95% CI: 1,4 – 12,2%)

Odchylka při 160 µg/g: 12,0% (95% CI: 7,8 – 17,0%)

Průměrná odchylka: 10,1% (95% CI: 5,7 – 14,5%)

Metoda srovnávací studie byla provedena podle pokynu CLSI EP09-A3. Dvě stě čtyřicet jedna (241) klinických vzorků bylo extrahováno pomocí jedné šarže zařízení

CALEX® Cap. Referenční hodnoty s konečným intervalem koncentrace kalprotektinu 30,5 - 1496,6 µg/g byly stanoveny pomocí manuální extrakční metody. U obou metod byly extrakty měřeny v jednotlivých stanoveních. Odchylka byla stanovena pomocí Passing-Bablokovy lineární regrese a Bland-Altmanovy analýzy (tabulky 23 a 24).

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Citlivost testu BÜHLMANN fCAL® ELISA na perorální léčiva, doplňky stravy, hemoglobin a entero-patologické mikroorganismy byla hodnocena podle směrnice CLSI EP07-A2 s použitím rozšířeného pracovního rozmezí. Zkreslení výsledků přesahující 10% bylo považováno za interferenci. U látek uvedených v tabulce 25 nebyla zjištěna žádná interference až do uvedených koncentrací. Nebyla zjištěna žádná interference s entero-patologickými mikroorganismy, uvedenými v tabulce 26, až do uvedeného množství jednotek tvořících kolonie (CFU) na mL extraktu vzorku stolice.

TABULKY A GRAFY

Klinická studie

Klinická studie – rozlišující organické onemocnění od funkčního gastrointestinálního onemocnění

Konečné diagnózy	Rozložení výsledků pacientů v počtech (procentech) v diagnostickém rozmezí BÜHLMANN fCAL® ELISA			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Celkem
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Další GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabulka 5

IBD vs. non-IBD	Klinický rozhodovací bod	
	80 µg/g	160 µg/g
Senzitivita (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specifičnost (95% CI)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
PPV (95% CI)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
NPV (95% CI)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
ROC AUC (95% CI)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabulka 6

IBD vs. non-IBD	Klinický rozhodovací bod	
	50 µg/g	200 µg/g
Senzitivita (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specifičnost (95% CI)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
PPV (95% CI)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
NPV (95% CI)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabulka 7

IBD vs. IBS	Klinický rozhodovací bod	
	80 µg/g	160 µg/g
Senzitivita (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specifičnost (95% CI)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
PPV (95% CI)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
NPV (95% CI)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
ROC AUC (95% CI)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabulka 8

IBD vs. IBS	Klinický rozhodovací bod	
	50 µg/g	200 µg/g
Senzitivita (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specifičnost (95% CI)	59,2% (50,3% ,67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
PPV (95% CI)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
NPV (95% CI)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabulka 9

non-IBD – IBS + jiné GI
CI - interval spolehlivosti
PPV – pozitivní prediktivní hodnota
NPV – negativní prediktivní hodnota
ROC AUC – oblast pod křivkou operační charakteristiky křivky

Klinické studie – IBD monitoring

Kalprotektin vs. aktivita IBD stanovená endoskopicky	Studie 1 – Španělsko (ref. 9)	Studie 2 – Španělsko (ref. 10)	Studie 3 – Austrálie, Nový Zéland (ref. 11)
Počet pacientů a demografie	89 (CD[2]) Věk: 32-58 44% muži	123 (UC[3]) Věk: 18-85 66,4% muži	99 (CD[2] po resekci) Věk: 29-47 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

[1] Studie 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL a Quantum Blue® fCAL high range
Studie 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
[2] CD = pacienti s Crohnovou chorobou
[3] UC = pacienti s ulcerózní kolitidou

Klinické studie – IBD monitoring

Kalprotektin[1] vs. budoucí klinická remise nebo relaps	Studie 4 – UK (ref. 12)	Studie 5 – Španělsko (ref. 13)	Studie 6 – Španělsko (ref. 14)
Počet pacientů a demografie	92 (CD[2]) 38% muži	30 (CD[2]) Léčba adalimumabem Věk: 24-64 43,3% muži	33 (CD[2]) 20 (UC[3]) Léčba infliximabem Věk: 18-68 47,2% muži
Doba po stanovení kalprotektinu	12 měsíců	4 měsíce	12 měsíců
Pacienti v klinickém relapsu po follow up	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

[1] Stuiey 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
Studie 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL a Quantum Blue® fCAL high range
[2] CD = pacienti s Crohnovou chorobou
[3] UC = pacienti s ulcerózní kolitidou

TABULKY A GRAFY

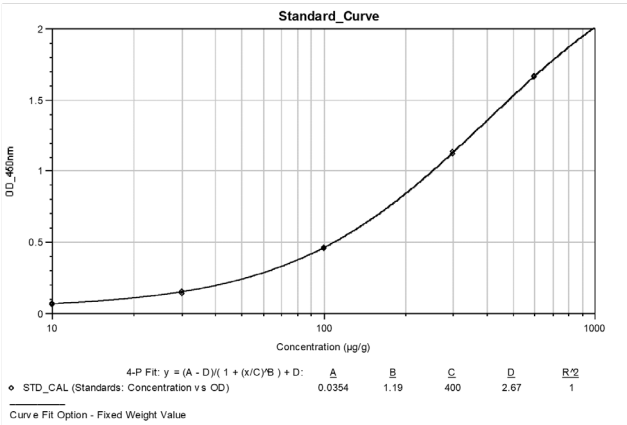
POSTUP S NIŽŠÍM ROZSAHEM 10-600 µg/g

Příklad výsledků

	Konc. [µg/g]	Absorb. [OD]	Výpočet konc. [µg/g]	CV konc. [%]
Blank průměr		**0,096**		
Kalibrátor A	10	0,073		
Kalibrátor A	10	0,066		
Kalibrátor A průměr	**10**	**0,069**		**7,2**
Kalibrátor B	30	0,143		
Kalibrátor B	30	0,153		
Kalibrátor B průměr	**30**	**0,148**		**4,8**
Kalibrátor C	100	0,465		
Kalibrátor C	100	0,456		
Kalibrátor C průměr.	**100**	**0,460**		**1,4**
Kalibrátor D	300	1,121		
Kalibrátor D	300	1,135		
Kalibrátor D průměr	**300**	**1,128**		**0,9**
Kalibrátor E	600	1,658		
Kalibrátor E	600	1,671		
Kalibrátor E průměr	**600**	**1,664**		**0,6**
Kontrola nízká		0,201	41	
Kontrola nízká		0,189	39	
Kontrola nízká průměr		**0,195**	**40**	**4,4**
Kontrola vysokáb		0,598	134	
Kontrola vysokáb		0,583	130	
Kontrola vysokáb průměr		**0,590**	**132**	**1,8**

Tabulka 12

Příklad standardní křivky



Obr 1

Mezilaboratorní přesnost

Vzorek č.	n	Průměr [µg/g]	Opakovatelnost		Mezidenní		Celková přesnost	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
#1957	44	13,2	1,0	8,0%	1,5	11,6%	1,8	14,0%
#1933	42	20,5	0,9	4,2%	1,6	7,7%	1,8	8,8%
#1934	44	19,7	1,2	6,0%	1,6	8,4%	2,0	10,3%
#1935	44	37,1	1,2	3,2%	2,1	5,8%	2,4	6,7%
#1936	44	35,4	0,9	2,7%	2,5	7,4%	2,7	7,8%
#1937	44	58,6	1,6	2,9%	3,6	6,4%	3,9	7,0%
#1938	44	83,9	2,6	3,1%	4,3	5,2%	5,0	6,0%
#1939	44	141,4	2,6	1,9%	7,1	5,2%	7,5	5,5%
#1956	44	294,1	14,0	4,8%	18,0	6,2%	22,8	7,8%
#1940	44	501,4	27,7	5,7%	20,9	4,3%	34,7	7,1%

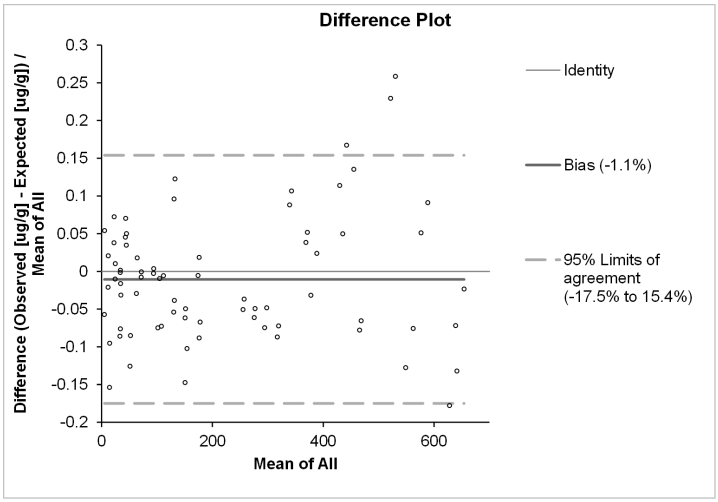
Tabulka 13

Linearita

ID	Testovaný rozsah měření	R^2	p-hodnota pro nelineární koeficient	Lineární rozsah
S1	2,3 – 740,0	0,972	p >0,05	3,1 – 602,8
S2	5,1 – 999,5	0,988	p <0,05	5,1 – 654,0
S3	1,3 – 690,2	0,994	p <0,05	3,9 – 690,2
S4	9,6 – 827	0,940	p <0,05	9,6 – 658,7

Tabulka 14

Spiking obnovitelnost



Obr 2

TABULKY A GRAFY

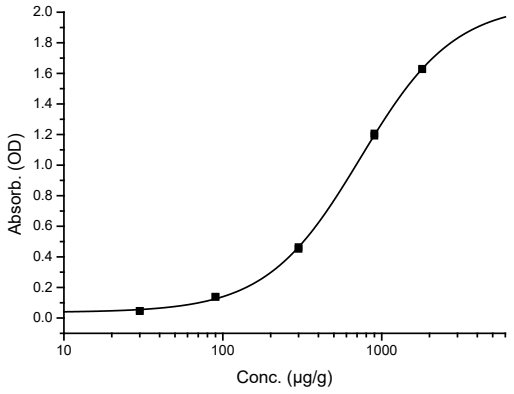
Postup s rozšířeným rozsahem 30-1800 µg/g

Příkald výsledků

	Koncentrace [µg/g]	Absorbce [OD]
Kalibrátor A	30 30	0,047 0,046
Kalibrátor B	90 90	0,138 0,140
Kalibrátor C	300 300	0,464 0,452
KalibrátorD	900 900	1,207 1,192
Kalibrátor E	1800 1800	1,627 1,630
Blank průměr		0,057
Kontrola nízká		0,147 0,162
Kontrola vysokáb		0,618 0,618

Tabulka 15

Příklad standardní křivky



Obr 3

Mezilaboratorní přesnost

ID	Průmer [µg/g]	n	Opakovatel-nost		Mezi běhy		Mezi dny		V rámci laboratoře	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
P1	38,5	80	2,3	5,8%	1,8	4,8%	2,2	5,6%	3,6	9,4%
P2	67,0	80	2,0	3,0%	3,5	5,2%	1,6	2,4%	4,3	6,4%
P3	135,7	80	2,3	1,7%	5,6	4,1%	0,0	0,0%	6,0	4,4%
P4	207,1	80	4,1	2,0%	12,5	6,0%	0,0	0,0%	13,2	6,4%
P5	337,1	80	5,9	1,8%	18,3	5,4%	0,0	0,0%	19,3	5,7%
P6	562,6	80	11,0	2,0%	13,6	2,4%	2,5	0,4%	17,7	3,1%
P7	918,0	80	18,6	2,0%	62,1	6,8%	20,8	2,3%	68,1	7,4%

Tabulka 16

Přesnost mezi šaržemí

ID	Prů-mer [µg/g]	n	V rámci cyklu		Mezi dny		Mezi šaržemi		Celkem	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
2	46,4	74	2,5	5,5%	0,5	1,1%	2,4	5,3%	4,5	9,7%
3	105,5	75	2,5	2,4%	1,4	1,4%	2,1	2,0%	4,5	4,2%
4	133,6	75	5,0	3,8%	1,9	1,4%	4,2	3,2%	7,2	5,4%
5	178,5	75	6,3	3,5%	0,0	0,0%	6,3	3,5%	9,2	5,2%
6	435,2	75	12,4	2,9%	7,5	1,7%	18,1	4,2%	23,2	5,3%
7	1476,1	75	48,4	3,3%	88,6	6,0%	31,4	2,1%	110,6	7,5%

Tabulka 17

Reprodukovatelnost – studie hodnocení přesnosti na vice místech

ID	Průmer [µg/g]	n	Mezi operátory		Mezi pracovišti		Celk. (Repro-dukovatelnost)	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	42,1	236	0,0	0,0%	4,4	10,4%	8,0	19,0%
S02	67,4	238	1,7	2,6%	3,9	5,7%	8,6	12,7%
S03	142,3	238	2,4	1,7%	4,0	2,8%	16,8	11,8%
S04	379,8	240	0,0	0,0%	13,7	3,6%	24,2	6,4%
S05	1053,3	238	39,5	3,8%	64,4	6,1%	97,3	9,2%

Tabulka 18

Linearita

ID	Rozsah měření [µg/g]	R^2	p-hodnota pro nelineární koeficient	Lineární rozsah [µg/g]
FRB	22,8 – 1932,0	0,998	p < 0,05	24,6 – 1932,0
FRC	26,2 – 2096,2	0,997	p < 0,05	26,2 – 2096,2

Tabulka 19

Přesnost / Výtěžnost

ID	Průměrná základní hodnota [µg/g]	Očekávaná základní hodnota + spike [µg/g]	Pozorovaná základní hodnota + nárůst [µg/g]	Výtěžnost [%]
#1	46,5	226,5	224,5	99,1%
#2	63,7	243,7	247,7	101,6%
#3	89,0	269,0	274,9	102,2%
#4	111,6	291,6	292,0	100,1%
#5	163,5	343,5	331,1	96,4%
#6	304,0	484,0	475,0	98,1%
#7	990,2	1170,2	1166,6	99,7%

Tabulka 20

TABULKY A GRAFY

VÝKONNOSTNÍ PARAMETRY PŘED ANALÝZOU

Reprodukovatelnost extrakce – ruční vážení

ID	Průměr [µg/g]	n	V rámci extrakce		Mezi extrakcemi		Celková přesnost	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	51,2	20	4,5	8,9%	7,8	15,2%	9,0	17,6%
S03	88,3	20	6,6	7,5%	13,3	15,0%	14,8	16,8%
S05	66,8	20	10,6	15,8%	3,7	5,5%	11,2	16,7%
S06	179,3	20	16,8	9,4%	32,8	18,3%	36,8	20,5%
S07	366,1	20	22,4	6,1%	32,3	8,8%	39,3	10,7%
S08	327,4	20	15,4	4,7%	26,9	8,2%	31,0	9,5%
S09	1783,7	20	198,3	11,1%	262,0	14,7%	328,6	18,4%

Tabulka 21

Reprodukovatelnost extrakce – CALEX® Cap

ID	Průměr [µg/g]	V rámci extrakce		Mezi extrakcemi		Mezi šaržemi		Celková přesnost	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	42,5	1,6	3,9%	5,2	12,1%	0,0	0,0%	5,4	12,7%
B	126,5	3,2	2,5%	9,6	7,6%	9,3	7,4%	13,8	10,9%
C	207,4	5,1	2,4%	34,8	16,8%	0,0	0,0%	35,1	16,9%
D	515,5	13,9	2,7%	38,2	7,4%	0,0	0,0%	40,7	7,9%
E	2949,9	93,0	3,2%	214,6	7,3%	47,0	1,6%	238,6	8,1%

Tabulka 21

Metoda srovnání – CALEX® Cap extrakce a manuální extrakce

Bland-Altman Analýza		
Prům.odchylka (95%)	**Nižší LoA (95% CI)**	**Vyšší LoA (95% CI)**
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabulka 23

Regrasní analýza Passing-Bablok				
Směrnice (95% CI)	**Posunutí (µg/g) (95% CI)**	**Zkreslení při 80 µg/g (95% CI)**	**Zkreslení při 160 µg/g (95% CI)**	**r**
1,181 (1,120, 1,235)	-9,7 (-16,0, -2,4)	5,9% (1,4%, 12,2%)	12,0% (7,8%,16,9%)	0,948

Tabulka 24

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Perorální léčiva, doplňky stravy a hemoglobin

Název	Aktivní složka	Koncentrace mg/50 mg stolice
gyno-Tardyferon	Iron (II) sulfate (contains 0.35 mg folic acid)	0,11
Prednisone	Prednisone	0,31
Imurek	Azathioprine	0,19
Salofalk	Mesalamine; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazole	0,18
Asacol	Mesalamine; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomycin	2,00
Sulfamethoxazole	Sulfamethoxazole	1,60
Trimethoprim	Trimethoprim lactate	0,35
Ciproxine	Ciprofloxacin	1,25
Vitamin E	DL-α-Tocopherol Acetate	0,30
Bion 3	3 probioticka (107 CFU): *lactobacillus gasseri* PA16 / 8, *bifidobacterium bifidum* MF 20/5, *bifidobacterium longum* SP07 / 3, 12 vitamins: A (800 µg), B1 (1,4 mg), B2 (1,6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 µg), C (60 mg), D (5 µg), E (10 mg), Biotin (150 µg), folic acid (200 µg), niacin (18 mg), pantothenic acid (6 mg) and 7 minerals: iodine (100 µg), iron (5 mg), zinc (5 mg), selenium (30 µg), chromium (25 µg), manganese (1,2 mg), molybdenum (25 µg)	1,06
Hemoglobin	Hemoglobin	1,25

Tabulka 25

Enteropathologicaké mikroorganismy

Název	Konečná koncentrace (CFU/mL extract stolice)
Escherichia coli	$9,5 \times 10^7$
Salmonella enterica subsp. enterica	1×10^9
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia	$5,4 \times 10^7$
Citrobacter freundii	$9,7 \times 10^7$
Shigella flexneri	$1,5 \times 10^8$
Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica	$1,6 \times 10^8$

Tabulka 26

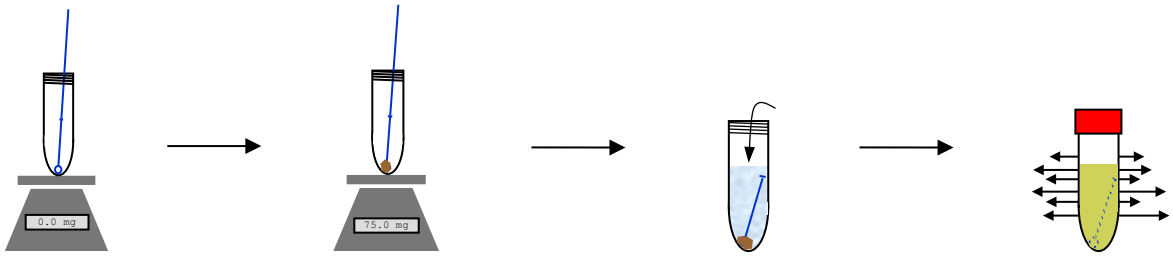
LITERATURA

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease.* Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces*.: Tidsskr Nor Legeforen 128, 743–5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study.* BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care.* Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity.* Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease.* J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery.* Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreiro-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab.* Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreiro-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy.* J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis in Clinical and Endoscopic Remission.* Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasson A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study.* United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease.* Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target.* Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents in Inflammatory Bowel Disease Patients in Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy.* Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months.* PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years.* PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

KRÁTKÝ POSTUP

Extrakce kalprotektinu

Manuální extrakční postup

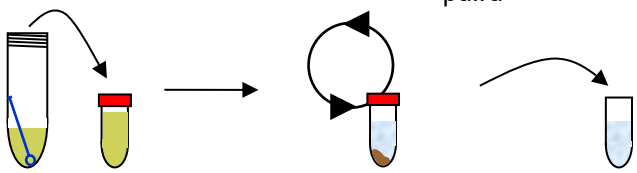


Předvážená prázdná zkumavka + očkovací klička

Váha 50 až 100 mg stolice

Přidejte 49 dílů B-CAL-EX extrakčního pufru

Zavřete zkumavku
Vortexujte 30 sekund
Inkubujte 25±5 min v shakeru při 400 rpm
Vortexujte 30 sec



Přeneste ~1,0 mL do nové zkumavky

Odstřeďujte 5 minut při 3‘000 x g

Přeneste supernatant do nové zkumavky a pokračujte metodou ELISA

KRÁTKÝ POSTUP

CALPROTECTIN ELISA

Potažená mikrotitrační destička

promyjte 2x ≥300 µL mycím pufrem

100 µL inkubační pufr, kalibrátory, kontroly nebo ředěné vzorky

inkubujte 30 (+ 5) minut
při 18-28 °C na rotátoru destičky ~450 rpm

promyjte 3x ≥300 µL mycím pufrem

přidat 100 µL enzymového markru

inkubujte 30 +/-5 minut
při 18-28 °C na rotátoru destičky ~450 rpm

*promyjte **5x** ≥300 µL mycím pufrem*

přidat 100 µL TMB substrátu

inkubujte 15 +/-2 minut
při 18-28 °C na rotátoru destičky ~450 rpm

přidat 100 µL zastavovacího roztoku

Čtěte absorbci při 450 nm (během 30 minut)

ČAS DO VÝSLEDKU 75 minut

SEZNAM ZMĚN

Datum	Verze	Změna
2022-11-16	A4	Aktualizace kapitoly *upozornění a bezpečnostní opatření* Uvedení nepřesnosti kalibrátoru a zdůvodnění interní standardizace v kapitole *Standardizace* Aktualizace znění a zjednodušení kapitoly *Výkonné charakteristiky* Revize kapitoly S*ymboly* Nové patentové informace Zahrnutí čísla oznámení do označení CE- postup posuzování shody podle nařízení 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. Kromě toho se používají následující symboly a značky:

Symboly	**Vysvětlení**
MP	Mikrotitrační destička
BUF EX	Extrakční pufr
BUF WASH 10X	Koncentrát promývacího pufru (10x)
BUF INC	Inkubační pufr
CAL A - CAL E	Kalibrátor A -E
CONTROL L	Nízká kontrola
CONTROL H	Vysoká kontrola
EL	Enzymový marker
SUBS TMB	TMB substrát
SOLN STOP	Zastavovací roztok

Součásti soupravy jsou patentově chráněny u EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

CE 0123