BÜHLMANN fCAL® ELISA

Καλπροτεκτίνη ELISA

Για *In Vitro* Διαγνωστική Χρήση

EK-CAL	96 τεστ
EK-CAL2	192 τεστ

Ημερομηνία κυκλοφορίας: 2022-11-16
Έκδοση A3

Κατασκευαστής
BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Ελβετία
Τηλέφωνο.: +41 61 487 12 12
Φαξ: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το BÜHLMANN fCAL® ELISA είναι ένα *in vitro* διαγνωστικό τεστ για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καλπροτεκτίνης σε δείγματα ανθρώπινων κοπράνων που προορίζεται ως βοήθημα για την αξιολόγηση της φλεγμονής του εντερικού βλεννογόνου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βοήθημα στη διάγνωση και στη διάκριση της οργανικής, της φλεγμονώδους νόσου του γαστρεντερικού σωλήνα (φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, IBD, ειδικά στη νόσο του Crohn ή στην ελκώδη κολίτιδα, UC) από τη λειτουργική νόσο (σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, IBS) (αναφ. 1-7), σε ασθενείς με χρόνιο κοιλιακό άλγος και ως βοήθημα στην παρακολούθηση της νόσου IBD (αναφ. 7-18).

Μόνο για εργαστηριακή χρήση.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το BÜHLMANN fCAL® ELISA επιτρέπει την επιλεκτική μέτρηση καλπροτεκτίνης σε εκχυλίσματα κοπράνων με sandwich ELISA. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης του BÜHLMANN fCAL® ELISA είναι επκαλυμμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (mAb) εξαιρετικά ειδικό για τα ετεροδιμερή και πολυμερικά σύμπλοκα της καλπροτεκτίνης. Εκχυλίσματα δειγμάτων κοπράνων ασθενών, μάρτυρες για τον προσδιορισμό της αποδοχής της εκτέλεσης ELISA και βαθμονομητές φορτώνονται στα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και τα βήματα πλύσης, ένα αντίσωμα ανίχνευσης (Ab) συνδεδεμένο με horseradish peroxidase (HRP) ανιχνεύει τα μόρια καλπροτεκτίνης που είναι συνδεδεμένα στο αντίσωμα σύλληψης στην πλάκα. Μετά την επώαση και τα περαιτέρω βήματα πλύσης, το χρωμογόνο HRP υπόστρωμα, tetramethylbenzidine (TMB) προστίθεται (σχηματισμός μπλε χρώματος) που ακολουθείται από αντίδραση τερματισμού (αλλαγή σε κίτρινο χρώμα). Η απορρόφηση μετράται στα 450 nm. Η τελική συγκέντρωση καλπροτεκτίνης κοπράνων σε μg/g σε δείγματα ασθενών προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης που παράγεται από τις μετρούμενες τιμές βαθμονομητή.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα		Κωδικός	Ανασύσταση
	EK-CAL	EK-CAL2		
Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης	3 μπουκάλια x 125 mL	6 μπουκάλια x 125 mL	B-CAL-EX	Έτοιμο για χρήση
Πλάκα μικροτιτλοδότησης Προ-επικαλυμμένη με anti-calprotectin mAb	12 x 8 λωρίδες πηγαδιών με πλαίσιο	2 x 12 x 8 λωρίδες πηγαδιών με πλαίσιο	B-CAL-MP	Έτοιμο για χρήση
Επικάλυμμα πλάκας	3 κομμάτια	6 κομμάτια	-	Έτοιμο για χρήση
Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10x) με συντηρητικά	1 μπουκάλι x 100 mL	2 μπουκάλια x 100 mL	B-CAL-WB	Διαλύστε το κάθε ένα με 900 mL απιονισμένο H_2O
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης με συντηρητικά	2 μπουκάλια x 125 mL	3 μπουκάλια x 125 mL	B-CAL-IB	Έτοιμο για χρήση
Βαθμονομητές A έως E[1) 2)] Καλπροτεκτίνη που προέρχεται από ορό σε ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικά	5 φιαλίδια x 1 mL	5 φιαλίδια x 1 mL	B-CAL-CASET	Έτοιμο για χρήση
Μάρτυρας Χαμηλό / Υψηλό[3)] Καλπροτεκτίνη που προέρχεται από ορό σε ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικά	2 φιαλίδια x 1 mL	2 φιαλίδια x 1 mL	B-CAL-CONSET	Έτοιμο για χρήση
Ετικέτα Ενζύμου Anti-calprotectin Ab συζευγμένο με HRP	1 φιαλίδιο x 12 mL	2 φιαλίδια x 12 mL	B-CAL-EL	Έτοιμο για χρήση
TMB Υπόστρωμα TMB σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού άλατος	1 φιαλίδιο x 12 mL	2 φιαλίδια x 12 mL	B-TMB12	Έτοιμο για χρήση
Διάλυμα Τερματισμού 0.25 M θειικού οξέος	1 φιαλίδιο x 12 mL	2 φιαλίδια x 12 mL	B-STS12	Έτοιμο για χρήση **Διαβρωτικός παράγοντας**

Πίνακας 1

[1)] Η πραγματική συγκέντρωση καλπροτεκτίνης των βαθμονομητών A έως E είναι 4, 12, 40, 120 και 240 ng/mL, αντίστοιχα. Για τη διαδικασία ELISA χαμηλότερου εύρους, οι τιμές του βαθμονομητή πρέπει να οριστούν ως: 10, 30, 100, 300 και 600 μg/g καλπροτεκτίνης. Αυτή η ανάθεση αντιστοιχεί στην τελική αραίωση δείγματος 1:2500 στη διαδικασία ELISA χαμηλότερου εύρους.

[2)] Αν επιλέξετε τη διαδικασία ELISA διευρυμένου εύρους, οι ονομαστικές τιμές βαθμονομητή πρέπει να οριστούν ως: 30, 90, 300, 900 και 1800 μg/g καλπροτεκτίνης. Αυτή η ανάθεση αντιστοιχεί στην τελική αραίωση δείγματος 1:7500 στη διαδικασία ELISA διευρυμένου εύρους.

[3)] Οι μάρτυρες περιέχουν συγκεκριμένες ποσότητες ανθρώπινης καλπροτεκτίνης. Ανατρέξτε στο πρόσθετο QC φύλλο δεδομένων για τις πραγματικές συγκεντρώσεις.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μη ανοιγμένα αντιδραστήρια	
Φυλάσσονται στους 2-8 °C. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.	
Ανοιγμένα / ανασυσταμένα αντιδραστήρια	
Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης	Αποθηκεύστε μέχρι 6 μήνες στους 2-8 °C.
Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Επιστρέψτε τις αχρησιμοποίητες λωρίδες αμέσως στη θήκη από αλουμινόχαρτο που περιέχει τις συσκευασίες αποξηραντικού και κλείστε ξανά σε όλη την άκρη του επικαλύμματος. Αποθηκεύστε μέχρι 6 μήνες στους 2-8 °C.
Αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	Αποθηκεύστε μέχρι 6 μήνες στους 2-8 °C.
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	
Βαθμονομητές	
Μάρτυρες	
Ετικέτα ενζύμου	
TMB Υπόστρωμα	
Διάλυμα Τερματισμού	

Πίνακας 2

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ

Συσκευές εκχύλισης κοπράνων

Οι συσκευές εκχύλισης κοπράνων που περιγράφονται στον πίνακα 3 δεν παραδίδονται με το κιτ. Οι επιλεγμένες συσκευές εκχύλισης πρέπει να παραγγελθούν ξεχωριστά.

Συσκευές εκχύλισης Κιτ	Ποσότητα	Κωδικός
CALEX® Cap	Πακέτα των 50, 200 ή 500 σωληνάριων διαθέσιμα, καθένα γεμισμένο με 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης Έτοιμο για χρήση	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 σωληνάρια, σπάτουλες και καπάκια βάσης	B-CAL-RD

Πίνακας 3

ΥΛΙΚΑ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Διαδικασία εκχύλισης

- 100 μL και 1000 μL πιπέτες ακριβείας με ρύγχη μιας χρήσης
- Μιας χρήσης σωληνάρια πολυστυρενίου ή πολυπροπυλενίου για μεταφορά των εκχυλισμάτων (προαιρετικά)
- Σταθμός εργασίας στρωτής ροής
- Μίκτης vortex πολλαπλών σωληνάριων / Μίκτης vortex
- Μικρο φυγόκεντρος (≥3000 x g)
- Φυγόκεντρος (≥500 x g)
- Συσκευές εκχύλισης (βλέπετε πίνακα 3 πάνω) ή για τη χειροκίνητη διαδικασία εκχύλισης:
  - 10 μL θηλιές εμβολιασμού μιας χρήσης
  - απαιτούνται 15 mL σωληνάρια πολυπροπυλενίου με βιδωτά καπάκια
  - Ζυγαριά ακριβείας (10-200 mg)

Διαδικασία ELISA

- 10 μL, 100 μL και 1000 μL πιπέτες ακριβείας με ρύγχη μιας χρήσης
- Σωληνάρια πολυστυρενίου ή πολυπροπυλενίου μιας χρήσης για την προετοιμασία των αραιώσεων των δειγμάτων
- Κύλινδρος 1000 mL για την αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης
- Πλυστικό πλακών μικροτιτλοδότησης (βλέπετε τεχνικές προφυλάξεις) ή συμπιεζόμενο μπουκάλι για το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
- Αναδευτήρας πλάκας μικροτιτλοδότησης (βλέπετε τεχνικές προφυλάξεις)
- Στυπόχαρτο
- Σύστημα ανάγνωσης μικροπλακών για τη μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Μέτρα ασφαλείας

- Οι βαθμονομητές και οι μάρτυρες αυτού του τεστ περιέχουν συστατικά ανθρώπινης προέλευσης. Αν και δοκιμασμένα και βρέθηκαν αρνητικά για HBV αντιγόνο επιφάνειας, HCV και HIV1/2 αντισώματα, ο χειρισμός των αντιδραστηρίων θα πρέπει να γίνεται σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν μολύνσεις και θα πρέπει να χειρίζονται σύμφωνα με τις Ορθές Εργαστηριακές Πρακτικές (GLP) και χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις.
- Αυτό το κιτ περιέχει συστατικά που ταξινομούνται σύμφωνα με τον Κανονισμό (EC) αριθ. 1272/2008:

  2-methyl-4-isothiazolin-3-one hydrochloride (συγκ. ≥ 0,0015%), συνεπώς τα αντιδραστήρια μπορεί να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση στο δέρμα (H317).

  Sulfuric acid (συγκ. ≥2,5 - <5%), συνεπώς τα αντιδραστήρια μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό στο δέρμα (H315) και σοβαρό ερεθισμό στο μάτι (H319.)
- Αποφεύγετε την επαφή με τα αντιδραστήρια στο δέρμα, τα μάτια ή με βλεννώδεις μεμβράνες. Αν συμβεί επαφή, πλύνετε αμέσως με μεγάλη ποσότητα νερού, αλλιώς μπορεί να συμβεί ερεθισμός.
- Τα αντιδραστήρια και τα χημικά πρέπει να αντιμετωπίζονται ως επικίνδυνα απόβλητα σύμφωνα με τις εθνικές οδηγίες βιολογικών κινδύνων ή κανονισμούς.

Τεχνικές προφυλάξεις

Συστατικά κιτ

- Η διαδικασία παραγωγής έχει σαν αποτέλεσμα υπολείμματα στα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Αφαιρούνται από το βήμα πλυσίματος (βήμα 3 της διαδικασίας ανάλυσης) και δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα.
- Τα συστατικά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στις ετικέτες.
- Μην αναμιγνύετε ή χρησιμοποιείται συστατικά από κιτ με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας.
- Κάθε προσπάθεια θα πρέπει να γίνεται για να βεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ αντιδραστηρίων, δειγμάτων ή πηγαδιών.

- Επιτρέψτε στα αντιδραστήρια να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινήστε (με vortex) τα αντιδραστήρια καλά πριν τη χρήση.
- Τα μικροπηγάδια δεν μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.

Χειροκίνητη διαδικασία εκχύλισης

- Για να επιτευχθούν ποσοτικά αποτελέσματα, είναι σημαντικό να ομογενοποιηθεί πλήρως το προστιθέμενο δείγμα κοπράνων στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Επιμολύνσεις στο επάνω μέρος του σωληνάριου εξαγωγής θα πρέπει να αποφεύγονται. Μπορεί να υπάρχει μικρή ποσότητα αδιάλυτων σωματιδίων μετά την ανάμιξη.

Διαδικασία ELISA

- Στη διαδικασία ELISA <u>τα βήματα καθαρισμού είναι απαραίτητα</u> για να είναι εγγυημένα αναπαραγώγιμα τα αποτελέσματα. Επιτρέψτε στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης να επωαστεί στα πηγάδια για <u>τουλάχιστον 20 δευτερόλεπτα</u> πριν το αφαιρέσετε.
- Εάν χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένη πλύση, συνιστάται ανεπιφύλακτα η «λειτουργία πλάκας», δηλαδή κάθε βήμα της διαδικασίας (διανομή / αναρρόφηση) να πραγματοποιείται σε όλες τις ταινίες, διαδοχικά, πριν το όργανο συνεχίσει με τον επόμενο κύκλο πλύσης. Έτσι, ο ελάχιστος χρόνος επώασης είναι εγγυημένος.
- Ο ενδεικνυόμενος αριθμός <u>κύκλων πλύσης είναι υποχρεωτικός</u> για τη διασφάλιση αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων.
- Ο αναδευτήρας πλάκας πρέπει να ρυθμιστεί στα περίπου 450 rpm (7,5 Hz). Υψηλότερη συχνότητα περιστροφής μπορεί να προκαλέσει κακή γραμμικότητα αραίωσης σε τιμές μεταξύ 300/900 και 600/1800 μg/g. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια περιστροφική κίνηση αντί της οριζόντιας κίνησης.
- Για να διασφαλιστεί ότι η αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος έχει ολοκληρωθεί, <u>ο χρόνος επώασης στο βήμα 5</u> πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 λεπτά. Ο λίγο μεγαλύτερος χρόνος επώασης (έως 5 λεπτά) δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.
- Η ετικέτα ενζύμου απενεργοποιείται από το οξυγόνο και είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο αζίδιο του νατρίου, τη θιμεροσάλη, το υποχλωριώδες οξύ και τους αρωματικούς χλωροϋδρογονάνθρακες που συχνά βρίσκονται σε προμήθειες νερού των εργαστηρίων. Συνεπώς, πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο απιονισμένο νερό υψηλής ποιότητας.
- Πρέπει να δημιουργείται μια νέα standard καμπύλη κάθε φορά που εκτελείται η ανάλυση (κάθε πλάκα ή μερική πλάκα).
- Εάν η αρχική συγκέντρωση ενός άγνωστου δείγματος είναι πάνω από τη συγκέντρωση του υψηλότερου βαθμονομητή, βαθμονομητή Ε, το δείγμα μπορεί να αραιωθεί περαιτέρω με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης και να αναλυθεί ξανά σύμφωνα με τη διαδικασία της ανάλυσης. Ο συντελεστής ολικής αραίωσης που προκύπτει πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Για τη διαδικασία εκχύλισης, απαιτείται λιγότερο από 1 g δείγματος κοπράνων. Συλλέξτε το δείγμα κοπράνων σε απλά σωληνάρια.

<u>Σημαντικό:</u> Το δείγμα πρέπει να συλλεχθεί χωρίς οποιαδήποτε χημικά ή βιολογικά πρόσθετα.

Μεταφορά δείγματος

Τα δείγματα κοπράνων πρέπει να παραληφθούν για επεξεργασία από το εργαστήριο εντός 3 ημερών από τη συλλογή. Τα δείγματα μπορούν να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου ή σε ψυγείο.

Αποθήκευση δείγματος

Τα δείγματα κοπράνων πρέπει να ψύχονται στους 2-8 °C και να εκχυλίζονται εντός 3 ημερών από την παραλαβή τους στο εργαστήριο. Μην αποθηκεύετε τα δείγματα σε υψηλές θερμοκρασίες.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

<u>1. CALEX® Cap</u>

1.1 Διαδικασία εκχύλισης

Ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται μαζί με την CALEX® Cap συσκευή (Κωδικός B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

<u>CALEX® Cap συσκευή:</u> Υγρά δείγματα κοπράνων μπορούν να πιπεταριστούν άμεσα στη CALEX® Cap συσκευή. Ξεβιδώστε το μπλε καπάκι και πιπεταρίστε 10 μL του δείγματος κοπράνων στη συσκευή. Ξανακλείστε την CALEX® Cap συσκευή και συνεχίστε με το βήμα vortex σύμφωνα με τη διαδικασία εκχύλισης που περιγράφεται και απεικονίζεται στις οδηγίες χρήσης που παρέχονται με την CALEX® Cap συσκευή.

<u>Σημαντικό:</u> Μετά την εκχύλιση, φυγοκεντρήστε την CALEX® Cap συσκευή για 5 λεπτά στα 500-3000 x g και συνεχίστε με τη διαδικασία ανάλυσης.

1.2 Αποθήκευση εκχυλίσματος

Εκχυλίσματα καλπροτεκτίνης κοπράνων που λήφθηκαν με την CALEX® Cap συσκευή είναι σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου (23 °C) για 7 μέρες και στους 2-8 °C για έως 15 μέρες. Για μεγαλύτερη αποθήκευση, καταψύξτε τα εκχυλίσματα στους -20 °C. Τα κατεψυγμένα εκχυλίσματα είναι σταθερά για περίοδο έως και 23 μήνες.
Τα CALEX® Cap εκχυλίσματα μπορούν να καταψυχθούν άμεσα και να αποθηκευτούν μέσα στην CALEX® Cap συσκευή. Τα εκχυλίσματα μπορούν να υποβληθούν σε τέσσερις κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Πριν από τη μέτρηση, αφήστε τα κατεψυγμένα εκχυλίσματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου, αναδεύστε καλά σε vortex για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά στα 500-3000 x g.

<u>2. Άλλες συσκευές εκχύλισης</u>

2.1 Διαδικασίες εκχύλισης

Ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσεις που συνοδεύονται με την αντίστοιχη συσκευή εκχύλισης:

- Συσκευή εκχύλισης κοπράνων Roche (Κωδικός 10745804322) ή BÜHLMANN Smart-Prep (Κωδικός: B-CAL-RD).

<u>Σημαντικό:</u> Μετά την εκχύλιση με το BÜHLMANN Smart Prep φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια για 5 λεπτά στα 3000 x g. Εναλλακτικά, μεταφέρετε το ομογενοποιημένο σε ένα Eppendorf σωληνάριο των 2 mL και φυγοκεντρήστε το σε μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά στα 3000 x g. Μεταγγίστε το υπερκείμενο σε ένα νέο, επισημασμένο σωληνάριο και συνεχίστε με τη διαδικασία της ανάλυσης.

2.2 Αποθήκευση εκχυλίσματος

Τα εκχυλίσματα κοπράνων καλπροτεκτίνης που λήφθηκαν με το Smart-Prep είναι σταθερά στους 2-8 °C για ≤7 μέρες ή στους -20 °C για 36 μήνες.

3. Χειροκίνητη εκχύλιση

3.1 Διαδικασία εκχύλισης

1. Τοποθετήστε ετικέτα και ζυγίστε το άδειο σωληνάριο πολυπροπυλενίου συμπεριλαμβανομένου του βρόχου εμβολιασμού. Σημειώστε το βάρος (απόβαρο).
2. Αφαιρέστε 50 έως 100 mg δείγματος κοπράνων με τη βοήθεια του βρόχου εμβολιασμού και τοποθετήστε το στον προζυγισμένο σωλήνα και ζυγίστε το ξανά (μεικτό βάρος). Αποφύγετε τη λήψη διαιτητικών ινών που υπάρχουν στο δείγμα κατά τη διαδικασία δειγματοληψίας.
3. Υπολογίστε την καθαρή ποσότητα δείγματος, αφαιρώντας το απόβαρο από το μεικτό βάρος, σπάστε τον βρόχο εμβολιασμού και αφήστε το κάτω μέρος του βρόχου μέσα στο σωλήνα.
4. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης σύμφωνα με τη συνάρτηση
   x mg κοπράνων x 49 = y μL ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (π.χ. 50 mg κόπρανα + 2450 μL ρυθμιστικού διαλύματος) στο σωληνάριο και κλείστε το σωληνάριο.
5. Εκχυλίστε τα δείγματα μέσω
   - Αναδεύστε έντονα στο vortex το σωληνάριο εκχύλισης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και το δείγμα κοπράνων σε έναν (πολλαπλών σωληναρίων) vortexer (στη μέγιστη ταχύτητα) για 30 δευτερόλεπτα.
   - Στη συνέχεια, επωάστε το σωληνάριο εκχύλισης για 25 +/-5 λεπτά σε αναδευτήρα πλακών στα ca. 400 rpm. Ο βρόχος εμβολιασμού μέσα στο σωλήνα χρησιμεύει για την ενίσχυση της ανάδευσης.
   - Αναδεύστε έντονα στο vortex το σωληνάριο εκχύλισης ξανά, για 30 δευτερόλεπτα.
6. Μεταφέρετε 1,5 mL του ομογενοποιημένου σε ένα Eppendorf σωληνάριο των 2 mL και φυγοκεντρήστε σε μια μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά στα 3000 x g.
7. Μεταγγίστε το υπερκείμενο σε ένα νέο επισημασμένο σωληνάριο και συνεχίστε με τη διαδικασία ανάλυσης ή αποθηκεύστε τα εκχυλίσματα (ανατρέξτε στην αποθήκευση εκχυλίσματος).

3.2 Αποθήκευση εκχυλίσματος

Εκχυλίσματα καλπροτεκτίνης κοπράνων που λήφθηκαν με χειροκίνητη εκχύλιση, μπορούν να αποθηκευτούν στους 2-8 °C για ≤7 μέρες ή στους -20 °C για 36 μήνες.

ΕΥΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση μπορεί να εκτελεστεί σύμφωνα με τις ακόλουθες διαδικασίες: χαμηλότερου ή διευρυμένου εύρους ELISA διαδικασίας. Η κατάλληλη διαδικασία θα πρέπει να επιλεγεί ανάλογα με την προβλεπόμενη συγκέντρωση καλπροτεκτίνης:

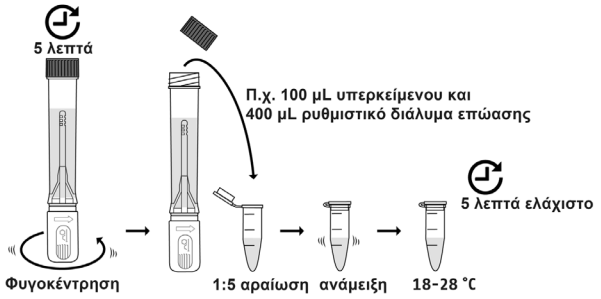
- Για δείγματα έως 600 μg/g καλπροτεκτίνης επιλέξτε τη χαμηλότερου εύρους διαδικασία (εύρος εργασίας 10-600 μg/g).
- Αν τα δείγματα τείνουν να ξεπερνούν τα 600 μg/g επιλέξτε τη διευρυμένου εύρους διαδικασία (εύρος εργασίας 30-1800 μg/g).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Σημαντικό: Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να εξισορροπήσουν για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 18-28 °C πριν τη χρήση. Αραιώστε μόνο τα εκχυλίσματα κοπράνων. Οι βαθμονομητές και οι μάρτυρες είναι έτοιμοι προς χρήση.

1. Αραίωση δείγματος επιλογή 1: Εύρος εργασίας 10-600 μg/g

1.1. CALEX® Cap συσκευή: Αραιώστε τα εκχυλίσματα κοπράνων 1:5 με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (π.χ. 100 μL εκχύλισμα με 400 μL ρυθμιστικό διάλυμα επώασης) και ανακινήστε καλά. Αφήστε τα δείγματα να εξισορροπήσουν για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 18-28 °C πριν προχωρήσετε στο βήμα 4γ.

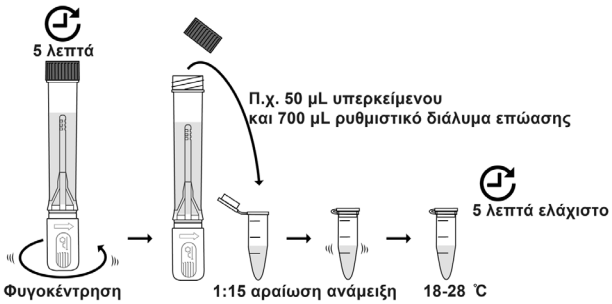


1.2 Χειροκίνητη εκχύλιση ή Smart-Prep: Αραιώστε τα εκχυλίσματα κοπράνων 1:50 με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (π.χ. 20 μL εκχυλίσματος και 980 μL ρυθμιστικό διάλυμα επώασης) και αναμείξτε καλά. Αφήστε τα δείγματα να εξισορροπήσουν για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 18-28 °C πριν προχωρήσετε στο βήμα 4γ.

1.` Αραίωση δείγματος επιλογή 2: Εύρος εργασίας 30-1800 μg/g

Το εύρος εργασίας μπορεί να επεκταθεί με ένα παράγοντα 3, αν τα δείγματα αραιωθούν 1:7500 αντί για 1:2500. Αυτή η διαδικασία προτείνεται, αν αναμένονται υψηλές συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης.

1.1` CALEX® Cap συσκευή: Αραιώστε τα εκχυλίσματα κοπράνων 1:15 με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (π.χ. 50 μL εκχύλισμα και 700 μL ρυθμιστικό διάλυμα επώασης) και αναμείξτε καλά. Αφήστε τα δείγματα να εξισορροπήσουν για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 18-28 °C πριν προχωρήσετε στο βήμα 4γ.



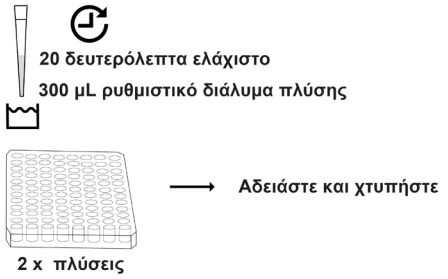
1.2` Χειροκίνητη εκχύλιση ή Smart-Prep: Αραιώστε τα εκχυλίσματα κοπράνων 1:150 με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (π.χ. 20 μL εκχύλισμα και 2980 μL ρυθμιστικό διάλυμα επώασης) και αναμείξτε καλά. Αφήστε τα δείγματα να εξισορροπήσουν για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 18-28 °C πριν προχωρήσετε στο βήμα 4γ.

2. Προετοιμάστε ένα πλαίσιο πλακών με επαρκείς λωρίδες για να ελέγξετε τον απαιτούμενο αριθμό βαθμονομητών, μαρτύρων και αραιωμένων δειγμάτων. Αφαιρέστε τις περίσσιες λωρίδες από το πλαίσιο και κλείστε τις ξανά στη θήκη από αλουμινόχαρτο μαζί με

τις συσκευασίες ξηραντικού χωρίς καθυστέρηση. Αποθηκεύστε σε ψυγείο.

3. Πλύντε τα επικαλυμμένα πηγάδια δύο φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά πηγάδι. Αδειάστε τα πηγάδια και χτυπήστε την πλάκα σταθερά σε στυπόχαρτο.

Σημαντικό: Αφήστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης να παραμείνει στα πηγάδια για τουλάχιστον 20 δευτερόλεπτα κατά τη διάρκεια κάθε βήματος πλύσης.



4α. Πιπεταρίστε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος (άδειο) και

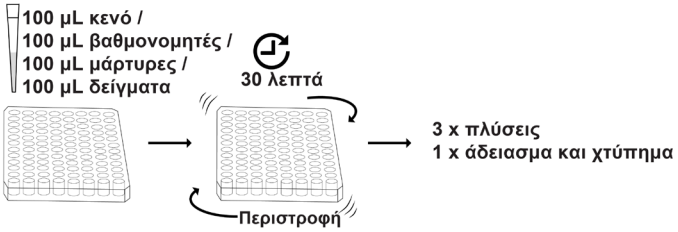
Πιπεταρίστε 100 μL βαθμονομητών A-E στα αντίστοιχα πηγάδια.

4β. Πιπεταρίστε 100 μL μαρτύρων χαμηλό και υψηλό στα αντίστοιχα πηγάδια.

4γ. Πιπεταρίστε 100 μL του κάθε αραιωμένου δείγματος στα αντίστοιχα πηγάδια.

5. Καλύψτε την πλάκα με το επικάλυμμα πλάκας και επωάστε για 30 + μέγιστο 5 λεπτά σε αναδευτήρα πλάκας ρυθμισμένο στα ~450 rpm στους 18-28 °C (βλέπετε τεχνικές προφυλάξεις – διαδικασία ELISA).

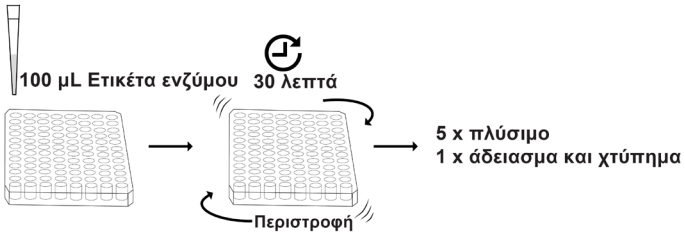
6. Αφαιρέστε και απορρίψτε το επικάλυμμα πλάκας. Αδειάστε τα πηγάδια και πλύντε 3 φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά πηγάδι (βλέπετε τεχνικές προφυλάξεις – διαδικασία ELISA). Αδειάστε τα πηγάδια και χτυπήστε την πλάκα σταθερά σε στυπόχαρτο.



7. Πιπεταρίστε 100 μL της ετικέτας ενζύμου σε όλα τα πηγάδια.

8. Καλύψτε την πλάκα με το επικάλυμμα πλάκας και επωάστε για 30 +/-5 λεπτά σε αναδευτήρα πλάκας ρυθμισμένο στα ~450 rpm στους 18-28 °C.

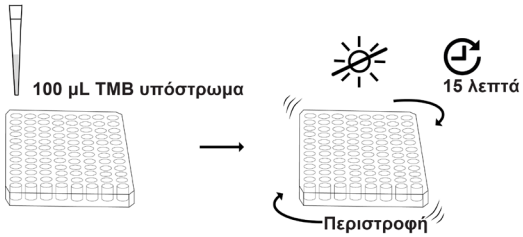
9. Αφαιρέστε και απορρίψτε το επικάλυμμα πλάκας. Αδειάστε τα πηγάδια και πλύντε 5 φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά πηγάδι. Αδειάστε τα πηγάδια και χτυπήστε την πλάκα σταθερά σε στυπόχαρτο.



Σημαντικό: Αφήστε το διάλυμα υποστρώματος TMB να εξισορροπήσει στους 18-28 °C.

10. Πιπεταρίστε 100 μL διάλυμα υποστρώματος TMB σε όλα τα πηγάδια.

11. Καλύψτε την πλάκα με το επικάλυμμα πλάκας, προστατέψτε την πλάκα από το άμεσο φως και επωάστε για 15 ±2 λεπτά σε αναδευτήρα πλάκας ρυθμισμένο στα ~450 rpm στους 18-28 °C.



12. Πιπεταρίστε 100 μL διαλύματος τερματισμού σε όλα τα πηγάδια. Αφαιρέστε τις φυσαλίδες αέρα με ένα ρύγχος πιπέτας. Προχωρήστε στο βήμα 13 μέσα σε 30 λεπτά.

13. Διαβάστε την απορρόφηση στα 450 nm σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η πλήρης κατανόηση των οδηγιών χρήσης είναι απαραίτητη για την επιτυχή χρήση του προϊόντος. Αξιόπιστα αποτελέσματα θα ληφθούν μόνο με ακριβείς εργαστηριακές τεχνικές και ακολουθώντας με ακρίβεια αυτές τις οδηγίες χρήσης.

Το κιτ BÜHLMANN fCAL® ELISA διατίθεται με δύο μάρτυρες: μάρτυρες χαμηλό και υψηλό. Οι αντίστοιχες τιμές αναφοράς των μαρτύρων αναφέρονται στο φύλλο δεδομένων QC που παρέχεται με κάθε κιτ. Οι τιμές και τα εύρη που επισημαίνονται στο φύλλο δεδομένων QC αναφέρονται πάντα στην τρέχουσα παρτίδα κιτ και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων. Εάν τα αποτελέσματα για τους μάρτυρες χαμηλό και/ή υψηλό είναι εκτός του εύρους που αναφέρεται στο φύλλο δεδομένων QC, συνιστάται να θεωρήσετε ολόκληρη την εκτέλεση ως μη έγκυρη.

Συνιστάται η χρήση δειγμάτων εσωτερικού ελέγχου, επιπρόσθετα με τα κιτ μαρτύρων, σύμφωνα με τους τοπικούς και εθνικούς κανονισμούς. Η χρήση δειγμάτων εσωτερικού ελέγχου συνιστάται για τη διασφάλιση της καθημερινής εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμος έλεγχος για την καλπροτεκτίνη κοπράνων, συνιστούμε τη χρήση μιας δεξαμενής εκχυλισμάτων κοπράνων με φυσιολογικά και παθολογικά επίπεδα για εσωτερικό έλεγχο ποιότητας.

Η αναπαραγωγιμότητα των τυπικών παραμέτρων καμπύλης και των τιμών μαρτύρων θα πρέπει να είναι εντός των καθορισμένων ορίων εργαστηριακής αποδοχής. Εάν η απόδοση της ανάλυσης δεν πληροί τα καθορισμένα όρια και η επανάληψη έχει αποκλείσει σφάλματα στην τεχνική, ελέγξτε τα ακόλουθα ζητήματα: i) πιπετάρισμα, έλεγχος θερμοκρασίας και συσκευές χρονισμού, ii) ρυθμίσεις αναγνώστη ELISA. iii) ημερομηνίες λήξης των αντιδραστηρίων, iv) συνθήκες αποθήκευσης και επώασης, v) το διάλυμα υποστρώματος TMB πρέπει να είναι άχρωμο,

vi) καθαρότητα νερού, vii) μέθοδοι αναρρόφησης και πλύσης.

ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ

Δεν υπάρχουν διεθνώς ή εθνικά αναγνωρισμένα υλικά αναφοράς ή διαδικασίες μέτρησης αναφοράς για την αναλυόμενη ουσία καλπροτεκτίνης σε δείγμα κοπράνων. Οι τιμές του βαθμονομητή BÜHLMANN fCAL® ELISA εκχωρούνται σε πολλαπλές εκτελέσεις μέτρησης χρησιμοποιώντας εσωτερικό υλικό αναφοράς βασισμένο σε ανθρώπινο ορό και στη διαδικασία μέτρησης BÜHLMANN fCAL® ELISA. Η συγκέντρωση καλπροτεκτίνης του εσωτερικού υλικού αναφοράς καθορίστηκε χρησιμοποιώντας καθαρισμένο MRP8/14 από ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα ως κύριο υλικό αναφοράς.
Το διάστημα εμπιστοσύνης 95% της συνδυασμένης αβεβαιότητας των προϊόντων βαθμονομητών προσδιορίστηκε ως χαμηλότερο από 13,3%, η συνδυασμένη αβεβαιότητα των προϊόντων μαρτύρων είναι χαμηλότερη από 16,4%.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Standard καμπύλη

Συνίσταται η χρήση λογισμικού προγράμματος ικανού των ακόλουθων υπολογισμών: αφαίρεση της κενής τιμής OD από κάθε πηγάδι βαθμονομητή ώστε να υπολογιστεί η τιμή του βαθμονομητή. Δημιουργία μιας standard καμπύλης χρησιμοποιώντας προσαρμογή λογιστικής 4 παραμέτρων (4 PL).

Μάρτυρες και Δείγματα

Συνίσταται η χρήση λογισμικού ικανού των ακόλουθων υπολογισμών: αφαίρεση της κενής τιμής OD από κάθε πηγάδι μάρτυρα/δείγματος. Υπολογισμός συγκέντρωσης καλπροτεκτίνης του μάρτυρα/δείγματος σε κάθε πηγάδι, σε μg/g, χρησιμοποιώντας την καθιερωμένη standard καμπύλη.

Εύρος εργασίας 10-600 μg/g

Αν επιλέξετε τη χαμηλότερου εύρους ELISA διαδικασία, οι συγκεντρώσεις βαθμονομητή πρέπει να ρυθμιστούν ως: 10, 30, 100, 300 και 600 μg/g καλπροτεκτίνης. Επιπλέον παράγοντες αραίωσης (αν χρησιμοποιείται μια διαφορετική αραίωση από 1:2500) πρέπει να πολλαπλασιαστούν με τα αποτελέσματα για να λάβετε τα τελικά αποτελέσματα.

Ανατρέξτε στο πίνακα 12 και εικόνα 1 για τυπικά δεδομένα (αποτελέσματα και standard καμπύλη). Αυτά τα αποτελέσματα και η standard καμπύλη παρέχονται μόνο για σκοπούς επίδειξης. Μια standard καμπύλη πρέπει να δημιουργείται για κάθε σετ δειγμάτων που αναλύονται.

Εύρος εργασίας 30-1800 μg/g

Αν επιλέξετε τη διευρυμένου εύρους διαδικασία ELISA, οι ακόλουθες ονομαστικές τιμές βαθμονομητή πρέπει να οριστούν ως: 30, 90, 300, 900 και 1800 μg/g καλπροτεκτίνης. Επιπλέον παράγοντες αραίωσης (αν χρησιμοποιείται μια διαφορετική τελική αραίωση από 1:7500) πρέπει να πολλαπλασιαστούν με τα αποτελέσματα για να λάβετε τα τελικά αποτελέσματα.

Ανατρέξτε στο πίνακα 15 και εικόνα 3 για τυπικά δεδομένα (αποτελέσματα και standard καμπύλη). Αυτά τα αποτελέσματα και η standard καμπύλη παρέχονται μόνο για σκοπούς επίδειξης. Μια standard καμπύλη πρέπει να δημιουργείται για κάθε σετ δειγμάτων που αναλύονται.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Τα αντιδραστήρια που παραδίδονται με το BÜHLMANN fCAL® ELISA κιτ προορίζονται για τον προσδιορισμό των επιπέδων καλπροτεκτίνης μόνο σε ανθρώπινα δείγματα κοπράνων.
- Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες πληροφορίες από την κλινική αξιολόγηση του ασθενούς και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες.
- Για την παρακολούθηση της νόσου IBD, έχει προταθεί ότι πολλαπλές μετρήσεις καλπροτεκτίνης κοπράνων που πραγματοποιούνται σε μεσοδιαστήματα έως και 4 εβδομάδων, έχουν την καλύτερη διαγνωστική ακρίβεια στην πρόβλεψη της κλινικής υποτροπής σε ασθενείς (αναφ. 19-20).
- Τα αποτελέσματα μπορεί να μην είναι κλινικά εφαρμόσιμα σε παιδιά κάτω των 4 ετών που έχουν ελαφρά αυξημένα επίπεδα καλπροτεκτίνης στα κόπρανα (αναφ. 21-24).
- Κάποιοι ασθενείς που λαμβάνουν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAID) θα έχουν αυξήσεις στα επίπεδα καλπροτεκτίνης των κοπράνων τους.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΜΣΑΤΩΝ

I. Διάκριση της οργανικής νόσου από τη λειτουργική γαστρεντερική νόσο

Οι κατηγορίες των αποτελεσμάτων βασίζονται σε δεδομένα από κλινικές μελέτες που έγιναν από την BÜHLMANN και είναι συστάσεις της BÜHLMANN. Όλα τα αποτελέσματα της δοκιμής πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τις πληροφορίες από τα κλινικά συμπτώματα του ασθενή, ιατρικό ιστορικό και άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Κλινικά κατώφλια

Αποτελέσματα από 58 κλινικά δείγματα από ασθενείς που διαγνώστηκαν με IBS και 131 κλινικά δείγματα από ασθενείς που διαγνώστηκαν με IBD, από μια διεθνή κλινική μελέτη, αναλύθηκαν ώστε να ληφθούν οι τιμές που περιγράφονται στον πίνακα 4.

Συγκέντρωση καλπροτεκτίνης	Ερμηνεία	Παρακολούθηση
< 80 μg/g	Κανονική	Καμία
80 – 160 μg/g	Γκρι-ζώνη/Οριακά	Παρακολούθηση μέσα σε 4 – 6 εβδομάδες
> 160 μg/g	Αυξημένη	Επαναλάβετε όσο χρειάζεται

Πίνακας 4

Τιμές καλπροτεκτίνης κάτω από 80 μg/g

Τιμές καλπροτεκτίνης κοπράνων <80 μg/g δεν είναι ενδεικτικές φλεγμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα. Ασθενείς με χαμηλά επίπεδα καλπροτεκτίνης δεν είναι πιθανό να χρειάζονται επεμβατικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό της αιτίας της φλεγμονής.

Τιμές καλπροτεκτίνης μεταξύ και ίσες με 80 και 160 μg/g

Μεσαία επίπεδα καλπροτεκτίνης κοπράνων μεταξύ και ίσα με 80 και 160 μg/g, που επίσης ονομάζονται επίπεδα γκρίζας-ζώνης, δεν είναι άμεσα ενδεικτικά μιας ενεργούς φλεγμονής που απαιτεί άμεση παρακολούθηση με επεμβατική δοκιμή. Ωστόσο, η παρουσία φλεγμονής δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επανεξέταση επιπέδων

καλπροτεκτίνης κοπράνων μετά από 4 με 6 εβδομάδες συνίσταται για να προσδιοριστεί το επίπεδο φλεγμονής.

Τιμές καλπροτεκτίνης πάνω από 160 μg/g

Τιμές καλπροτεκτίνης κοπράνων >160 μg/g είναι ενδεικτικές διήθησης ουδετερόφιλων στο γαστρεντερικό σωλήνα, επομένως, μπορεί να είναι σημάδι παρουσίας μιας ενεργούς φλεγμονώδους νόσου. Προτείνεται από τους ειδικούς περαιτέρω κατάλληλες διερευνητικές διαδικασίες για την επίτευξη μιας συνολικής κλινικής διάγνωσης.

Κλινική αξιολόγηση

Η ικανότητα του BÜHLMANN fCAL® ELISA να διακρίνει μεταξύ ασθενών με IBD και άλλων μη φλεγμονωδών GI νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου του IBS, δοκιμάστηκε σε κλινική μελέτη με ένα σύνολο 337 ενήλικων και παιδιατρικών ασθενών. Εκατόν τριάντα πέντε (135) ασθενείς είχαν μια τελική διάγνωση του IBD (νόσος του Crohn, ελκώδη κολίτιδα ή απροσδιόριστη κολίτιδα), 130 ασθενείς υπέφεραν από IBS και 72 ασθενείς παρουσιάστηκαν με κοιλιακό άλγος και/ή διάρροια ή άλλες GI σχετιζόμενες μη φλεγμονώδεις καταστάσεις (ανατρέξτε στο πίνακα 5). Οι τελικές διαγνώσεις υποστηρίχτηκαν ενδοσκοπικά καθώς και από άλλα κλινικά ευρήματα.

Μια κλινική ευαισθησία του 93,3% στα 80 μg/g και μια κλινική ειδικότητα του 83,7% στα 160 μg/g, μπορεί να επιτευχθεί στη διαφοροποίηση μεταξύ IBD και GI σχετιζόμενες μη φλεγμονώδεις καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του IBS. Η ROC ανάλυση καμπύλης είχε σαν αποτέλεσμα μια AUC στο 0,923 (ανατρέξτε στο πίνακα 6).

Μια κλινική ευαισθησία του 93,3% στα 80 μg/g και μια κλινική ειδικότητα του 85,4% στα 160 μg/g, μπορεί να επιτευχθεί στη διαφοροποίηση μεταξύ IBD και IBS. Η ROC ανάλυση καμπύλης είχε σαν αποτέλεσμα μια AUC στο 0,933 (ανατρέξτε στο πίνακα 8).

Ο βέλτιστος συνδυασμός αποκοπής για αυτές τις ομάδες ασθενών μπόρεσε να οριστεί από τη ROC ανάλυση στα 80 μg/g και 160 μg/g καλπροτεκτίνης, που είναι ελαφρώς πιο αυστηρός από ένα συνδυασμό **μιας πιο ευαίσθητης αποκοπής στα 50 μg/g** με χαμηλότερη απόδοση στην εξειδίκευση και **μια ανώτερη αποκοπή στα 200 μg/g** με ελαφρώς μικρότερη ευαισθησία (πίνακας 7 και 9).

II. IBD παρακολούθηση

Κλινικά κατώφλια και αξιολόγηση

Ο προσδιορισμός της καλπροτεκτίνης κοπράνων είναι ένας αξιόπιστος και απλός τρόπος στη βοήθεια παρακολούθησης των IBD ασθενών (αναφ. 7-18).

Η συσχέτιση των επιπέδων καλπροτεκτίνης και της φλεγμονώδης κατάστασης του εντερικού βλεννογόνου των ασθενών, σύμφωνα με ενδοσκοπικές αξιολογήσεις, προσδιορίστηκαν σε τρεις ανεξάρτητες μελέτες χρησιμοποιώντας τη δοκιμή καλπροτεκτίνης της BÜHLMANN (πίνακας 10). Η διαγνωστική αξία της καλπροτεκτίνης στη πρόβλεψη της κλινικής ύφεσης και υποτροπής, σύμφωνα με τα συμπτώματα του ασθενούς, τους δείκτες κλινικής δραστηριότητας, την απρογραμμάτιστη ανάγκη για κλιμάκωση της θεραπείας, τη νοσηλεία ή την επείγουσα ανάγκη προσδιορίστηκε σε τρεις μελέτες χρησιμοποιώντας τη δοκιμή καλπροτεκτίνης της BÜHLMANN (πίνακας 11).

Οι κατηγορίες αποτελεσμάτων που παρατίθενται είναι συστάσεις και η δημιουργία τους βασίζεται σε συμπυκνωμένη γνώση δημοσιευμένων αποκοπών και κλινικών μελετών απόδοσης. Συνιστάται στους επαγγελματίες υγείας να καθορίζουν μεμονωμένα κατώφλια για τους ασθενείς προσδιορίζοντας το βασικό επίπεδο καλπροτεκτίνης του ασθενούς κατά τη διάρκεια της ύφεσης της νόσου.

Τιμές καλπροτεκτίνης κάτω από 100 μg/g

Επίπεδα καλπροτεκτίνης κοπράνων κάτω από 100 μg/g μπορούν αξιόπιστα να υποδηλώσουν ασθενείς, με χαμηλό κίνδυνο κλινικής υποτροπής, σε ενδοσκοπική ύφεση για τους οποίους μπορούν να αποφευχθούν επεμβατικές ενδοσκοπικές επεμβάσεις (αναφ. 7-18).

Τιμές καλπροτεκτίνης μεταξύ 100 και 300 μg/g

Επίπεδα καλπροτεκτίνης κοπράνων μεταξύ 100-300 μg/g μπορεί να υποδηλώνουν την ανάγκη αυστηρότερου ελέγχου την επόμενη περίοδο για την αξιολόγηση των τάσεων ανάπτυξης της νόσου.

Τιμές καλπροτεκτίνης πάνω από 300 μg/g

Αν τα επίπεδα καλπροτεκτίνης κοπράνων είναι πάνω από 300 μg/g θα πρέπει να επαναληφθεί η εξέταση και άν επιβεβαιωθούν τα αυξημένα επίπεδα, χρειάζονται περαιτέρω διερευνητικές διαδικασίες (αναφ. 7-18).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της BÜHLMANN fCAL® ELISA ορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χειροκίνητης εκχύλισης, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά.

Εύρος εργασίας: 10 - 600 μg/g

Επαναληψιμότητα: 1,9 – 8,0% CV
Εργαστηριακή ακρίβεια: 5,5 – 14,0% CV

Η επαναληψιμότητα και εργαστηριακή ακρίβεια ορίστηκαν σύμφωνα με την CLSI οδηγία EP05-A2 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης με 22 μέρες x 2 αντίγραφα. Δέκα εκχυλισμένα δείγματα κοπράνων με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης εύρους 13,2 – 501,4 μg/g εξετάστηκαν (πίνακας 13).

Όριο ανίχνευσης (LoD): 4,2 μg/g

Το όριο αντίδρασης ορίστηκε σύμφωνα με την CLSI οδηγία EP17-A και με αναλογίες ψευδών θετικών (α) λιγότερο από 5% και ψευδώς αρνητικών (β) λιγότερο από 5% βασισμένα σε 240 προσδιορισμούς, με 80 κενά (ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης) και 160 αντίγραφα χαμηλού επιπέδου και ένα **LoB of 0,29 μg/g**.

Όριο ποσοτικοποίησης (LoQ): 9,8 μg/g

Το LoQ ορίστηκε χρησιμοποιώντας δεδομένα που λήφθηκαν στα πλαίσια μελέτης ακρίβειας εργαστηρίου, συμπεριλαμβανομένου ενός επιπλέον δείγματος κοπράνων με συγκέντρωση 7,4 μg/g. Το LoQ προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση καλπροτεκτίνης στην οποία η μη γραμμική προσαρμογή των συνολικών δεδομένων ακριβείας τέμνει τον στόχο ακριβείας του 20% CV.

Γραμμικότητα: 10 - 600 μg/g

Το γραμμικό εύρος της BÜHLMANN fCAL® ELISA προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP06-A. Μια μέγιστη απόκλιση από τη γραμμικότητα ±20% επιτράπηκε. Για τιμές κάτω από 75 μg/g μια απόλυτη διαφορά λιγότερη από ±15 μg/g επιτράπηκε (πίνακας 14).

Ακρίβεια/Ανάκτηση
Συνολικό bias: -1,1%;
Κατώτερο Όριο Συμφωνίας: -17,5%,
Υψηλότερο Όριο Συμφωνίας: 15,4%

Τέσσερα αρνητικά εκχυλισμένα δείγματα κοπράνων εμπλουτίστηκαν με αυξανόμενες ποσότητες καλπροτεκτίνης από δείγματα ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 2.

Hook επίδραση υψηλής δόσης

Δείγματα με θεωρητικές συγκεντρώσεις έως ~60'000 μg/g μπορούν να προσδιοριστούν χωρίς τον περιορισμό του εύρους μέτρησης της δοκιμασίας.

Εύρος εργασίας: 30 - 1800 μg/g

Επαναληψιμότητα: 1,7 – 5,8% CV
Εργαστηριακή ακρίβεια: 3,1 – 9,4% CV

Η επαναληψιμότητα και η εργαστηριακή ακρίβεια ορίστηκαν σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP05-A3 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης 10 μέρες x 2 εκτελέσεις x 4 αντίγραφα. Επτά συγκεντρωμένα εκχυλίσματα δειγμάτων κοπράνων με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης που κυμαίνονται από 38,5 - 918,0 μg/g εξετάστηκαν (πίνακας 16).

Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων: 4,2 – 9,7% CV

Η ακρίβεια μεταξύ παρτίδων ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP05-A3 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης 3 παρτίδες x 5 μέρες x 5 αντίγραφα και ένα μοντέλο συνιστωσών διακύμανσης τυχαίων επιδράσεων. Έξι δείγματα κορπάνων με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης μεταξύ 46,4 -1476,1 μg/g εξετάστηκαν (πίνακας 17).

Αναπαραγωγιμότητα (Πολλαπλή μελέτη αξιολόγησης ακριβείας): 6,4 – 19,0% CV

Η αναπαραγωγιμότητα ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP05-A3 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης 3 εργαστηριακές τοποθεσίες x 2 χειριστές x 5 ημέρες x 2 εκτελέσεις ανά ημέρα x 4 αντίγραφα. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρτίδες αντιδραστηρίων στη μελέτη. Πέντε συγκεντρωμένα εκχυλίσματα δειγμάτων κοπράνων με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης μεταξύ 42,1 - 1053,3 μg/g εξετάστηκαν (πίνακας 18).

Όριο ανίχνευσης (LoD): 12,6 μg/g

Το LoD ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP17-A2 και με και με αναλογίες ψευδών θετικών (α) λιγότερο από 5% και ψευδών αρνητικών (β) λιγότερο από 5% βασισμένα σε 120 προσδιορισμούς, με 60 κενά (ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής) και 60 αντίγραφα χαμηλού επιπέδου και με **LoB ίσο με 8,3 μg/g**.

Όριο Ποσοτικοποίησης (LoQ): 21,3 μg/g

Το LoQ ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP17-A2, βασισμένο σε 60 προσδιορισμούς και με στόχο ακρίβειας 20% CV.

Γραμμικότητα: 30 - 1800 μg/g

Το γραμμικό εύρος της BÜHLMANN fCAL® ELISA προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP06-A. Η μέγιστη απόκλιση από τη γραμμικότητα που επιτράπηκε ήταν ±20%. Για τιμές κάτω από 75 μg/g μια απόλυτη διαφορά λιγότερη από ±15 μg/g επιτράπηκε (πίνακας 19).

Ακρίβεια / Ανάκτηση: 96,4 – 102,2%

Επτά εκχυλίσματα δειγμάτων κοπράνων με επίπεδα καλπροτεκτίνης εύρους μεταξύ 46,5 – 990,2 μg/g εμπλουτίστηκαν με 180 μg/g καλπροτεκτίνης στο υλικό του βαθμονομητή. Ο εμπλουτισμός εκτελέστηκε στο 10% του όγκου εκχυλίσματος του δείγματος. Τα δείγματα "Baseline" εμπλουτίστηκαν με την αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος επώασης. Τα δείγματα "Baseline" και "Baseline + Spike" μετρήθηκαν σε τρεις αντίγραφα (πίνακας 20).

Προαναλυτική

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της BÜHLMANN fCAL® ELISA σε σχέση με τις προαναλυτικές διαδικασίες ορίστηκαν χρησιμοποιώντας εύρος εργασίας 30 –1800 μg/g.

Αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης – χειροκίνητη εκχύλιση: 9,5 – 20,5%

Η αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP05-A3 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης με 10 εκχυλίσεις x 2 αντίγραφα. Εννιά κλινικά δείγματα κοπράνων, συμπεριλαμβανομένων στερεών, ημι-στερεών και υγρών, με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης εύρους 51,2 - 1783,7 μg/g, εξετάστηκαν (πίνακας 21).

Αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης – CALEX® Cap: 7,9 -16,9%

Η αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης ορίστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP05-A3 χρησιμοποιώντας ένα σχέδιο μελέτης με 3 CALEX® Cap παρτίδες x 4 εκχυλίσεις x 4 αντίγραφα. Πέντε κλινικά δείγματα κοπράνων, συμπεριλαμβανομένων στερεών, ημι-στερεών και υγρών, με συγκεντρώσεις καλπροτεκτίνης εύρους 42,5 – 2949,9 μg/g, εξετάστηκαν (πίνακας 22).

Σύγκριση μεθόδου CALEX® Cap vs. Χειροκίνητη εκχύλιση
Bias στα 80 μg/g: 5,9% (95% CI: 1,4 – 12,2%)
Bias στα 160 μg/g: 12,0% (95% CI: 7,8 – 17,0%)
Μέσο Bias: 10,1% (95% CI: 5,7 – 14,5%)

Η μελέτη σύγκρισης μεθόδου εκτελέστηκε σύμφωνα με τη CLSI οδηγία EP09-A3. Διακόσια σαράντα ένα (241) κλινικά δείγματα εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας μια παρτίδα της CALEX® Cap συσκευής. Οι τιμές αναφοράς με μια τελική συγκέντρωση καλπροτεκτίνης 30,5 – 1496,6 μg/g ορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη χειροκίνητη μέθοδο εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα μετρήθηκαν σε μεμονωμένους προσδιορισμούς και στις δύο μεθόδους. Το bias ορίστηκε χρησιμοποιώντας Passing-Bablok γραμμική παλινδρόμηση και Bland-Altman ανάλυση (πίνακες 23 και 24).

ΠΑΡΕΜΒΑΖΟΝΤΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η ευαισθησία της BÜHLMANN fCAL® ELISA ανάλυσης σε από του στόματος φαρμακευτικά προϊόντα, συμπληρώματα διατροφής, αιμοσφαιρίνη καθώς και εντεροπαθολογικούς μικροοργανισμούς αξιολογήθηκε με την CLSI οδηγία EP07-A2, χρησιμοποιώντας εκτεταμένο εύριος εργασίας. Bias στα αποτελέσματα που ξεπερνούσε το 10% θεωρήθηκε ως παρέμβαση. Δεν ανιχνεύτηκε παρέμβαση με ουσίες, που αναφέρονται στον πίνακα 25, μέχρι τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις. Δεν ανιχνεύτηκε παρέμβαση με εντεροπαθολογικούς μικροοργανισμούς, που αναφέρονται στο πίνακα 26, μέχρι τις ενδεικνυόμενες ποσότητες των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (CFU) ανά mL εκχυλίσματος δείγματος κοπράνων.

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

Κλινικές μελέτες

Κλινική μελέτη – διάκριση της οργανικής νόσου από τη λειτουργική γαστρεντερική νόσο

Τελική διάγνωση	Κατανομή των αποτελεσμάτων των ασθενών σε αριθμούς (ποσοστό) εντός του διαγνωστικού εύρους BÜHLMANN fCAL® ELISA.			
	< 80 μg/g	80 - 160 μg/g	> 160 μg/g	Συνολικό
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Άλλα GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Πίνακας 5

IBD vs. μη-IBD	Κλινικό σημείο απόφασης	
	80 μg/g	160 μg/g
Ευαισθησία (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Ειδικότητα (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)	

Πίνακας 6

IBD vs. μη-IBD	Κλινικό σημείο απόφασης	
	50 μg/g	200 μg/g
Ευαισθησία (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Ειδικότητα (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%)

Πίνακας 7

IBD vs. IBS	Κλινικό σημείο απόφασης	
	80 μg/g	160 μg/g
Ευαισθησία (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Ειδικότητα (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)	

Πίνακας 8

IBD vs. IBS	Κλινικό σημείο απόφασης	
	50 μg/g	200 μg/g
Ειδικότητα α (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Ειδικότητα (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%)

Πίνακας 9

μη-IBD – IBS + άλλα GI

CI – διάστημα εμπιστοσύνης

PPV – θετική προγνωστική τιμή

NPV – αρνητική προγνωστική τιμή

ROC AUC – περιοχή κάτω από χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας του δέκτη

Κλινικές μελέτες – IBD παρακολούθηση

Καλπροτεκτίνη[1] vs IBD δραστηριότητα προσδιορισμένη από ενδοσκοπικά ευρήματα	Μελέτη 1 Ισπανία (αναφ. 9)	Μελέτη 2 Ισπανία (αναφ. 10)	Μελέτη 3 Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία (αναφ.11)
Αριθμός ασθενή και δημογραφικά	89 (CD[2]) Ηλικίες: 32-58 44% άρρενες	123 (UC[3]) Ηλικίες: 18-85 66.4% άρρενες	99 (CD[2] μετά από εκτομή) Ηλικίες: 29-47 46.5% άρρενες
Cut-off	272 μg/g	280 μg/g	100 μg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80.3%	53%

Πίνακας 10

[1] Μελέτη 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL και Quantum Blue® fCAL high range
Μελέτη 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
[2] CD = Ασθενείς με νόσο του Crohn
[3] UC = Ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα

Κιλινικές μελέτες – IBD παρακολούθηση

Καλπροτεκτίνη[1] vs μελλοντική κλινική ύφεση ή υποτροπή	Μελέτη 4 HB (αναφ. 12)	Μελέτη 5 Ισπανία (αναφ. 13)	Μελέτη 6 Ισπανία (αναφ. 14)
Αριθμός ασθενή και δημογραφικά	92 (CD[2]) 38% άρρενες	30 (CD[2]) adalimumab θεραπεία Ηλικίες: 24-64 43,3% άρρενες	33 (CD[2]) 20 (UC[3]) infliximab θεραπεία Ηλικίες: 18-68 47,2% άρρενες
Χρόνος παρακολούθησης μετά τη μέτρηση της καλπροτεκτίνης	12 μήνες	4 μήνες	12 μήνες
Ασθενείς σε κλινική υποτροπή μετά από παρακολούθηση	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%

Πίνακας 11

[1] Μελέτη 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
Μελέτη 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL και Quantum Blue® fCAL high range
[2] CD = Ασθενείς με νόσο του Crohn
[3] UC = Ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

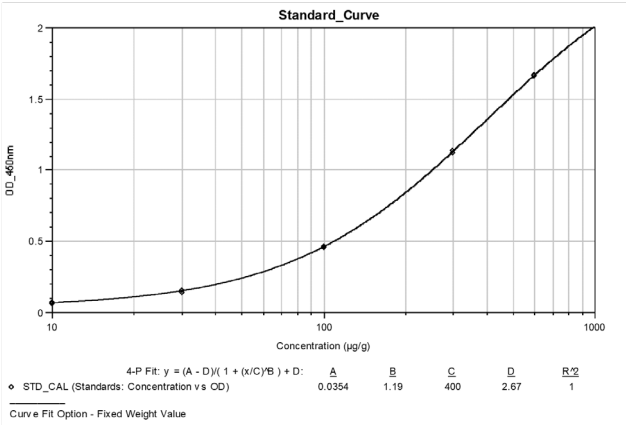
ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΟΥ ΕΥΡΟΥΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 10-600 μg/g

Παράδειγμα αποτελεσμάτων

	Συγκ. [μg/g]	Απορ. [OD]	Υπολ. Συγκ. [μg/g]	CV Συγκ [%]
Κενό Μέσο		**0,096**		
Βαθ A Βαθ A **Cal A Μέσο**	10 10 **10**	0,073 0,066 **0,069**		**7,2**
Βαθ B Βαθ B **Βαθ B Μέσο**	30 30 **30**	0,143 0,153 **0,148**		**4,8**
Βαθ C Βαθ C **Βαθ C Μέσο.**	100 100 **100**	0,465 0,456 **0,460**		**1,4**
Βαθ D Βαθ D **Βαθ D Μέσο**	300 300 **300**	1,121 1,135 **1,128**		**0,9**
Βαθ E Βαθ E **Βαθ E Avg.**	600 600 **600**	1,658 1,671 **1,664**		**0,6**
Μαρ Χαμηλό Μαρ Χαμηλό **Μαρ Χαμηλό Μέσο**		0,201 0,189 **0,195**	41 39 **40**	**4,4**
Μαρ Υψηλό Μαρ Υψηλό **Μαρ Υψηλό Μέσο**		0,598 0,583 **0,590**	134 130 **132**	**1,8**

Πίνακας 12

Παράδειγμα τυπικής καμπύλης



Εικόνα 1

Εργαστηριακή ακρίβεια

Δείγμα No.	n	Μέσο [μg/g]	Επαναληψιμότητα		Μεταξύ των ημερών		Ολική Ακρίβεια	
			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%

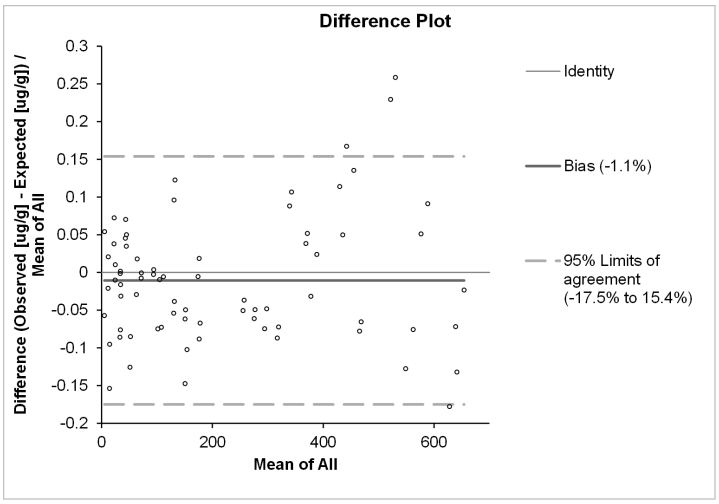
Πίνακας 13

Γραμμικότητα

ID	Δοκιμασμένο εύρος μέτρησης	R^2	p-τιμή για μη γραμμικό συντελεστή	Γραμμικό εύρος
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

Πίνακας 14

Ανάκτηση εμπλουτισμού



Εικόνα 2

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

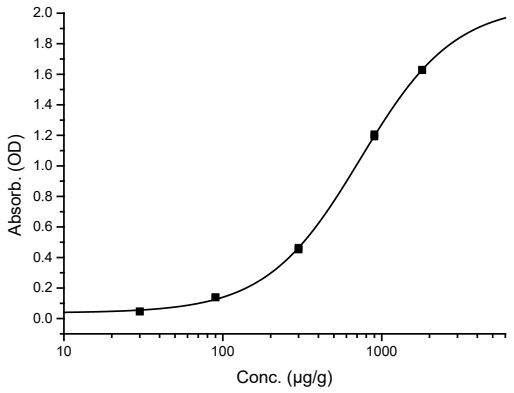
Διαδικασία διευρυμένου εύρους 30-1800 μg/g

Παράδειγμα αποτελεσμάτων

	Συγκέντρωση [μg/g]	Απορρόφηση [OD]
Βαθμονομητής A	30 30	0,047 0,046
Βαθμονομητής B	90 90	0,138 0,140
Βαθμονομητής C	300 300	0,464 0,452
Βαθμονομητής D	900 900	1,207 1,192
Βαθμονομητής E	1800 1800	1,627 1,630
Κενό μέσο		0,057
Μάρτυρας χαμηλό		0,147 0,162
Μάρτυρας υψηλό		0,618 0,618

Πίνακας 15

Παράδειγμα τυπικής καμπύλης



Εικόνα 3

Εργαστηριακή ακρίβεια

ID	Μέσο [μg/g]	n	Επαναληψιμότητα		Μεταξύ της εκτέλεσης		Μεταξύ της ημέρας		Εντός του εργαστηρίου	
			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%

Πίνακας 16

Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων

ID	Μέσο [μg/g]	n	Εντός της εκτέλεσης		Μεταξύ της μέρας		Μεταξύ της παρτίδας		Συνολικό	
			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%

Πίνακας 17

Αναπαραγωγιμότητα - Μελέτη Αξιολόγησης Ακρίβειας Πολλαπλών τοποθεσιών

ID	Μέσο [μg/g]	n	Μεταξύ του χειριστή		Μεταξύ της τοποθεσίας		Συνολικό (Αναπαραγωγιμότητα)	
			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%

Πίνακας 18

Γραμμικότητα

ID	Εξεταζόμενο εύρος μέτρησης [μg/g]	R^2	p-τιμή για μη γραμμικό συντελεστή	Γραμμικό εύρος [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

Πίνακας 19

Ακρίβεια / Ανάκτηση

ID	Μέση baseline [μg/g]	Προβλεπόμενη baseline + spike [μg/g]	Παρατηρούμενη baseline + spike [μg/g]	Ρυθμός ανάκτησης [%]
#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%

Πίνακας 20

ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ - ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗ

Αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης – χειροκίνητη ζύγιση εκχύλισης

ID	Μέσο [μg/g]	n	Εντός εκχύλισης		Μεταξύ εκχύλισης		Συνολική ακρίβεια	
			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%

Πίνακας 21

Αναπαραγωγιμότητα εκχύλισης – CALEX® Cap

ID	Μέσο [μg/g]	Εντός εκχύλισης		Μεταξύ εκχύλισης		Μεταξύ παρτίδας		Συνολική ακρίβεια	
		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%

Πίνακας 22

Σύγκριση μεθόδων – CALEX® Cap εκχύλιση και χειροκίνητη εκχύλιση

Bland-Altman Ανάλυση		
Μέσο Bias (95%)	**Χαμηλότερο LoA (95% CI)**	**Υψηλότερο LoA (95% CI)**
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Πίνακας 23

Passing-Bablok Ανάλυση παλινδρόμησης				
Κλίση (95% CI)	**Αναχαίτηση (μg/g) (95% CI)**	**Bias στα 80 μg/g (95% CI)**	**Bias στα 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

Πίνακας 24

ΠΑΡΕΜΒΑΖΟΝΤΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Φαρμακευτικά από το στόμα, συμπληρώματα διατροφής και αιμοσφαιρίνη

Εμπορική ονομασία	Ενεργό συστατικό	Συγκέντρωση σε mg/50 κοπράνων
gyno-Tardyferon	Iron (II) sulfate (περιέχει 0.35 mg φολικό οξύ)	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 προβιοτικά (107 CFU): *lactobacillus gasseri* PA16 / 8, *bifidobacterium bifidum* MF 20/5, *bifidobacterium longum* SP07 / 3, 12 βιταμίνες: 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), Βιοτίνη (150 μg), φολικό οξύ (200 μg), νικοτινικό οξύ (18 mg), παντοθενικό οξύ (6 mg) and 7 μεταλλικά στοιχεία: ιώδιο (100 μg), σίδηρος (5 mg), ψευδάργυρος (5 mg), σελήνιο (30 μg), χρώμιο (25 μg), μαγγάνιο (1,2 mg), μολυβδαίνιο (25 μg)	1,06
Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη	1,25

Πίνακας 25

Εντεροπαθολογικοί μικροοργανισμοί

Όνομα	Τελική συγκέντρωση (CFU/mL εκχύλισμα κοπράνων)
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	$1,6 \times 10^8$

Πίνακας 26

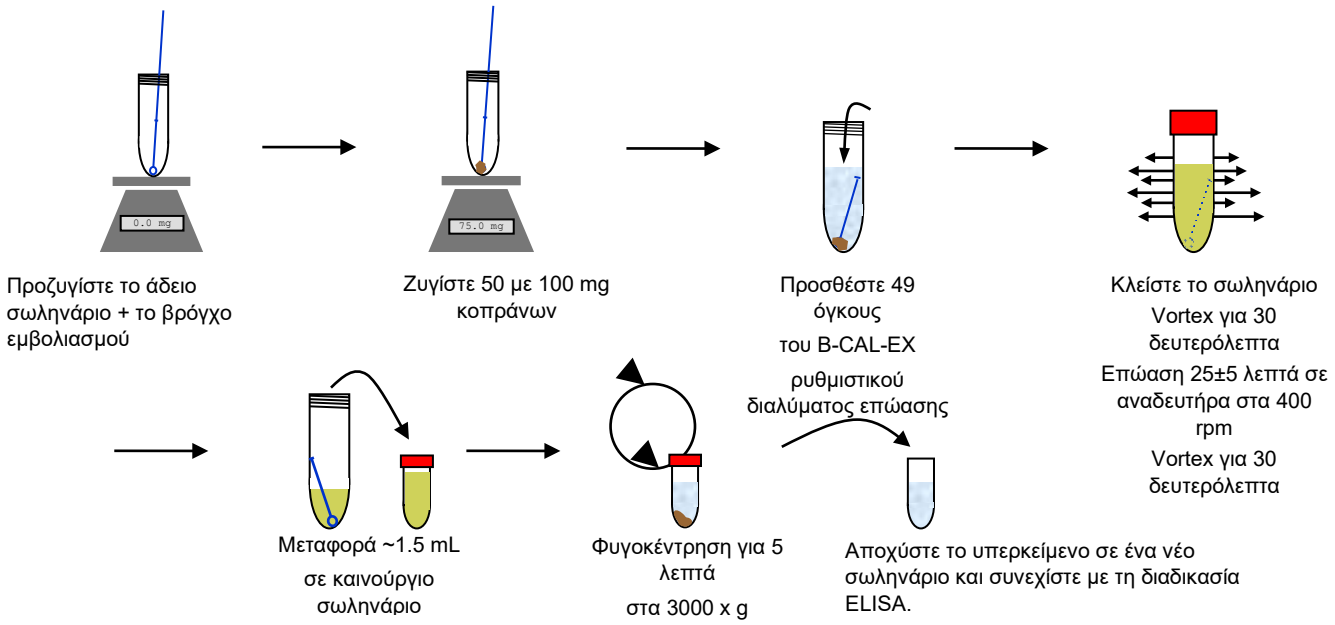
ΑΝΑΦΟΡΕΣ

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)

ΓΡΗΓΟΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΛΠΡΟΤΕΚΤΙΝΗΣ

Διαδικασία χειροκίνητης εκχύλισης



ΓΡΗΓΟΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

ELISA ΚΑΛΠΡΟΤΕΚΤΙΝΗΣ

Προεπικαλυμμένη πλάκα μικροτιτλοδότησης

πλύση 2x με ≥300 μL ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

100 μL ρυθμιστικό διάλυμα επώασης, βαθμονομητές, μάρτυρες ή αραιωμένα δείγματα

επώαση 30 (+ 5) λεπτά
στους 18-28 °C σε αναδευτήρα πλάκας ~450 rpm

πλύση 3x με ≥300 μL ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

προσθήκη 100 μL ετικέτας ενζύμου

επώαση 30 +/-5 λεπτά
στους 18-28 °C σε αναδευτήρα πλάκας ~450 rpm

πλύση 5x *με ≥300 μL ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης*

προσθήκη 100 μL TMB διάλυμα υποστρώματος

επώαση 15 +/-2 λεπτά
στους 18-28 °C σε αναδευτήρα πλάκας ~450 rpm

προσθήκη 100 μL διαλύματος τερματισμού

→ **Ανάγνωση απορρόφησης στα 450 nm (μέσα σε 30 λεπτά)**

ΧΡΟΝΟΣ ΓΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ: 75 ΛΕΠΤΑ

ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΑΛΛΑΓΩΝ

Ημερομηνία	Έκδοση	Αλλαγή
2022-11-16	A3	Αναβάθμιση σε κεφάλαια *προειδοποιήσεων και προφυλάξεων* Συμπερίληψη τιμών αβεβαιότητας βαθμονομητή και αιτιολόγηση της εσωτερικής τυποποίησης στο κεφάλαιο *Τυποποίηση* Ενημέρωση και απλοποίηση της διατύπωσης στο κεφάλαιο *Χαρακτηριστικά Απόδοσης* Αναθεώρηση του κεφαλαίου *Σύμβολα* Πληροφορίες για νέες ευρεσιτεχνίες Συμπερίληψη του κοινοποιημένου αριθμού στο CE-σήμα – διαδικασία αξιολόγησης της συμμόρφωσης σύμφωνα με το IVDR 2017/746

ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΥΜΒΑΝΤΩΝ ΣΤΑ ΚΡΑΤΗ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΕ

Αν οποιοδήποτε σοβαρό συμβάν σε σχέση με αυτή τη συσκευή έχει συμβεί, παρακαλούμε να το αναφέρετε χωρίς καθυστέρηση στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή του κράτους μέλους σας.

ΖΗΜΙΑ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ

Παρακαλούμε ειδοποιήστε το διανομέα σας, αν αυτό το προϊόν παρελήφθη φθαρμένο.

ΣΥΜΒΟΛΑ

Η BÜHLMANN χρησιμοποιεί σύμβολα και σήματα που παρατίθενται και περιγράφονται στο ISO 15223-1. Επιπροσθέτως, τα ακόλουθα σύμβολα και σήματα χρησιμοποιούνται:

Σύμβολο	**Εξήγηση**
MP	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
BUF EX	Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης
BUF WASH 10X	Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10x)
BUF INC	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
CAL A - CAL E	Βαθμονομητής A - E
CONTROL L	Μάρτυρας χαμηλό
CONTROL H	Μάρτυρας υψηλό
EL	Ετικέτα ενζύμου
SUBS TMB	TMB υπόστρωμα
SOLN STOP	Διάλυμα τερματισμού

Κομμάτια του κιτ προστατεύονται με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

CE 0123