# BÜHLMANN fCAL® ELISA

## Calprotectin ELISA

*In vitro* diagnosztikai alkalmazásra

| | |
|---|---|
| EK-CAL | 96 teszt |
| EK-CAL2 | 192 teszt |

Kiadási dátum: 2022-11-16
Verzió A3

**Gyártó**
**BÜHLMANN Laboratories AG**
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Svájc
Tel.: +41 61 487 12 12
Fax: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

# MAGYAR

## JAVASOLT ALKALMAZÁS

A BÜHLMANN fCAL® ELISA egy *in vitro* diagnosztikai teszt a székletmintákban lévő Calprotectin kvalitatív meghatározására a bélnyálkahártya gyulladás megítélését segítve. A teszteredmények felhasználhatók a gyomor-bél traktus szervi gyulladásos betegségeinek (gyulladásos bélbetegség, IBD, különösen Crohn betegség vagy ulceratív kolitisz, UC) elkülönítésére a funkcionális betegségek csoportjától (irritális bélszindróma, IBS) (ld. 1-7), krónikus hasi fájdalmaktól szenvedő betegekben az IBD betegség monitorozására (ld. 7-18).

Kizárólag laboratóriumi felhasználásra.

## A TESZT ELVE

A BÜHLMANN fCAL® ELISA lehetővé teszi a székletkivonatokban lévő Calprotectin szelektív mérését szendvics Elisa módszerrel. A BÜHLMANN fCAL® ELISA mikrotiterlemezét monoklonális befogó antitesttel (mAb) vonták be, amely nagyon specifikus a Calprotectin heterodimer és polimer komplexeire. A páciens székletminta kivonatait, az ELISA folyamat elfogadhatóságának meghatározására szolgáló kontrollokat, és a kalibrátorokat a mikrotiter lemez mélyedéseibe mérik be. 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás és mosási lépések után a tormaperoxidázhoz konjugált detektáló antitestek (Ab) érzékelik a lemezen lévő befogó antitesthez kötött Calprotectin molekulákat. Inkubálás és további mosási lépések után kromogén HRP szubsztrátot, tetrametil-benzidint (TMB) adnak hozzá (kék szín keletkezik), majd a reakció leállítása következik (sárga színre vált). Az abszorbciót 450 nm-en mérik. A beteg székletmintákban a végső Calprotectin koncentrációt µg/g-ban olvassák le a kalibrációs görbéről, amit a kalibrátorértékek alapján vesznek fel.

## A REAGENSEK ÉS ELŐKÉSZÍTÉSÜK

| Reagens | Mennyiség | | Kódszám | Előkészítés |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Extrakciós puffer** | 3 palack x 125 mL | 6 palack x 125 mL | B-CAL-EX | Használatra kész |
| **Mikrotiterlemez** anti-Calprotectin mAb-val fedve | 12 x 8 mélyedés-csík rámában | 2 x 12 x 8 mélyedés-csík rámában | B-CAL-MP | Használatra kész |
| **Lemezzáró fólia** | 3 darab | 6 darab | - | Használatra kész |
| **Mosópuffer koncentrátum (10x), tartósítóval** | 1 palack x 100 mL | 2 palack x 100 mL | B-CAL-WB | Hígítsa mindegyiket 900 mL ionmentes vízzel |
| **Inkubáló puffer tartósítóval** | 2 palack x 125 mL | 3 palack x 125 mL | B-CAL-IB | Használatra kész |
| **Kalibrátorok A - E**[1) 2)] Szérumeredetű Calprotectin puffer-mátrixban, tartósítószerrel | 5 fiola x 1 mL | 5 fiola x 1 mL | B-CAL-CASET | Használatra kész |
| **Alacsony/ Magas**[3)] **Kontroll** Szérumeredetű Calprotectin puffermátrixban, tartósítószerrel | 2 fiola x 1 mL | 2 fiola x 1 mL | B-CAL-CONSET | Használatra kész |
| **HRP-hez konjugált Enzim jelölő** Anti-Calprotectin antitest | 1 fiola x 12 mL | 2 fiola x 12 mL | B-CAL-EL | Használatra kész |
| **TMB Szubsztrát** citrát pufferben | 1 fiola x 12 mL | 2 fiola x 12 mL | B-TMB12 | Használatra kész |
| **Stop oldat** 0.25 M kénsav | 1 fiola x 12 mL | 2 fiola x 12 mL | B-STS12 | Használatra kész **Maró anyag** |

1. táblázat

[1)] A kalibrátorok jelenlegi Calprotectin koncentrációja A-E a következők: 4, 12, 40, 120 és 240 ng/mL Az alsó tartományban használt ELISA módszernél a következő kalibrátor értékeket kell beállítani: 10, 30, 100, 300 és 600 µg/g Calprotectin. Ez a hozzárendelés az alsó tartományban használt ELISA módszernél a végső 1:2500 mintahígításnak felel meg.

[2)] Ha a kiterjesztett tartományú ELISA módszert alkalmazná, akkor a névleges kalibrátor értékeket a következőkre kell beállítani: 30, 90, 300, 900 és 1800 µg/g Calprotectin. Ez a hozzárendelés a kiterjesztett tartományú Elisa módszernél a végső 1:7500 mintahígításnak felel meg.

[3)] A kontrollok lot specifikus mennyiségű humán szérum Calprotectint tartalmaznak Az aktuális koncentrációkat a mellékelt QC lapon találja.

## A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA, MUNKAOLDATOK

| **Lezárt / felbontatlan reagensek** | |
|---|---|
| Tárolja 2-8 °C-on. A címkén szereplő lejárati időn túl ne használja a reagenseket. | |
| **Felnyitott / előkészített reagensek** | |
| Extrakciós puffer | 6 hónapig használható 2-8 °C-on tárolva. |
| Mikrotiterlemez | A nem felhasznált csíkokat azonnal tegye vissza a szárítópárnákat tartalmazó fóliatasakba, és zárja le a cipzár teljes hosszában. Tárolja legfeljebb 6 hónapig 2-8 °C-on. |
| Hígított mosópuffer | Tárolja legfeljebb 6 hónapig 2-8 °C-on |
| Inkubáló puffer | |
| Kalibrátorok | |
| Kontrollok | |
| Enzim jelölő | |
| TMB szubsztrát | |
| Stop oldat | |

2. táblázat

## KIEGÉSZÍTŐ REAGENSEK ÉS ANYAGOK

### Széklet extrakciós eszközök

A 3. táblázatban leírt széklet extrakciós eszközöket a kit nem tartalmazza. A kiválasztott extrakciós eszközöket külön kell megrendelni.

| Extrakciós eszközkészlet | Kiszerelés | Kódszám |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Csomagonként 50, 200 vagy 500 csöves kiszerelésben, mindegyik 5 mL extrakciós pufferrel töltve<br>Használatra kész | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 cső, spatulák, és alapkupakok | B-CAL-RD |

3. táblázat

## NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

### Extrakciós eljárás

- 100 µL és 1000 µL preciziós pipetta eldobható heggyel
- Eldobható polisztirén vagy polipropilén cső az extraktumok átviteléhez (opcionális)
- Lamináris fülke
- Többcsöves vortex keverő / Vortex keverő
- Mikrocentrifuga (≥3000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)
- Extrakciós eszközök (ld. 3. táblázat feljebb) vagy a manuális extrakciós eljáráshoz:
  - 10 µL eldobható oltókacs
  - 15 mL-es polipropilén csövek csavaros kupakkal
  - Precíziós mérleg (10-200 mg)

### ELISA eljárás

- 10 µL, 100 µL és 1000 µL precíziós pipetta eldobható heggyel
- Eldobható polisztirén vagy polipropilén csövek a mintahígítások elkészítéséhez.
- 1000 mL-es mérőhenger a mosópuffer hígításához
- Mikrotiterlemez mosó (ld. technikai óvintézkedések) vagy dugattyús palack a mosáshoz
- Mikrotiterlemez rázó (ld. technikai óvintézkedések)
- Szűrőpapír
- Mikrotiterlemez leolvasó 450 nm abszorbancia méréshez

## FIGYELMEZTETÉS ÉS ELŐVIGYÁZATOSSÁG

### Biztonsági előírások

- Ennek a tesztnek a kalibrátorai és kontrolljai humán eredetű komponenseket tartalmaznak. Noha vizsgálták, és negatívnak találták HBV felületi antigénre, HCV-re és HIV1/2 antitestekre, a reagenseket úgy kell kezelni, mintha képesek lennének fertőzéseket továbbítani, azokkal a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat (GLP) szabályai szerint kell eljárni, megfelelő óvintézkedések mellett.
- Ez a készlet az (EC) No. 1272/2008: számú rendeletben szabályozott összetevőket tartalmazza.

  2-methyl-4-isothiazolin-3-one hydrochlorid (konc. ≥ 0,0015%), így a reagensek allergiás bőrreakciókat okozhatnak (H317).

  Kénsav (konc. ≥2,5 - <5%), ezek a reagensek bőrirritációt (H315) és súlyos szemkárosodást okozhatnak (H319.)
- Kerülni kell a bőr, szem vagy a nyálkahártya érintkezését a reagensekkel. Ha ez mégis megtörténik, azonnal nagymennyiségű vízzel le kell mosni, különben irritáció fordulhat elő.
- A reagenseket és vegyszereket veszélyes anyagként kell kezelni, a nemzeti biológiai veszélyekkel kapcsolatos javaslatok vagy rendelkezések szerint.

### Gyakorlati óvórendszabályok

**A kit összetevői**

- A maradékok a mikrotiter lemez mélyedéseiben a gyártásból maradtak vissza. Ezek a mosási lépések során (a teszt folyamatában a 3. lépés) eltávolításra kerülnek, és nem befolyásolják az eredményt.
- Az összetevők nem használhatók a címkéken feltűntetett időn túl.
- Ne keverje a különböző gyártási számú kitek összetevőit.
- Mindent el kell követni annak érdekében, hogy keresztszennyeződés ne történhessen a reagensek, minták, ill. a mélyedések között.
- Engedje a reagenseket szobahőmérsékletre felmelegedni. Keverje (vortexelje) össze a reagenseket alaposan a használat előtt.
- A mikrotiter mélyedések csak egyszer használhatók.

### Manuális extrakciós eljárás

- A kvantitatív eredmények eléréséhez fontos, hogy a hozzáadott széklet az extrakciós pufferrel teljesen homogén elegyet képezzen. Az extrakciós cső tetejénél a kontaminációt kerülni kell. Kismennyiségű oldatlan részecskék visszamaradása a keverés után előfordulhat.

### ELISA módszer

- Az ELISA módszernél a mosási lépések kivitelezésének alapvető szerepe van a reprodukálható eredmények elérésében. Hagyja a mosópuffert inkubálódni a mélyedésekben legalább 20 másodpercig, mielőtt eltávolítaná.
- Amennyiben automata mosót használ, akkor a „lemezmód” választása erősen javasolt, azaz minden eljárási lépést (adagolás/leszívás) minden csíkon el kell végezni egymásután, mielőtt a műszer tovább lépne a következő mosási ciklusra. Így a minimális inkubációs idő biztosítva van.
- A megjelölt számú mosási ciklust kötelező betartani az eredmények reprodukálhatóságának biztosításához.
- A lemezrázót kb. 450 rpm (7.5 Hz) teljesítményre kell beállítani. A magasabb keverési frekvencia alacsony hígítási linearitáshoz vezethet 300/900 és 600/1800 µg/g között. Vízszintes mozgás helyett forgó mozgást kell alkalmazni.
- Az antigén/ellenanyag reakció megfelelő biztosítása érdekében az 5. pontban leírt inkubációs időnek legalább 30 percig kell tartania. A kicsivel hosszabb (legfeljebb 5 perc) inkubációs idő a végső eredményt nem befolyásolja.
- Az enzimjelölőt az oxigén inaktiválja, nagyon érzékeny a Na-azidra, a timerozálra, a hipoklórsavra és a laboratóriumi vízkészletben gyakran előforduló aromás

klórozott szénhidrogénekre. Ezért csak jóminőségű ionmentes víz használható az eljáráshoz.

- Minden alkalommal új standard görbe felvétele szükséges, amikor vizsgálatot végez (minden teljes, vagy részleges lemez esetén).
- Ha egy ismeretlen minta kezdeti koncentrációja meghaladja a legmagasabb kalibrátor, ezesetben a kalibrátor E értékét, a mintát tovább lehet hígítani inkubációs pufferrel, és újra meg kell mérni a tesztleírásban leírtak szerint. A kapott összhígítási faktort figyelembe kell venni az eredmények számításakor.

## MINTAGYŰJTÉS ÉS TÁROLÁS

Az extrakciós eljáráshoz kevesebb, mint 1 g natív széklet szükséges. Gyűjtse össze a székletet sima csövekbe.

Fontos: A begyűjtött minta semmilyen kémiai vagy biológiai hozzáadott anyagot nem tartalmazhat.

**A minták szállítása**

A székletmintáknak a begyűjtéstől számított 3 napon belül be kell érkezni a laboratóriumba, elemzésre. A minták szállíthatók szobahőmérsékleten, vagy hűtve.

**A minták tárolása**

A székletmintákat tárolja 2-8 °C-on hűtőszekrényben, és extrahálja a beérkezéstől számított 3 napon belül. Ne tárolja a mintákat magas hőmérsékleten.

## A SZÉKLETMINTA EXTRAKCIÓJA ÉS A KIVONAT ELTARTHATÓSÁGA

### 1. CALEX® Cap

**1.1 Extrakciós eljárás**

Kövesse CALEX® Cap eszközzel szállított használati utasításában leírtakat (Kódszám: B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

CALEX® Cap eszköz: A folyós székletminták bemérhetők közvetlenül a CALEX® Cap eszközbe. Csavarja le a kékszínű kupakot, és pipettázzon 10 µL székletmintát az eszközbe. Zárja le a CALEX® Cap eszközt, és hajtsa végre a vortexelő lépést az extrakciós módszerben leírt és ábrázolt eljárásnak megfelelően, amit a CALEX® Cap eszközzel szállított használati utasításban talál.

Fontos: Az extrakciót követően centrifugálja a CALEX® Cap eszközt 5 percig 500-3000 x g-n és folytassa a teszt kivitelezését.

**1.2 Az extraktumok tárolása**

A CALEX® Cap eszközzel előállított kivonatok eltarthatók szobahőmérsékleten (23 °C) tárolva 7 napig, 2-8 °C –on tárolva 15 napig. Hosszabb idejű tároláshoz fagyassza le a kivonatokat -20°C-on. A lefagyasztott kivonatok 23 hónapig tárolhatók.
A CALEX® Cap extraktumok közvetlenül lefagyaszthatók és tárolhatók a CALEX® Cap eszközben. A kivonatokat 4 fagyasztási-olvasztási ciklusnak vetheti alá. A vizsgálat előtt hagyja a kivonatokat szobahőfokra melegedni, vortexelje alaposan 10 mp-ig, majd centrifugálja 5 percig 500-3000 x g-n.

### 2. Egyéb extrakciós eszközök

**2.1 Extrakciós eljárások**

Kövesse az adott extrakciós eszközzel szállított használati utasításban leírtakat:

- Széklet extrakciós eszköz Roche (Kódszám 10745804322) vagy BÜHLMANN Smart-Prep (Kódszám: B-CAL-RD).

Fontos: BÜHLMANN Smart Prep használata után centrifugálja a csöveket 5 percig 3000 x g-vel. Alternatív megoldásként vigye át az elegyet egy 2 mL-es Eppendorf csőbe, majd centrifugálja mikrocentrifugában 5 percig 3000 x g-vel. Öntse le a felülúszót egy új, felcímkézett csőbe, és folytassa az eljárást.

**2.2 Az extraktumok tárolása**

A Smart-Prep eszközzel kinyert extraktumok eltarthatók 2-8 °C -on ≤7 napig, vagy -20 °C-on tárolva 36 hónapig.

### 3. Manuális extrakció

**3.1 Extrakciós eljárás**

1. Címkézzen fel, és mérjen meg egy üres polipropilén csövet oltókaccsal együtt. Írja fel a mért súlyt (tára).
2. Vegyen ki 50-100 mg székletmintát az oltókaccsal és tegye bele az előbb lemért csőbe, majd mérje le megint (összsúly). Kerülje el a mintabevitelnél a mintában lévő élelmi rostokat.
3. Számítsa ki a minta nettó mennyiségét az összsúlyból levont tárasúly művelettel, törje le az oltókacs tetejét, és hagyja az alsó részét a csőben.
4. Mérjen rá extrakciós puffert az alábbi formula szerint: x mg széklet x 49 = y µL extrakciós puffer (pl.50 mg széklet+ 2450 µL puffer) és zárja le a csövet.
5. Extrahálja a mintákat
   - Erőteljesen vortexelje a puffert és a székletmintát tartalmazó extrakciós csövet egy (többcsöves) rázón a legmagasabb fokozaton, 30 mp-ig.
   - Ezt követően inkubálja az extrakciós csövet 25 +/- 5 percig egy lemezrázón kb. 400 rpm-mel. Az oltókacs belül a keverést teszi hatékonyabbá.
   - Újra, erőteljesen vortexelje az extrakciós csövet 30 mp-ig.
6. Vigyen át 1,5 mL elegyet egy 2 mL-es Eppendorf csőbe, és centrifugálja mikrocentrifugában 5 percig 3000 x g-vel.
7. Öntse le a felülúszót egy új, felcímkézett csőbe, és folytassa a tesztet, vagy tárolja a kivonatokat (ld. extraktumok tárolása).

**3.2 Extraktumok tárolása**

A manuális extrakcióval kinyert Calprotectin kivonatok 2-8 °C-on ≤7 napig vagy -20 °C-on 36 hónapig tárolhatók.

## MÉRÉSI TARTOMÁNY

A teszt kivitelezhető az alábbi eljárások szerint: alacsony, vagy kiterjesztett tartományú ELISA módszerrel. A megfelelő módszert a várható Calprotectin koncentrációtól függően kell kiválasztani.

- 600 µg/g Calprotectin értékig várt mintáknál válassza az alacsony módszert (meghatározási tartomány: 10-600 µg/g).

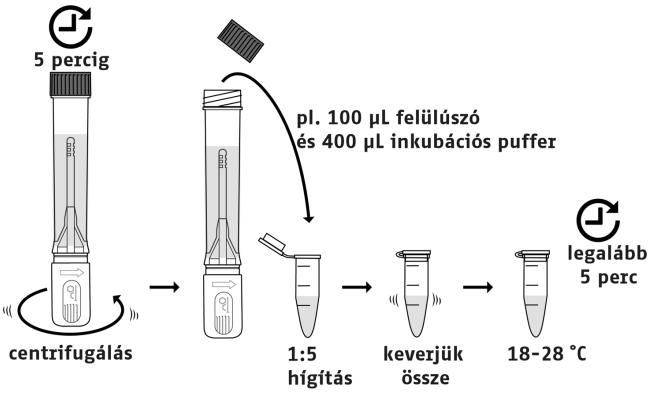
- Ha a minta értéke várhatóan meghaladja a 600 µg/g-ot, válassza a kiterjesztett módszert (meghatározási tartomány: 30-1800 µg/g).

## A MUNKA MENETE

Fontos: Hagyjon használat előtt legalább 30 perccel minden reagenst 18-28 °C-ra felmelegedni. Csak a székletkivonatokat hígítsa. A kalibrátorok és a kontrollok használatra készek.

**1. Mitahígítás 1:**
**Meghatározási tartomány 10-600 µg/g**

1.1. CALEX® Cap eszköz: Hígítsa a székletkivonatokat 1:5 arányban inkubációs pufferrel (pl: 100 µL extraktum és 400 µL inkubációs puffer), majd jól keverje el. Mielőtt folytatná a 4c lépéssel, hagyja a mintákat 5 percig 18-28 °C –on állni.

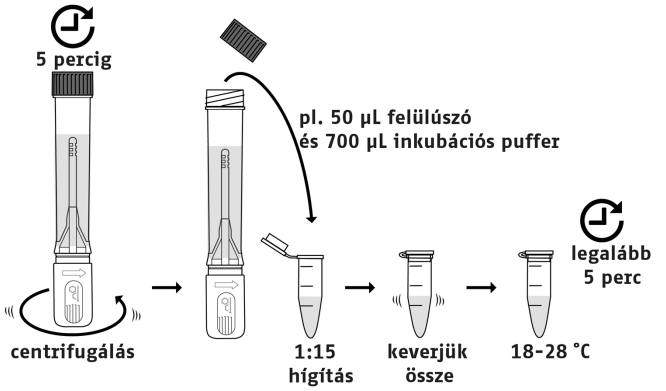



1.2. Manuális extrakció vagy Smart-Prep: Hígítsa meg a mintákat 1:50 arányban inkubációs pufferrel (pl. 20 µL kivonat és 2980 µL inkubációs puffer) és jól keverje el. Mielőtt folytatná a 4c lépést, hagyja a mintákat 5 percig 18-28 °C –on állni.

**1.` Mintahígítás 2:**
**Meghatározási tartomány 30-1800 µg/g**

A méréstartomány háromszorosra növelhető, ha a mintákat 1:7500 arányban hígítja az 1:2500 helyett. Ez a módszer javasolt, ha magas Calprotectin értékeket vár.

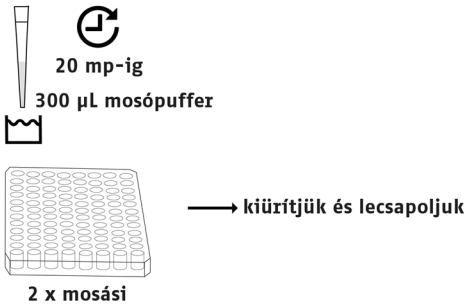
1.1` CALEX® Cap eszköz: Hígítsa a székletextraktumokat 1:15 arányban inkubációs pufferrel (pl. 50 µL extraktum és 700 µL inkubációs puffer) és jól keverje el. Mielőtt folytatná a 4c lépéssel, hagyja a mintákat 5 percig 18-28 °C-on állni.




1.2` Manuális extrakció vagy Smart-Prep: Hígítsa a székletkivonatot 1:150 arányban inkubációs pufferrel (pl. 20 µL extraktum és 980 µL inkubációs puffer), majd jól keverje el. Mielőtt folytatná a 4c lépéssel, hagyja a mintákat 5 percig 18-28 °C-on állni.

2. Készítse elő a lemezkeretet a szükséges számú lemezcsíkkal a teszthez, a kívánt számú kalibrátorhoz, kontrollhoz és a hígított mintákhoz. A maradék lemezcsíkot távolítsa el a keretből, és a szárítótasakokkal együtt zárja vissza haladék nélkül a fóliatasakba. Hűtőben tárolja.
3. Mossa a megkötött mélyedéseket kétszer legalább 300 µL mosópufferrel mélyedésenként. Ürítse ki a vályúkat, és ütögesse a keretet óvatosan egy szűrőpapírhoz.

Fontos: Hagyja a mosópuffert a vályúkban legalább 20 mp-ig minden mosási lépésnél.

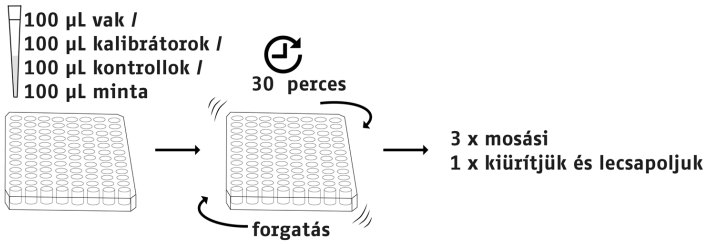



4a. Pipettázon 100 µL inkubációs puffert (Vak) és
Pipettázzon 100 µL A-E kalibrátort a megfelelő mélyedésbe.

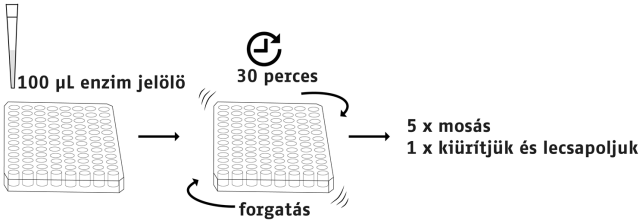
4b. Pipettázzon 100 µL alacsony, ill. magas kontrollt a megfelelő mélyedésbe.

4c. Pipettázzon 100 µL-t minden hígított mintából a további mélyedésekbe.

5. Fedje le a lemezt fedőfóliával, és inkubálja 30+max. 5 percig ~450 rpm-re beállított lemezrázón 18-28 °C –on (ld. gyakorlati előírások– ELISA módszer).
6. Távolítsa, és dobja el a fedőfóliát. Ürítse ki a mélyedéseket, és mossa ki 3-szor legalább 300 µL mosópufferrel vályúnként (ld gyakorlati előírások – ELISA módszer). Ürítse ki a mélyedéseket, és óvatosan ütögesse a keretet egy szűrőpapírhoz.

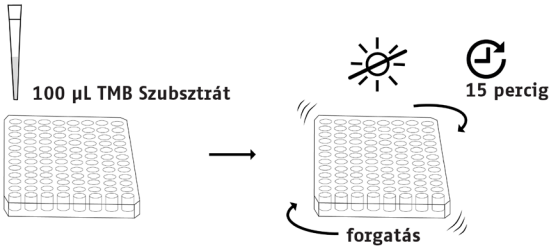



7. Pipettázzon 100 µL enzimjelölőt minden mélyedésbe.
8. Fedje le a lemezt fedőfóliával, és inkubálja 30+max. 5 percig ~450 rpm-re beállított lemezrázón 18-28 °C –on.
9. Távolítsa, és dobja el a fedőfóliát. Ürítse ki a mélyedéseket, és mossa ki 5x legalább 300 µL mosópufferrel mélyedésenként. Ürítse ki a mélyedéseket, és óvatosan ütögesse a keretet egy szűrőpapírhoz.

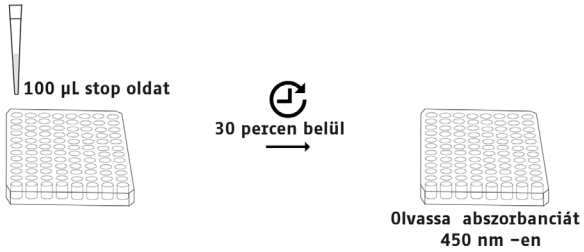


Fontos: Hagyja a TMB szubsztrát oldatot 18-28 °C-ra felmelegedni.

10. Pipettázzon 100 µL TMB szubsztrátot minden mélyedésbe.
11. Fedje le a lemezt fedőfóliával, direkt fénytől védve inkubálja 15 ±2 percig 18-28 °C.-on ~450 rpm-re beállított lemezrázón.




12. Pipettázzon 100 µL stopoldatot minden mélyedésbe. Távolítsa el a légbuborékokat egy pipettaheggyel. Végezze el a 13. lépést 30 percen belül.
13. Olvassa le az abszorbanciát lemezleolvasón, 450 nm –en.




## MINŐSÉGELLENŐRZÉS (QC)

A termék sikeres használatához a használati útmutató teljes megértése szükséges. Megbízható eredményeket kizárólag pontos laboratóriumi munkával, és a használati utasítás szigorú betartásával lehet elérni.

A BÜHLMANN fCAL® ELISA kitet két kontrollal: alacsony ill. magas kontrollal szállítják. A vonatkozó referencia értékek a kittel szállított QC adatlapon találhatók. A QC adatlapon szereplő értékek és tartományok mindig az adott kitre vonatkoznak, az eredmények direkt összehasonlítására szolgálnak. Ha az alacsony és/vagy magas kontrollértékek kívül esnek a QC adatlapon feltüntetetten, javasolt az egész futtatást érvénytelennek tekinteni.

Javasolt belső kontrollok használatát is beiktatni, a helyi és nemzeti szabályozásnak megfelelően. A belső kontrollok segítik az eredmények napról napra történő érvényességének megítélését. Mivel a széklet Calprotectinre nincs kereskedelmi forgalomban beszerezhető kontroll, érdemes normál és kóros székletminta kivonatokat gyűjteni belső kontrollok céljára.

A standardgörbe paramétereinek és a kontrollértékeknek a laboratóriumi elfogadhatóság határain belül kell lennie. Ha a teszt teljesítménye nem éri el a megadott határokat, és az ismétlés kizárta a technikai hibák lehetőségét, vizsgálja meg a következő tényezőket: i) pipettázás, hőmérséklet-, és időellenőrzés eszközei; ii) ELISA leolvasó beállításai; iii) a reagensek lejárati ideje; iv) tárolási és inkubációs feltételek; v) a TMB szubsztrát oldat színtelen-e; vi) a használt víz tisztasága; vii) leszívási és mosási módszerek.

## STANDARDIZÁCIÓ ÉS METROLÓGIAI NYOMONKÖVETHETŐSÉG

Nincsenek nemzetközi vagy nemzeti szinten elismert referenciaanyagok vagy referenciaeljárások a széklet Calprotectin analitra. A BÜHLMANN fCAL® ELISA kalibrátor értékeket humán szérumeredetű belső kontrollok többszöri bemérésével állapították meg BÜHLMANN fCAL® ELISA mérési módszerrel. A belső referencia anyag értékének megállapításához humán granulocytákból származó MRP8/14-et használtak elsődleges referenciaanyagként.
A termék kalibrátorainak kombinált bizonytalansági 95%-os elfogadhatósági tartományát 13,3 % alatti, míg a kontrollok együttes bizonytalansági értékét 16,4% alatti értékben határozták meg.

## EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

### Standard görbe

Javasolt olyan szoftver használata, amely képes az alábbi számítások elvégzésére: vonja le a Vak OD értékét minden kalibrátormélyedés esetében a kalibrátor értékének kiszámításához. Tudjon kalibrációs görbét felvenni 4 paraméteres (4 PL) illesztéssel.

### Kontrollok és minták

Javasolt olyan szoftver használata, amely képes az alábbi számítások elvégzésére: vonja le a Vak OD értékét minden kontroll/minta mélyedésnél. A kontroll /minta Calprotectin értékeit az adott görbéről µg/g-ban olvassa le.

### Méréstartomány 10-600 µg/g

Ha az alsó tartományban történő ELISA eljárást választja, a kalibrátor koncentrációkat a következő értékekre kell beállítani: 10, 30, 100, 300 és 600 µg/g Calprotectin. A további hígítási faktorokat (ha 1:2500-től eltérő hígítást alkalmaz) meg kell szorozni az eredményekkel a végső értékek eléréséhez.

Ld. 12. táblázat és 1. ábra a jellemző adatokért (eredmények és standard görbe). Ezek az eredmények, és a standard görbe csak szemléltetési célokat szolgál. Standardgörbét kell felvenni minden mintakészlet meghatározásához.

### Méréstartomány 30-1800 µg/g

Ha a kiterjesztett ELISA módszert alkalmazza, a következő névleges kalibrátor értékeket kell alkalmazni: 30, 90, 300, 900 és 1800 µg/g Calprotectin. A további hígítási faktorokat (ha 1:7500-től eltérő hígítást alkalmaz) meg kell szorozni az eredményekkel, hogy megkapja a végső értékeket.

Ld. 15. táblázat és 3. ábra a jellemző adatokért (eredmények és standard görbe). Ezek az eredmények, és a standard görbe csak szemléltetési célokat szolgál. Standardgörbét kell felvenni minden mintakészlet meghatározásához.

## A MÓDSZER KORLÁTAI

- BÜHLMANN fCAL® ELISA kitben szállított reagensek csak a humán székletben lévő Calprotectin értékek meghatározására használhatók.

- A vizsgálati eredményeket a beteg klinikai értékelésével és egyéb diagnosztikai eljárások eredményeivel együtt kell értelmezni.
- Az IBD betegség követésére legfeljebb 4 hetenként elvégzett többszöri Calprotectin szint mérés javasolt a beteg klinikai relapszusának legpontosabb előjelzésére (ld. 19-20).
- Az eredmények nem értékelhetők 4 év alatti gyermekek esetében, ha enyhén emelkedett Calprotectin értéket mutatnak. (ld. 21-24).
- Nemszteroid gyulladásgátlót (NSAID) kapó betegek némelyike emelkedett széklet Calprotectin értéket mutat.

## AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

### I. A szervi és a funkcionális emésztőszervi betegségek elkülönítése

Az besorolások a BÜHLMANN esettanulmányok adataira, és a BÜHLMANN ajánlásokra támaszkodnak. Minden teszteredményt a beteg rendelkezésre álló klinikai tünetével, kórtörténetével, egyéb klinikai és laboratóriumi módszerek eredményeivel együtt kell értékelni.

**Klinikai küszöbértékek**

Egy nemzetközi tanulmányból származó, 58 IBS-sel, és 131 IBD-vel diagnosztizált beteg klinikai mintájának eredményeit rendszerezték és írták le az adatokat a 4. táblázatban foglaltak szerint.

| Calprotectin koncentráció | Értelmezés | Követés |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normál | Nem |
| 80 – 160 µg/g | Szürkezóna/Határérték | Követés 4-6 héten belül |
| > 160 µg/g | Emelkedett | Szükség szerint ismétlendő |

Táblázat 4

**Calprotectin értékek 80 µg/g alatt**

A <80 µg/g Calprotectin értékű minta nem utal az emésztőrendszer gyulladásos megbetegedésére. Alacsony Calprotectin értékeket mutató betegek esetében valószínűleg nem szükséges invazív vizsgálatok elvégzése a gyulladásos okok feltárására.

**80 és 160 µg/g közé eső, vagy azzal megegyező Calprotectin értékek**

A 80 és 160 µg/g közé eső, vagy azzal megegyező, ún. szürke zónába sorolható Calprotectin értékek nem utalnak aktív gyulladásra, nem kívánnak azonnali követést invazív vizsgálattal. Ezzel együtt a gyulladás lehetősége nem zárható ki. A széklet Calprotectin értékének újbóli vizsgálata 4-6 hét múlva ajánlott, a gyulladás állapotának elbírálására.

**Calprotectin értékek 160 µg/g felett**

A 160 µg/g feletti széklet Calprotectin értékek neutrofil infiltrátumra engednek következtetni a gyomor-bél traktusban. Ez aktív gyulladásos megbetegedés jele lehet. Az átfogó klinikai diagnózis érdekében további szakértői eljárások bevonása szükséges.

**Klinikai vizsgálatok**

A BÜHLMANN fCAL® ELISA teszt azon képességét, hogy különbséget tud tenni az IBD-ben és az egyéb nem gyulladásos emésztőszervi megbetegedésben- beleértve az IBS-t is-szenvedő betegek között, egy klinikai vizsgálatban nézték meg, összesen 337 felnőtt, és gyermek páciensben. 135 betegnél a végső diagnózis IBD (Crohn betegség, ulceratív colitis, ill. nem meghatározott vastagbélgyulladás) volt, 130 beteg szenvedett IBD-ben, míg 72 betegnél jelentkezett hasi fájdalom, és/vagy hasmenés, vagy egyéb GI jellegű nemgyulladásos állapot (ld. 5. táblázat). A végső diagnózist endoszkópos és egyéb klinikai leletek is alátámasztották

A 80 µg/g tartalmú mintáknál 93,3%-os klinikai szenzitivitás, a 160 µg/g mintáknál 83,7% klinikai specificitás volt elérhető az IBD és a GI-szerű nem-gyulladásos (beleértve az IBS-t) kórképek közötti különbségtételben. A ROC görbe elemzés AUC 0,923 (ld. 6. táblázat) eredményt adott.

A 80 µg/g tartalmú mintáknál 93,3%-os klinikai szenzitivitás, a 160 µg/g mintáknál 85,4% klinikai specificitás volt elérhető az IBD és az IBS megkülönböztetésében. A ROC görbe elemzés AUC 0,933 (ld. 8. táblázat) értéket adott.

Ezen betegcsoportok optimális határérték kombinációja ROC analízissel határozható meg 80 µg/g és 160 µg/g Calprotectin értéknél, ami valamivel szigorúbb, mint az a kombináció, ahol az alsó cut-off **50 µg/g magas érzékenységgel,** specificitásban kevésbé teljesít, a **felső cut off 200 µg/g,** kicsit alacsonyabb szenzitivitással (ld. 7 és 9. táblázat).

### II. IBD monitorozás

**Klinikai küszöbértékek és értékelés**

A széklet Calprotectin meghatározás egy nagyon megbízható és egyszerű módszer az IBD betegek monitorozásának szolgálatában (ld. 7-18).
A Calprotectin szintek és a betegek bélnyálkahártya gyulladásának összefüggését endoszkópos vizsgálatok alapján három független tanulmányban határozták meg BÜHLMANN Calprotectin teszttel (10. táblázat). A Calprotectin diagnosztikai értékét a klinikai remisszió és relapszus előjelzésében, a beteg tünetei, klinikai aktivitás-mutatói, a nemtervezett klinikai eszkaláció, a kórházi kezelés vagy sürgősségi ellátás szükségessége alapján (11. táblázat).
A bemutatott eredménykategóriák ajánlások, megállapításuk a közzétett határértékek, és klinikai teljesítményvizsgálatok összesített ismeretén alapul. Javasolt, hogy az egészségügyi szakemberek betegenként egyéni küszöbértékeket határozzanak meg a beteg kiinduló értékének meghatározásával a betegség remissziója alatt.

**Calprotectin értékek 100 µg/g alatt**

A 100 µg/g alatti széklet Calprotectin szint megbízhatóan jelezheti a klinikai relapszus alacsony kockázatát mutató, endoszkópos remisszóban lévő betegeket, akiknél elkerülhető az invazív endoszkópos beavatkozás (ld. 7-18).

**Calprotectin értékek 100 és 300 µg/g között**

A széklet 100-300 µg/g közötti Calprotectin szintje a következő időszakban a kontroll fokozott szükségességét jelezheti a betegség fejlődési tendenciájának megítélése érdekében.

**Calprotectin értékek 300 µg/g felett**

300 µg/g feletti Calprotectin érték esetén a vizsgálatot meg kell ismételni, ha az emelkedett szint beigazolódik, azonnal további vizsgálati eljárásokat kell kezdeményezni (ld. 7-18).

## TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

A BÜHLMANN fCAL® ELISA teljesítményjellemzőit manuális extrakcióval határozták meg, ha ettől eltérő módszer nincs jelezve.

**Méréstartomány: 10 - 600 µg/g**

**Ismételhetőség: 1,9 – 8,0% CV**

**Laboratóriumon belüli pontosság: 5,5 – 14,0% CV**

Az ismételhetőséget és a laboratóriumon belüli pontosságot a CLSI EP05-A2 irányelve alapján határozták meg, 22 nap x 2 ismétléses vizsgálati terv alapján. Tíz extrahált székletmintát vizsgáltak az alábbi Calprotectin értékekek között:13,2 – 501,4 µg/g (13. táblázat).

**Kimutathatósági határ (LoD): 4,2 µg/g**

A LoD értékét a CLSI EP17-A ajánlása szerint határozták meg 240 meghatározás alapján, 80 vakpróbával (extrakciós puffer), 160 alacsony tartományban történt ismétléssel, amikor a téves pozitívak aránya (α) kevesebb, mint 5%, a téves negatívok (β) aránya kevesebb, mint 5%, az **LoB 0,29 µg/g** volt.

**Mennyiségi határ (LoQ): 9,8 µg/g**

Az LoQ meghatározása a laboratóriumon belüli pontossági vizsgálat során kapott adatok felhasználásával történt, benne egy további székletmintával, melynek koncentrációja 7,4 µg/g. Az LoQ-t úgy határozták meg, mint azt a Calprotectin koncentrációt, amelynél a teljes pontossági adatok nemlineáris illeszkedése metszi a CV 20% pontossági célt.

**Linearitás: 10 - 600 µg/g**

A BÜHLMANN fCAL® ELISA lineáris tartományát a CLSI EP06-A ajánlás alapján határozták meg. A linearitástól való megengedett legnagyobb eltérés ±20% volt. 75 µg/g alatti értékek esetén ±15 µg/g-nál kisebb abszolut különbség megengedett (14. táblázat).

**Pontosság/Visszanyerés**

**Teljes torzítás: -1,1%;**

**Egyezés alsó határa: -17,5%,**

**Egyezés felső határa: 15,4%**

Négy negatív székletmintát erősítettek fel szérummintákból származó emelkedő szintű Calprotectinnel. Az eredményeket a 2. ábrán találja.

**Nagydózisú hook effektus**

Elméletben a minták ~60’000 µg/g koncentrációig korlátozás nélkül vizsgálhatók.

**Meghatározási tartomány: 30 - 1800 µg/g**

**Ismételhetőség: 1,7 – 5,8% CV**

**Laboratóriumon belüli pontosság: 3,1 – 9,4% CV**

Az ismételhetőséget és a laboratóriumon belüli pontosságot a CLSI EP05-A3 irányelve alapján határozták meg, 10 nap x 2 futtatás x 4 ismétléses vizsgálati terv alapján. Hét poolozott székletextraktumot vizsgáltak 38,5 – 918,0 közötti Calprotectin koncentrációval (16.táblázat).

**Lot-ok közötti pontosság: 4,2 – 9,7% CV**

A lot-ok közötti pontosságot a CLSI EP05-A3 irányelve alapján határozták meg, 3 lot x 5 nap x 5 ismétléses vizsgálati terv, és egy véletlen hatások variakomponens modell alapján. Hat székletextraktumot vizsgáltak 46,4 – 1476,1 µg/g közötti Calprotectin tartalommal (17. táblázat)

**Reprodukálhatóság (Többhelyszínen végzett pontosságértékelési tanulmány) 6,4 – 19,0% CV**

A reprodukálhatóságot a CLSI EP05-A3 irányelve alapján határozták meg, 3 laboratóriumi helyszín x 2 kezelőszemély x 5 nap x 2 futás naponta x 4 párhuzamos vizsgálati terv alapján. Három reagens lot-ot használtak a tanulmányban. 5 poolozott székletextraktumot 42,1 – 1053,3 µg/g közötti Calprotectin koncentrációval (18. táblázat).

**Kimutathatósági határ (LoD): 12,6 µg/g**

A LoD értékét a CLSI EP17-A2 ajánlása szerint határozták meg 120 meghatározás alapján, 60 vakpróbával (extrakciós puffer), 60 alacsony tartományban történt ismétléssel, amikor a téves pozitívak aránya (α) kevesebb, mint 5%, a téves negatívok (β) aránya kevesebb, mint 5%, az **LoB 8,3 µg/g** volt.

**Mennyiségi határ (LoQ): 21,3 µg/g**

Az LoQ meghatározása a CLSI EP17-A2 irányelvei szerint, 60 meghatározás alapján történt, 20% CV pontossági céllal.

**Linearitás: 30 - 1800 µg/g**

A BÜHLMANN fCAL® ELISA lineáris tartományát a CLSI EP06-A ajánlás alapján határozták meg. A linearitástól való megengedett legnagyobb eltérés ±20% volt. 75 µg/g alatti értékek esetén ±15 µg/g-nál kisebb abszolút különbség megengedett (19. táblázat).

**Pontosság / Visszanyerés: 96,4 – 102,2%**

Hét 46,5 – 990,2 µg/g Calprotectinn koncentrációjú székletkivonatot erősítettek fel 180 µg/g Calprotectin kalibrátor anyaggal. A felerősítés a mintakivonat mennyiségének 10%-ánál történt. Az „alapvonal” mintákat megegyező mennyiségű inkubációs pufferrel egészítették ki. Az „alapvonal” és „alapvonal+ kiegészítés” mintákat három párhuzamos méréssel határozták meg (20. táblázat).

**Pre-analitika**

A BÜHLMANN fCAL® ELISA teljesítményjellemzőit a pre-analitikai eljárások vonatkozásában a 30 - 1800 µg/g méréstartományban határozták meg.

**Extrakció reprodukálhatósága – manuális extrakció: 9,5 – 20,5%**

Az extrakció reprodukálhatóságára a CLSI EP05-A3 irányelvei alapján, 10 extrakció x 2 párhuzamos vizsgálati modell alapján, 9 klinikai székletmintát szilárd, fél-szilárd, és folyékony halmazállapottal vizsgáltak 51,2 – 1783,7 µg/g közötti Calprotectin koncentrációval (21. táblázat).

**Extrakció reprodukálhatósága – CALEX® Cap: 7,9 – 16,9%**

Az extrakció reprodukálhatóságát a CLSI EP05-A3 irányelvei alapján 3 CALEX® Cap lot x 4 extrakció x 4 párhuzamos vizsgálati modell szerint vizsgálták. 5 klinikai

székletmintát szilárd, fél-szilárd, és folyékony halmazállapottal vizsgáltak 42,5 – 2949,9 µg/g közötti Calprotectin koncentrációval (22. táblázat).

**Módszerek összehasonlítása: CALEX® Cap vs. manuális extrakció**

**Torzítás 80 µg/g-nál: 5,9% (95% CI: 1,4 – 12,2%)**

**Torzítás 160 µg/g-nál: 12,0% (95% CI: 7,8 – 17,0%)**

**Torzítási átlag: 10,1% (95% CI: 5,7 – 14,5%)**

A módszerek összehasonlítása a CLSI EP09-A3 irányelve szerint történt. Kétszáznegyvenegy (241) klinikai mintát extraháltak egy gyártási számú CALEX® Cap eszközzel. A referencia értékeket manuális extrakciós módszerrel 30,5 – 1496,6 µg/g közötti végleges Calprotectin értékben határozták meg. A kivonatokat mindkét módszerrel egyetlen vizsgálatban mérték. A torzítás kiszámításához a Passing-Bablok lineáris regressziós, és a Bland-Altman analízis módszert használták (23-24. táblázat).

## INTERFERÁLÓ ANYAGOK

A BÜHLMANN fCAL® ELISA teszt orális gyógyszerekkel, táplálékkiegészítőkkel, hemoglobinnal, valamint enteropatológiai mikroorganizmusokkal szembeni érzékenységét a CLSI EP07-A2 irányelve szerint, kiterjesztett méréstartomány alkalmazásával értékelték. A 10%-ot meghaladó eredménytorzításokat interferenciaként értékelték. A 25. táblázatban felsorolt anyagokkal a feltüntetett koncentrációig nem észleltek interferenciát. Nem tapasztaltak interferenciát a 26. táblázatban felsorolt enteropatológiai mikroorganizmusokkal a székletminta kivonat ml-enkénti kolóniaképző egységek (CFU) feltüntetett mennyiségéig.

## TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK

### Klinikai vizsgálatok

### Klinikai vizsgálatok – az emésztőszervi organikus és funkcionális megbetegedések megkülönböztetése

| Záró diagnózis | A betegeredmények megoszlása számokban (%) a BÜHLMANN fCal® ELISA diagnosztikai besoroláson belül | | | |
|---|---|---|---|---|
| | < 80 µg/g | 80 - 160 µg/g | > 160 µg/g | Összes |
| IBD | 9 (6,7%) | 12 (8,9%) | 114 (84,4%) | 135 (100%) |
| IBS | 94 (72,3%) | 17 (13,1%) | 19 (14,6%) | 130 (100%) |
| Egyéb GI | 48 (66,7%) | 10 (13,9%) | 14 (19,4%) | 72 (100%) |

5. táblázat

| IBD vs. non-IBD | Klinikai döntési pont | |
|---|---|---|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Szenzitivitás (95% CI) | 93,3% (87,7%, 96,9%) | 84,4% (77,2%, 90,1%) |
| Specificitás (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) | |

6. táblázat

| IBD vs. non-IBD | Klinikai döntési pont | |
|---|---|---|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Szenzitivitás (95% CI) | 96,3% (91,6%, 98,8%) | 80,7% (73,1%, 87,0%) |
| Specificitás (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%) |

7. táblázat

| IBD vs. IBS | Klinikai döntési pont | |
|---|---|---|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Szenzitivitás (95% CI) | 93,3% (87,7%, 96,9%) | 84,4% (77,2%, 90,1%) |
| Specificitás (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) | |

8. táblázat

| IBD vs. IBS | Klinikai döntési pont | |
|---|---|---|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Szenzitivitás (95% CI) | 96,3% (91,6%, 98,8%) | 80,7% (73,1%, 87,0%) |
| Specificitás (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%) |

9. táblázat

nem-IBD – IBS + egyéb GI
CI – megbízhatósági tartomány
PPV – pozitív prediktív érték
NPV – negatív prediktív érték
ROC AUC – a vételi működési jelleggörbe alatti terület

### Klinikai vizsgálat– IBD monitorozás

| Calprotectin[1] vs IBD aktivitás endoszkópos eredmények alapján | Tanulmány 1 Spanyolország (Id. 9) | Tanulmány 2 Spanyolország (Id. 10) | Tanulmány 3 Ausztrália, Új Zéland (Id.11) |
|---|---|---|---|
| Betegszám és demográfiai adatok | 89 (CD[2])<br>Kor: 32-58<br>44% férfi | 123 (UC[3])<br>Kor: 18-85<br>66,4% férfi | 99 (CD[2] rezekció után)<br>Kor: 29-47<br>46,5% férfi |
| Cut-off | 272 µg/g | 280 µg/g | 100 µg/g |
| NPV | 98% | 86% | 91% |
| PPV | 76% | 80,3% | 53% |

10. táblázat

[1] Tanulmány 1 & 2 – Quantum Blue® fCal és Quantum Blue® fCal high range
Tanulmány 3 – BÜHLMANN fCal® ELISA
[2] CD = Crohn`s betegek
[3] UC = Ulceratív kolitiszes betegek

### Klinikai tanulmány – IBD monitorozás

| Calprotectin[1] vs jövőbéli klinikai remisszió vagy relapszus | Tanulmány 4 UK (Id. 12) | Tanulmány 5 Spanyolország (Id. 13) | Tanulmány 6 Spanyolország (Id. 14) |
|---|---|---|---|
| Betegszám és demográfiai adatok | 92 (CD[2])<br>38% férfi | 30 (CD[2])<br>adalimumab terápia<br>Kor: 24-64<br>43,3% férfi | 33 (CD[2])<br>20 (UC[3])<br>infliximab terápia<br>Kor: 18-68<br>47,2% férfi |
| Követési idő Calprotectin mérés után | 12 hónap | 4 hónap | 12 hónap |
| Betegek klinikai relapszusban a követés után | 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% |

11. táblázat

[1] Tanulmány 4 – BÜHLMANN fCal® ELISA
Tanulmány 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL és Quantum Blue® fCAL high range
[2] CD = Crohn`s betegek
[3] UC = Ulceratív kolitiszes betegek

# TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK

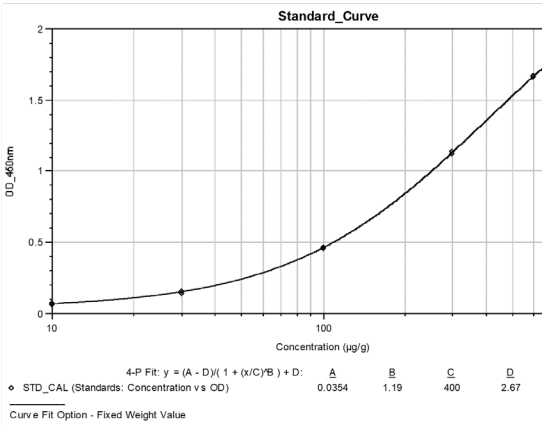
## ALSÓ MÉRÉSTARTOMÁNY 10-600 µg/g

### Eredménypéldák

| | Konc. [µg/g] | Absorb. [OD] | Kalk. Konc. [µg/g] | CV Konc [%] |
|---|---|---|---|---|
| **Vak átlagérték** | | **0,096** | | |
| KAL A | 10 | 0,073 | | |
| KAL A | 10 | 0,066 | | |
| **KAL A átlag** | **10** | **0,069** | | **7,2** |
| KAL B | 30 | 0,143 | | |
| KAL B | 30 | 0,153 | | |
| **KAL B átlag** | **30** | **0,148** | | **4,8** |
| KAL C | 100 | 0,465 | | |
| KAL C | 100 | 0,456 | | |
| **KAL C átlag** | **100** | **0,460** | | **1,4** |
| KAL D | 300 | 1,121 | | |
| KAL D | 300 | 1,135 | | |
| **KAL D átlag** | **300** | **1,128** | | **0,9** |
| KAL E | 600 | 1,658 | | |
| KAL E | 600 | 1,671 | | |
| **KAL E átlag** | **600** | **1,664** | | **0,6** |
| Ktrl alacsony | | 0,201 | 41 | |
| Ktrl alacsony | | 0,189 | 39 | |
| **Ktrl alacsony átlag** | | **0,195** | **40** | **4,4** |
| Ktrl magas | | 0,598 | 134 | |
| Ktrl magas | | 0,583 | 130 | |
| **Ktrl magas átlag** | | **0,590** | **132** | **1,8** |

12. táblázat

### Standardgörbe példa




1. ábra

### Laboratóriumon belüli pontosság

| Minta sorszám | n | Átlag [µg/g] | Ismételhetőség | | Napok között | | Pontosság összes | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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% |

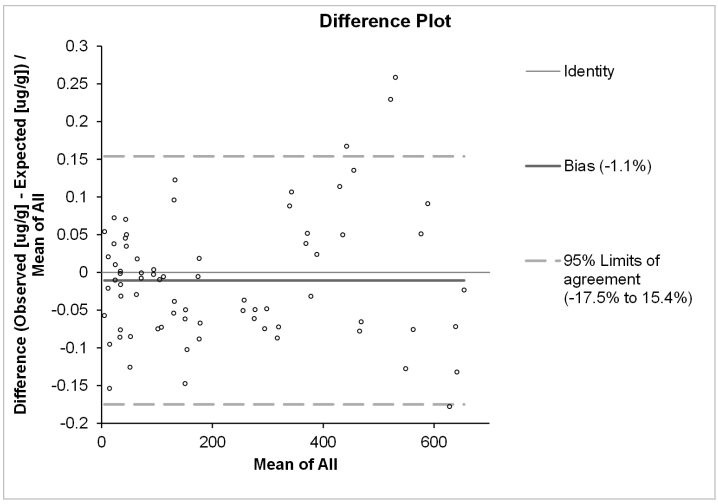
13. táblázat

### Linearitás

| Azonosító | Vizsgált tartomány | $R^2$ | p-érték a nem-lineáris együtthatóhoz | Lineáris tartomány |
|---|---|---|---|---|
| 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 |

14. tálázat

### Felerősítés visszanyerése




2. ábra

# TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK

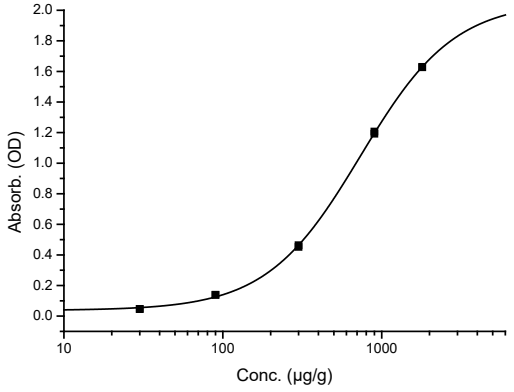
## Kiterjesztett méréstartomány 30-1800 µg/g

### Mintapéldák

| | Koncentráció [µg/g] | Abszorbció [OD] |
|---|---|---|
| Kalibrátor A | 30<br>30 | 0,047<br>0,046 |
| Kalibrátor B | 90<br>90 | 0,138<br>0,140 |
| Kalibrátor C | 300<br>300 | 0,464<br>0,452 |
| Kalibrátor D | 900<br>900 | 1,207<br>1,192 |
| Kalibrátor E | 1800<br>1800 | 1,627<br>1,630 |
| Vak átlagérték | | 0,057 |
| | | |
| Alacsony kontroll | | 0,147<br>0,162 |
| Magas kontroll | | 0,618<br>0,618 |

15. táblázat

### Standardgörbe minta




3. ábra

### Laboratóriumon belüli pontosság

| ID | Átlag [µg/g] | á | Ismételhető-ség | | Futtatáson belül | | Napon belül | | Laboratóriu-mon belül | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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% |

16. táblázat

### Lot-ok közötti pontosság

| ID | Átlag [µg/g] | n | Futások között | | Napok között | | Lot-ok között | | Összesen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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% |

17. táblázat

### Reprodukálhatóság – többhelyszínes pontosságértékelési tanulmány

| ID | Átlag [µg/g] | n | Operátorok közt | | Helyszínek között | | Össz (Reprodukálhatóság) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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% |

18. táblázat

### Linearitás

| ID | Vizsgált méréstartomány [µg/g] | $R^2$ | p-érték a nemlineáris együttható hoz | Lineáris tartomány [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 |

19. táblázat

### Pontosság/Visszanyerés

| ID | Alapvonal átlagérték [µg/g] | Elvárt alapvonal felerősítés [µg/g] | Kapott alapvonal + felerősítés [µg/g] | Visszanyerés mértéke [%] |
|---|---|---|---|---|
| #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% |

20. táblázat

## TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK

## TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK/PREANALITIKA

### Extrakció reprodukálhatósága- manuális súlyméréses extrakcióval

| ID | Középérték [µg/g] | n | Extrakción belül | | Extrakciók között | | Össz-pontosság | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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% |

21. táblázat

### Extrakció reprodukálhatósága – CALEX® Cap

| ID | Középérték [µg/g] | n | | Extrakción belül | | Extrakciók között | | Össz-pontosság | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SD | SD | %CV | SD | SD | %CV | SD | SD |
| 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% |

22. táblázat

### Módszerösszehasonlítás – CALEX® Cap és manuális extrakció

| Bland-Altman Analízis | | |
|---|---|---|
| Torzítási átlag (95%) | Alsó LoA (95% CI) | Felső LoA (95% CI) |
| 10,1% (5,7%, 14,5%) | -47,4% (-54,9%, -39,8%) | 67,5% (60,1%, 75,1%) |

23. táblázat

| Passing-Bablok Regressziós Analízis | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Meredekség (95% CI) | Metszéspont (µg/g) (95% CI) | Torzítás 80 µg/g-nál (95% CI) | Torzítás 160 µg/g-nál (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 |

24. táblázat

## INTERFERÁLÓ ANYAGOK

### Szájon át szedett gyógyszerek, táplálékkiegészítők, és a hemoglobin

| Kereskedelmi név | Aktív komponens | Koncentráció mg/50 mg széklet |
|---|---|---|
| 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 probiotics (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 |

25. táblázat

### Enteropatológiás microorganizmusok

| Megnevezés | Végső koncentráció (CFU/mL széklетextraktum) |
|---|---|
| *Escherichia coli* | $9,5 \times 10^7$ |
| *Salmonella enterica subsp. enterica* | $1 \times 10^9$ |
| *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* | $1,6 \times 10^8$ |

26. táblázat

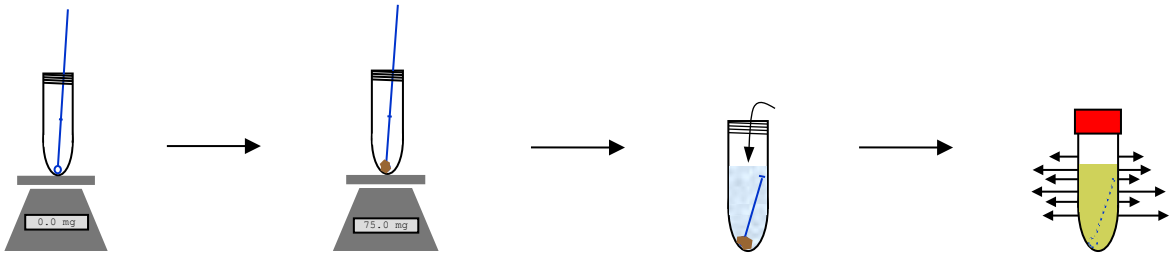
## REFERENCIÁK


1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faeKAL 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 feKAL 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 cliniKAL application of faeKAL 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 feKAL 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: feKAL 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 feKAL 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 feKAL Calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of feKAL 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 faeKAL Calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreiro-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faeKAL 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.: *FeKAL 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.: *FeKAL Level of Calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis in CliniKAL and Endoscopic Remission.* CliniKAL Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasson A et al.: *PharmacologiKAL intervention based on feKAL 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 feKAL 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 FeKAL 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 feKAL 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 feKAL Calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *FeKAL Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months.* PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *FeKAL 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 CliniKAL and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

## RÖVID LEÍRÁS

# CALPROTECTIN EXTRAKCIÓ

**Manuális extrakciós eljárás**

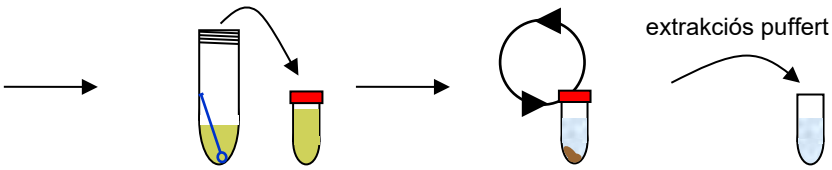



Üres cső +oltókacs előmérése

Mérjen ki 50-100 mg székletet

Adjon hozzá 49 egységnyi B-CAL-EX extrakciós puffert

Zárja le a csövet
Vortexelje 30 mp-ig
Inkubálja 25±5 percig 400 rpm-re beállított rázón
Vortexelje 30 sec-ig



Vigyen át ~1,5 mL-t egy új csőbe

Centrifugálja 5 percig 3000 x g-vel

Öntse le a felülúszót egy új csőbe, és folytassa a munkát az ELISA módszerrel.

## RÖVID TESZTLEÍRÁS

# CALPROTECTIN ELISA

**Előre bevont microtiter lemez**

*mossa 2x ≥300 µL mosópufferrel*

**100 µL inkubációs puffer, kalibrátor, kontroll, vagy hígított minta**

*inkubálja 30 (+ 5) percig*
*18-28 °C-on ~450 rpm-ra beállított lemezrázón*

*mossa 3x ≥300 µL mosópufferrel r*

**adjon hozzá 100 µL enzimjelölőt**

*inkubálja 30 +/-5 percig*
*18-28 °C-on ~450 rpm-ra beállított lemezrázón*

***mossa 5x*** *≥300 µL mosópufferrel*

**adjon hozzá 100 µL TMB szubsztrát oldatot**

*inkubálja 15 +/-2 percig*
*18-28 °C-on ~450 rpm-ra beállított lemezrázón*

**adjon hozzá 100 µL stop oldatot**

**Olvassa le az abszorbanciát 450 nm-en (30 percen belül)**

VIZSGÁLATI IDŐ: 75 PERC

## VÁLTOZÁS NAPLÓZÁSA

| Dátum | Verziószám | Változás |
|---|---|---|
| 2022-11-16 | A3 | Frissítés a *Figyelmeztetések és óvintézkedések* bekezdésben: a kalibrátor bizonytalansági értékeinek beillesztése a belső szabványosítás indoklása a *Standardizáció* bekezdésben<br>A megfogalmazás frissítése a *Működési jellemzők* bekezdésben<br>*Szimbólumok* fejezet átdolgozása<br>Új betegtájékotzató<br>A bejelentett szervezet számának beillesztése a CE jelöléshez-megfelelőségértékelési eljárás az IVDR 2017/746 szerint. |

## ESEMÉNYJELENTÉS EU ORSZÁGOKBAN

Amennyiben bármilyen komoly in incidens merül fel ezzel az eszközzel szemben, késedelem nélkül jelentse a gyártónak és az Ön tagországában illetékes kompetens hatóságnak.

## SZÁLLÍTÁSI KÁR

Kérjük,hogy jelezze beszállítójának, ha a termék sérülten érkezett.

## SZIMBÓLUMOK

A BÜHLMANN az ISO 15223-1 szabványban felsorolt és leírt szimbólumokat és jeleket használja. Ezenkívül a következő szimbólumok és jelek használatosak:

| **Szimbólum** | **Jelentése** |
|---|---|
| MP | Microtiter lemez |
| BUF EX | Extrakciós puffer |
| BUF WASH 10X | Mosópuffer koncentrátum (10x) |
| BUF INC | Inkubációs puffer |
| CAL A - CAL E | Kalibrátor A -E |
| CONTROL L | Magas kontroll |
| CONTROL H | Enzimjelölő |
| EL | TMB szubsztrát |
| SUBS TMB | Stop oldat |
| SOLN STOP | Magas kontroll |

A kit bizonyos részei szabadalommal védettek EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

CE 0123