

BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Kalprotektin ELISA

För *in vitro*-diagnostik

EK-CAL 96 tester

EK-CAL 192 tester

Utgivningsdatum: 2022-11-16
Version A3

AVSEDD ANVÄNDNING

BÜHLMANN fCAL® ELISA är ett *in vitro*-diagnostiskt test för kvantitativ bestämning av kalprotektin i humana avföringsprover avsett som ett hjälpmedel vid utredning av inflammation i tarmslemhinnan. Resultaten kan användas som ett diagnostiskt hjälpmedel för att särskilja organisk, inflammatorisk sjukdom i mag-tarmkanalen (inflammatorisk tarmsjukdom, IBD, i synnerhet Crohns sjukdom eller ulcerös kolit, UC) från funktionell sjukdom (irritabel tarm, IBS) (ref. 1-7), hos patienter med kronisk buksmärt och som ett hjälpmedel för att övervaka inflammatorisk tarmsjukdom (ref. 7-18).

Endast för användning på laboratorium.

ANALYSPRINCIP

BÜHLMANN fCAL® ELISA gör det möjligt att selektivt mäta kalprotektin i avföringsextrakt med sandwich-ELISA. Mikrotiterplattan till BÜHLMANN fCAL® ELISA är coatad med en monoklonal fångande antikropp (mAb) med hög specificitet för kalprotektins heterodimeriska och polymeriska komplex. Extrakt ur patientens avföringprov, kontroller för bestämning av ELISA-körningens godtagbarhet och kalibratorer laddas i brunnarna på mikrotiterplattan. Efter 30 minuters inkubation i rumstemperatur och genomgångna tvättningssteg påvisas kalprotektinmolekyler bundna till fångande antikroppar på plattan med hjälp av en detekterande antikropp (Ab) konjugerad med pepparrotsperoxidas (HRP). Efter inkubation och ytterligare tvättningssteg tillsätts det kromogena HRP-substratet tetrametylbenzidin (TMB) (ger en blå färg) följt av en stoppreaktion (färgen ändras till gult). Absorption uppmäts vid 450 nm. Den slutliga kalprotektinkoncentrationen i µg/g avföring i patientproverna bestäms med hjälp av kalibreringskurvan genererad från de uppmätta kalibratorvärdena.

MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH FÖRBEREDELSE

Reagenser	Mängd		Kod	Rekonstituering
	EK-CAL	EK-CAL2		
Extraktionsbuffert	3 flaskor x 125 mL	6 flaskor x 125 mL	B-CAL-EX	Bruksfärdig
Mikrotiterplatta förbehandlad med anti-kalprotektin-mAb.	12 x 8 brunnar i en strip med ram	2 x 12 x 8 brunnar i en strip med ram	B-CAL-MP	Bruksfärdig
Plattförseglare	3 delar	6 delar	-	Bruksfärdig
Tvättbuffert-koncentrat (10x) med konserveringsmedel	1 flaska x 100 mL	2 flaskor x 100 mL	B-CAL-WB	Späd vardera med 900 mL avjoniserat H ₂ O
Inkubationsbuffert med konserveringsmedel	2 flaskor x 125 mL	3 flaskor x 125 mL	B-CAL-IB	Bruksfärdig
Kalibratorer A till E^{1) 2)} Kalprotektin från serum i en	5 flaskor x 1 mL	5 flaskor x 1 mL	B-CAL-CASET	Bruksfärdig

Reagenser	Mängd		Kod	Rekonstituering
	EK-CAL	EK-CAL2		
buffertmatris med konserveringsmedel				
Kontroll låg/hög³⁾ Serumframställt kalprotektin i en buffertmatris med konserveringsmedel	2 flaskor x 1 mL	2 flaskor x 1 mL	B-CAL-CONSET	Bruksfärdig
Enzymmärkning Anti-kalprotektin-Ab konjugerat till HRP	1 flaska x 12 mL	2 flaskor x 12 mL	B-CAL-EL	Bruksfärdig
TMB-substrat TMB i citratbuffert	1 flaska x 12 mL	2 flaskor x 12 mL	B-TMB12	Bruksfärdig
Stopplösning 0,25 M svavelsyra	1 flaska x 12 mL	2 flaskor x 12 mL	B-ST512	Bruksfärdig Frätande ämne

Tabell 1

- Den faktiska kalprotektinkoncentrationen för kalibrator A till E är 4, 12, 40, 120 respektive 240 ng/mL. För ELISA-proceduren för det lägre mätområdet måste kalibratorvärdena ställas in på: 10, 30, 100, 300 och 600 µg/g kalprotektin. Detta motsvarar den slutliga provspädningen på 1:2500 för ELISA-proceduren med ett lägre mätområde.
- Om du väljer det utökade mätområdet för ELISA-proceduren måste de nominella kalibratorvärdena ställas in som: 30, 90, 300, 900 och 1800 µg/g kalprotektin. Detta motsvarar den slutliga provspädningen på 1:7500 för ELISA-proceduren med utökat mätområde.
- Kontrollerna innehåller lot-specifika mängder rent humant kalprotektin. Läs det separata databladet om kvalitetskontroll (QC) för faktiska koncentrationer.

FÖRVARING AV OCH STABILITET FÖR REAGENSER OCH ARBETSLÖSNINGAR

Förslutna/öppnade reagenser	
Förvara vid 2-8 °C. Använd inte reagenser efter utgångsdatumet som anges på etiketten.	
Öppnade/rekonstituerade reagenser	
Extraktionsbuffert	Förvara i upp till 6 månader vid 2-8 °C.
Mikrotiterplatta	Lägg tillbaka oanvända strips omedelbart i foliepåsen med torkmedel och förseгла på nytt längs hela zipförslutningen. Förvara i upp till 6 månader vid 2-8 °C.
Utspädd tvättbuffert	Förvara i upp till 6 månader vid 2-8 °C.
Inkubationsbuffert	
Kalibratorer	
Kontroller	
Enzymmärkning	
TMB-substrat	
Stopplösning	

Tabell 2

REAGENSER OCH MEDFÖLJANDE TILLÄGGSMATERIAL

Utrustning för extraktion ur avföringsprover

Utrustning för extraktion ur avföringsprover som redovisas i tabell 3 medföljer inte kitet. Vald extraktionsutrustning måste beställas separat.

Extraktions- utrustning	Mängd	Kod
CALEX® Cap	Förpackningar med 50, 200 eller 500 rör, fyllda med 5 mL extraktionsbuffert vardera, finns tillgängliga. Bruksfärdig produkt	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 rör, spatlar och bottenlock	B-CAL-RD

Tabell 3

ERFORDERLIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER

Extraktionsprocedur

- 100 µL- och 1000 µL-precisionspipetter med engångsspetsar
- Polystyren- eller polypropenrör för engångsbruk för överföring av extrakt (tillval)
- Laminärflödesbänk
- Vortexblandare för flera rör/vortexblandare
- Mikrocentrifug (≥ 3000 × g)
- Centrifug (≥ 500 × g)
- Extraktionsutrustning (se tabell 3 ovan) eller för den manuella extraktionsproceduren:
 - 10 µL provtagningspinnar för engångsbruk
 - 15 mL polypropenrör med skruvlock
 - Precisionsväg (10-200 mg)

ELISA-procedur

- 10 µL-, 100 µL- och 1000 µL-precisionspipetter med engångsspetsar
- Polystyren- eller polypropenrör för engångsbruk för beredning av utspädda prover
- 1000 mL-cylinder för spädning av tvättbufferten
- Platt-tvätt för mikrotiterplatta (se tekniska försiktighetsåtgärder) eller klämflaska för tvättbuffert
- Skak för mikrotiterplatta (se tekniska försiktighetsåtgärder)
- Läskapper
- Avläsare för mikrotiterplatta för mätning av absorbans vid 450 nm

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Kitets kalibratorer och kontroller innehåller komponenter av humant ursprung. Även om reagenserna har testats och befunnits negativa för antikroppar mot HBV-ytantigen, HCV och HIV1/2, ska de hanteras som potentiellt smittförande i enlighet med god laboratorised (GLP) och gällande försiktighetsåtgärder.
- Detta kit innehåller komponenter klassificerade enligt rådets förordning (EG) nr 1272/2008: 2-metyl-4-isotiazolin-3-on, hydroklorid (konc. ≥ 0,0015%). Reagenserna kan därmed orsaka allergisk hudreaktion (H317).

Svavelsyra (konc. ≥ 2,5 - < 5%). Reagenserna kan därmed irritera huden (H315) och orsaka allvarlig ögonirritation (H319).

- Undvik att reagenser kommer i kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Vid kontakt, tvätta omedelbart med rikliga mängder vatten för att undvika irritation/brännskador.
- Reagenser och kemikalier måste hanteras som farligt avfall i enlighet med nationella riktlinjer eller bestämmelser om smittförande avfall.

Tekniska försiktighetsåtgärder

Kittets komponenter

- Restmängder i mikrotiterplattan uppstår till följd av produktionsprocessen. De avlägsnas i tvättsteget (steg 3 i analysproceduren) och påverkar inte resultaten.
- Komponenter får inte användas efter det utgångsdatum som anges på etiketterna.
- Blanda inte komponenter från kit med olika lotnummer.
- Alla ansträngningar ska göras för att säkerställa att ingen korskontaminering förekommer mellan reagenser, prover eller mellan brunnar.
- Låt reagenserna uppnå rumstemperatur. Blanda (med vortex) reagenserna väl före användning.
- Mikrobrunnar får ej återanvändas.

Manuell extraktionsprocedur

- För att uppnå kvantitativa resultat är det viktigt att det tillsatta avföringsprovet homogeniseras fullständigt i extraktionsbufferten. Kontamineringar i den övre delen av extraktionsröret ska undvikas. Små mängder av olösliga partiklar kan finnas kvar efter blandning.

ELISA-procedur

- Under ELISA-proceduren är tvättstegen avgörande för att garantera reproducerbara resultat. Låt tvättbufferten inkubera i brunnarna i minst 20 sekunder innan den tas bort.
- Vid användning av en automatisk platt-tvätt rekommenderas "plattläge" starkt, dvs. att varje steg i processen (dispensering/aspiration) utförs på alla stripsen i ordningsföljd innan instrumentet fortsätter till nästa tvättcykel. På så sätt garanteras minsta möjliga inkubationstid.
- De angivna antalet tvättcykler är obligatoriskt för att säkerställa reproducerbara resultat.
- Skakplattan måste justeras till cirka 450 rpm (7,5 Hz). Högre rotationsfrekvens kan orsaka undermålig linjär utspädning vid värden mellan 300/900 and 600/1800 µg/g. En roterande rörelse ska användas snarare än en horisontell rörelse.
- För att säkerställa att antigen/antikropsreaktionen är fullbordad måste inkubationstiden i steg 5 vara minst 30 minuter. Något längre inkubationstider (upp till 5 minuter) har ingen påverkan på det slutliga resultatet.
- Enzymmärkningen inaktiveras av syre och är mycket känslig för natriumazid, tiomersal, hypoklorsyra och aromatiska klorerade kolväten, vilka ofta finns i

vattenförsörjningen i ett laboratorium. Endast avjoniserat vatten av hög kvalitet får därför användas.

- En ny standardkurva måste skapas varje gång analysen genomförs (på varje platta eller partiell platta).
- Om den initiala koncentrationen av ett okänt prov är högre än koncentrationen för den högsta kalibratören, kalibrator E, kan provet spädas ytterligare med inkubationsbuffert och analyseras på nytt enligt analysproceduren. Den resulterande totala spädningsfaktorn måste tas med vid beräkning av resultaten.

INSAMLING OCH FÖRVARING AV PROVER

För extraktionsprocessen krävs mindre än 1 g ursprungligt avföringsprov. Avföringsprov samlas in i vanliga rör.

Viktigt: Provet måste samlas in utan några kemiska eller biologiska tillsatser.

Transport av prover

Avföringsprover ska tas emot för bearbetning på laboratoriet inom 3 dagar efter provtagning. Proverna kan transporteras vid rumstemperatur eller kylida.

Förvaring av prover

Avföringsprover ska förvaras i kylskåp vid 2-8 °C och extraheras inom 3 dagar efter att de tagits emot av laboratoriet. Förvara inte prover vid höga temperaturer.

EXTRAKTION AV AVFÖRINGSPROV OCH EXTRAKTETS STABILITET

1. CALEX® Cap

1.1 Extraktionsprocedur

Följ bruksanvisningen som medföljer CALEX® Cap-röret (kod B-CALEX-C50/B-CALEX-C200/B-CALEX-C500).

CALEX® Cap-rör: Flytande avföringsprover kan pipetteras direkt till CALEX® Cap-röret. Skruva av det blå locket och pipettera 10 µL avföringsprov till röret. Sätt tillbaka CALEX® Cap-röret och gå vidare till vortexsteget enligt extraktionsproceduren som beskrivs och illustreras i bruksanvisningen som medföljer CALEX® Cap-röret.

Viktigt: Efter extraktion, centrifugera CALEX® Cap-röret i 5 minuter vid 500-3000 × g och fortsätt med analysproceduren.

1.2 Förvaring av extrakt

F-kalprotektinextrakt erhållna med utrustningen CALEX® Cap är stabila vid rumstemperatur (23 °C) i 7 dagar och vid 2-8 °C i upp till 15 dagar. För längre förvaring, frys extrakt vid -20 °C. Frysta extrakt är stabila i upp till 23 månader.

CALEX® Cap-extrakt kan frysas direkt och förvaras i CALEX® Cap-röret. Extrakt kan utsättas för fyra nedfrysning-upptiningcykler. Före mätning, låt frysta extrakt uppnå rumstemperatur, vortexblanda noga i 10 sekunder och centrifugera i 5 minuter vid 500-3000 × g.

2. Andra extraktionsenheter

2.1 Extraktionsprocedurer

Följ bruksanvisningen som medföljer respektive extraktionsenhet:

- Utrustning för extraktion ur avföringsprover Roche (kod 10745804322) eller BÜHLMANN Smart-Prep (kod: B-CAL-RD).

Viktigt: Efter extraktion med BÜHLMANN Smart Prep centrifugera rören i 5 minuter vid 3000 × g. Alternativt kan homogenatet överföras till ett 2 mL Eppendorfrör och centrifugeras i en mikrocentrifug i 5 minuter vid 3000 × g. Dekantera supernatanten i ett nytt, rent, märkt rör och fortsätt med analysproceduren.

2.2 Förvaring av extrakt

F-kalprotektinextrakt erhållna med Smart-Prep är stabila vid 2-8 °C i ≤ 7 dagar eller vid -20 °C i 36 månader.

3. Manuell extraktion

3.1 Extraktionsprocedur

1. Märk och väg det tomma polypropenröret tillsammans med provtagningspinnen. Anteckna vikten (egenvikt).
2. Ta ut 50-100 mg av avföringsprovet med hjälp av pinnen och sätt in den i det redan vägda röret och väg på nytt (bruttovikt). Undvik att ta upp kostfiber som finns i provet under provtagningsprocessen.
3. Beräkna provets nettomängd genom att subtrahera egenvikten från bruttovikten, bryt av pinnen och lämna kvar den nedre delen av pinnen i röret.
4. Tillsätt extraktionsbuffert enligt formeln
 $X \text{ mg avföring} \times 49 = Y \text{ µL extraktionsbuffert}$ (t.ex. 50 mg avföring + 2450 µL buffert) till röret och stäng röret.
5. Extrahera proverna genom att
 - Vortexblanda extraktionsröret innehållande buffert och avföringsprov kraftigt på en (multi-rör)-vortexblandare (på högsta hastighet) i 30 sekunder.
 - Inkubera därefter extraktionsröret i 25 ± 5 minuter på en skakplatta vid cirka 400 rpm. Pinnen inuti röret förstärker skakningen,
 - Vortexblanda på nytt extraktionsröret kraftigt i 30 sekunder.
6. Överför 1,5 mL av homogenat till ett 2 mL Eppendorfrör och centrifugera i en mikrocentrifug i 5 minuter vid 3000 × g.
7. Dekantera supernatanten i ett nytt, rent, märkt rör och fortsätt med analysproceduren eller placera extrakt i förvaring (läs avsnittet om förvaring av extrakt).

3.2 Förvaring av extrakt

F-kalprotektinextrakt erhållna med manuell extraktion kan förvaras vid 2-8 °C i ≤ 7 dagar eller vid -20 °C i 36 månader.

MÄTOMRÅDE

Analysen kan utföras enligt följande procedurer: ELISA-procedur för lägre eller utökad mätområde Lämplig procedur väljs utefter förväntad kalprotektin koncentration.

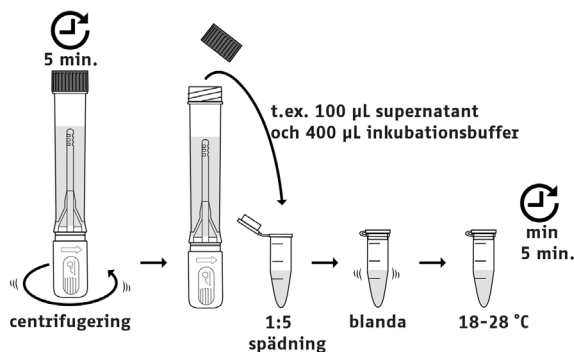
- För prover upp till 600 µg/g kalprotektin, välj proceduren för det lägre mätområdet (mätområde 10-600 µg/g).
- Om proverna tenderar att överstiga 600 µg/g välj det utökade mätområdet (mätområde 30-1800 µg/g).

ANALYSPROCEDUR

Viktigt: Låt alla reagenser stå i minst 30 minuter för att uppnå en temperatur på 18-28 °C före användning. Späd endast ut avföringsextrakt. Kalibratörer och kontroller är klara att användas.

1. Alternativ 1 för provspädning: Arbetsområde 10-600 µg/g

1.1. **CALEX® Cap-röret:** Späd avföringsextraktet i förhållandet 1:5 med inkubationsbuffert (t.ex. 100 µL extrakt och 400 µL inkubationsbuffert) och blanda väl. Låt proverna stå för att anta en temperatur på 18-28 °C i minst 5 minuter innan du går vidare till steg 4c.

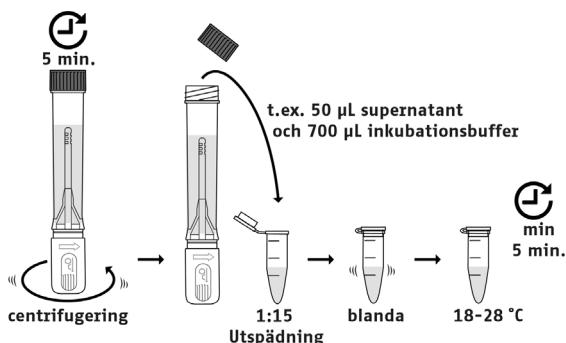


1.2 **Manuell extraktion eller Smart-Prep:** Späd avföringsextraktet i förhållandet 1:50 med inkubationsbuffert (t.ex. 20 µL extrakt och 980 µL inkubationsbuffert) och blanda väl. Låt proverna stå för att anta en temperatur på 18-28 °C i minst 5 minuter innan du går vidare till steg 4c.

1. Alternativ 2 för provspädning: Arbetsintervall 30-1800 µg/g

Arbetsintervallet kan utökas med en faktor på 3 om du späder proverna i förhållandet 1:7500 istället för 1:2500. Denna procedur rekommenderas om höga kalprotektinkoncentrationer förväntas.

1.1' **CALEX® Cap-röret:** Späd avföringsextraktet i förhållandet 1:15 med inkubationsbuffert (t.ex. 50 µL extrakt och 700 µL inkubationsbuffert) och blanda väl. Låt proverna stå för att anta en temperatur på 18-28 °C i minst 5 minuter innan du går vidare till steg 4c.



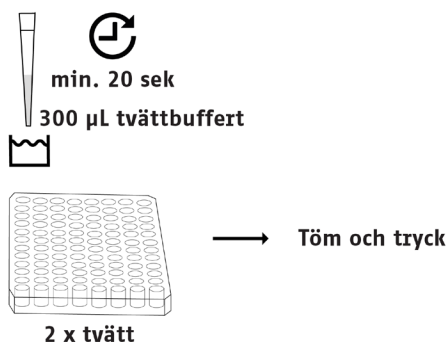
1.2' **Manuell extraktion eller Smart-Prep:** Späd avföringsextraktet i förhållandet 1:150 med inkubationsbuffert (t.ex. 20 µL extrakt och 2980 µL inkubationsbuffert) och blanda väl. Låt proverna stå för att anta en temperatur på 18-28 °C i minst 5 minuter innan du går vidare till steg 4c.

2. Bered en plattram med tillräckligt med strips för att testa det erforderliga antalet kalibratörer, kontroller och utspädda prover. Avlägsna överblivna strips från

ramen och förseгла dem på nytt i foliepåsen tillsammans med torkmedelsförpackningarna utan dröjsmål. Förvaras i kylskåp.

3. Tvätta de belagda brunnarna två gånger med minst 300 µL tvättbuffert per brunn. Töm brunnarna och knacka lätt på plattan på läskpapper

Viktigt: Låt tvättbufferten förbli i brunnarna i minst 20 sekunder under varje tvättsteg.



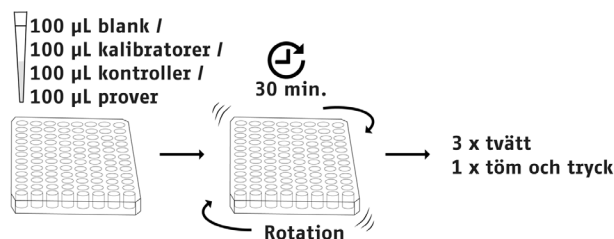
4a. Pipettera 100 µL inkubationsbuffert (blank) och pipettera 100 µL kalibrator A-E till respektive brunnar.

4b. Pipettera 100 µL av kontrollerna låg och hög till respektive brunnar.

4c. Pipettera 100 µL av varje utspätt prov till efterföljande brunnar.

5. Täck plattan med en plattförslutare, och inkubera i 30 + max. 5 min på en skakplatta inställd på ~450 rpm vid 18-28 °C (se tekniska försiktighetsåtgärder – ELISA-procedur).

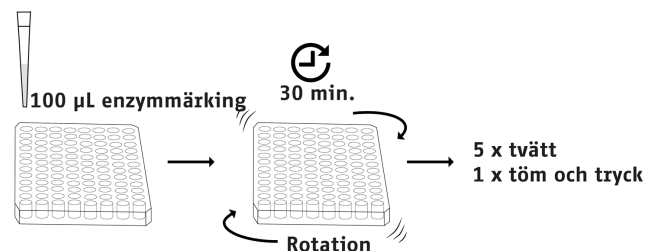
6. Ta av och kasta plattförslutare. Töm brunnarna och tvätta tre gånger med minst 300 µL tvättbuffert per brunn (se tekniska försiktighetsåtgärder – ELISA-procedur) Töm brunnarna och knacka lätt på plattan på läskpapper



7. Pipettera 100 µL enzymmärkning till alla brunnar.

8. Täck plattan med en plattförslutare, och inkubera i 30 ±5 min på en skakplatta inställd till inställd på rpm vid 18-28 °C .

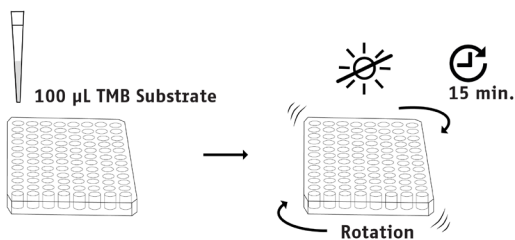
9. Ta av och kasta plattförslutare. Töm brunnarna och tvätta fem gånger med minst 300 µL tvättbuffert per brunn. Töm brunnarna och knacka lätt på plattan på ett läskpapper.



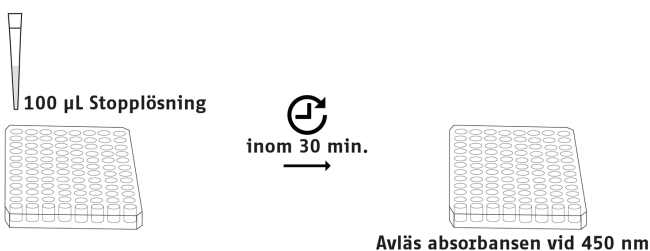
Viktigt: Låt TMB-substratlösningen anta 18-28 °C.

10. Pipettera 100 µL TMB-sugstratlösning till alla brunnar.

11. Täck plattan med en plattförslutare, skydda plattan från direkt ljus och inkubera i 15 ± 2 min på en skakplatta inställd till inställd på ~450 rpm vid 18-28 °C.



12. Pipettera 100 µL stopplösning till alla brunnar. Avlägsna luftbubblor med en pipettspets. Gå vidare till steg 13 inom 30 minuter.
13. Läs av absorbansen vid 450 nm i en mikrotiterplattläsare.



KVALITETSKONTROLL

Grundlig förståelse av bruksanvisningen är nödvändigt för lyckad användning av produkten. Tillförlitliga resultat erhålls endast med hjälp av exakta laboriemetoder och genom att följa bruksanvisningen noga.

BÜHLMANN fCAL® ELISA-kit levereras med två kontroller: kontroll låg och kontroll hög. Motsvarande referensvärden för kontrollerna anges i QC (kvalitetskontroll)-databladet som medföljer varje kit. Värdena och intervallerna som anges i databladet avser alltid den aktuella kit-loten och ska användas för direkt jämförelse av resultaten. Om resultaten för kontrollerna låg och/eller hög ligger utanför mätområdet som anges i QC-databladet rekommenderas att anse hela körningen som ogiltig.

Det rekommenderas att använda interna kontrollprover utöver kit-kontroller, i enlighet med lokala och nationella bestämmelser. Användning av interna kontrollprover tillråds för att säkerställa att resultatens giltighet från dag till dag. Eftersom det inte finns någon kommersiellt tillgänglig kontroll för F-kalprotektin rekommenderar vi att använda poolade avföringsprover med normala och patologiska nivåer för intern kvalitetskontroll.

Reproducerbarheten för standardkurvparametrar och kontrollvärden ska ligga inom fastställda gränser för acceptabilitet. Om analysens prestanda inte uppfyller etablerade gränser och upprepning har uteslutit tekniskt fel, kontrollera följande: i) enheter för pipettering, kontroll av temperatur samt tidtagning; ii) ELISA-läsarens inställningar; iii) reagensernas utgångsdatum; iv) förvarings- och inkuberingsförhållanden; v) TMB-substratlösningen ska vara färglös; vi) vattnets renhetsgrad; vii) aspirations- och tvättmetoder.

STANDARDISERING OCH METEROLOGISK SPÄRBARHET

Det finns inga internationellt eller nationellt erkända referensmaterial eller referensmätningsspecifika procedurer för kalprotektinanalyt i avföringsprov. Kalibratorvärdena för BÜHLMANN fCAL® ELISA tilldelas i flera mätningsskärningar med hjälp av internt referensmaterial baserat på humant serum och BÜHLMANN fCAL® ELISA-mätningsspecifika procedurer. Kalprotektinkoncentrationen för det interna referensmaterialet fastställdes med hjälp av renat MRP8/14 från humana granulocyter som primärt referensmaterial.

Det 95%-iga konfidensintervallet för den kombinerade osäkerheten hos produktkalibratorer fastställdes som under 13,3% och den kombinerade osäkerheten för produktkontroller under 16,4%.

BERÄKNING AV TESTRESULTAT

Standardkurva

Det rekommenderas att använda en programvara som kan utföra följande beräkningar: subtrahera det blanka OD-värdet från varje kalibratorbrunn för att beräkna kalibratorkurvan. Fastställ en standardkurva med kapacitet för logistisk analys med fyra parametrar (4 PL).

Kontroller och prover

Det rekommenderas att använda en programvara som kan utföra följande beräkningar: subtrahera det blanka OD-värdet från varje kontroll-/provbrunn. Beräkna kalprotektinkoncentrationen för kontrollen/provet i varje brunn, i µg/g, med hjälp av den fastställda standardkurvan.

Arbetsintervall 10 - 600 µg/g

Om du väljer ELISA-proceduren för det lägre mätområdet måste kalibratorvärdena ställas in som: 10, 30, 100, 300 och 600 µg/g kalprotektin. Ytterligare spädning faktorer (vid användning av en annan slutlig spädning än 1:2500) måste multipliceras med resultaten för att erhålla de slutliga resultaten.

Se tabell 12 och figur 1 för typiska data (resultat- och standardkurva). Dessa resultat- och standardkurvor tillhandahålls endast i demonstrationssyfte. En standardkurva måste genereras för varje uppsättning prover som ska analyseras.

Arbetsintervall 30 - 1800 µg/g

Om du väljer det utökade mätområdet för ELISA-proceduren måste följande nominella kalibratorvärden ställas in som: 30, 90, 300, 900 och 1800 µg/g kalprotektin. Ytterligare spädning faktorer (vid användning av en annan slutlig spädning än 1:7500) måste multipliceras med resultaten för att erhålla de slutliga resultaten.

Se tabell 15 och figur 3 för typiska data (resultat- och standardkurva). Dessa resultat- och standardkurvor tillhandahålls endast i demonstrationssyfte. En standardkurva måste genereras för varje uppsättning prover som ska analyseras

BEGRÄNSNINGAR

- Reagenser som levereras tillsammans med BÜHLMANN fCAL® ELISA-kittet är endast avsedda för

fastställning av kalprotektinnivåer i avföringsprover från människa.

- Testresultaten ska tolkas tillsammans med information tillgänglig från klinisk bedömning av patienten och andra diagnostiska procedurer.
- Vid övervakning av IBD-sjukdom har multipla mätningar av F-kalprotektin med upp till 4 veckors mellanrum föreslagits ha den bästa diagnostiska träffsäkerheten att förutse kliniskt återfall hos patienter (ref. 19-20).
- Resultaten kan eventuellt vara icke relevanta för barn under 4 år med lätt förhöjda nivåer av F-kalprotektin (ref. 21-24).
- Vissa patienter som tar icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID) kan ha förhöjda nivåer av F-kalprotektin.

TOLKNING AV RESULTAT

I. Särskiljning mellan organisk sjukdom från funktionell mag-tarmsjukdom

Resultatkategorier är baserade på data från kliniska studier genomförda av BÜHLMANN och är BÜHLMANN:s rekommendationer. Alla testresultat ska tolkas tillsammans med information om patientens kliniska symtom, sjukdomshistoria och andra kliniska fynd och laboratorieresultat.

Kliniska tröskelvärden

Resultat från 58 kliniska prover från patienter diagnostiserade med IBS och 131 kliniska prover från patienter diagnostiserade med IBD, från en internationell klinisk studie, analyserades för att erhålla värdena som redovisas i tabell 4.

Kalprotektin koncentration	Tolkning	Uppföljning
< 80 µg/g	Normal	Inga
80-160 µg/g	Gråzon/gränsfall	Uppföljning inom 4-6 veckor
> 160 µg/g	Förhöjd	Upprepa efter behov

Tabell 4

Kalprotektinvärden under 80 µg/g

F-kalprotektinvärden under 80 µg/g ska inte ses som tecken på inflammation i mag-tarmkanalen. Patienter med låga kalprotektinnivåer kommer sannolikt inte att behöva invasiva procedurer för att fastställa inflammationsorsaken.

Kalprotektinvärden från 80 till 160 µg/g

Medelhöga nivåer av F-kalprotektin från 80 till 160 µg/g, även benämnd gråzonsvärden, är inte direkta tecken på aktiv inflammation som kräver omedelbar uppföljning med invasiv testning. Inflammation kan dock inte uteslutas. En ny bedömning av F-kalprotektinnivåer efter 4 till 6 veckor rekommenderas för bestämning av inflammatorisk status.

Kalprotektinvärden över 160 µg/g

F-kalprotektinvärden under 160 µg/g tyder på neutrofilinfiltrat i mag-tarmkanalen, vilket kan signalera aktiv inflammatorisk sjukdom. Lämpliga ytterligare undersökningar av specialister föreslås för att uppnå en övergripande klinisk diagnos.

Klinisk utvärdering

Förmågan hos BÜHLMANN fCAL® ELISA att skilja mellan patienter med IBD och andra icke-inflammatoriska GI-störningar, inklusive IBS, utvärderades i en klinisk studie med totalt 337 vuxna och pediatrika patienter. Etthundratrettiofem (135) patienter hade en slutlig diagnos av IBD (Crohns sjukdom, ulcerös kolit eller obestämd kolit), 130 patienter hade IBS och 72 patienter hade buksmärta och/eller diarré eller annat GI-relaterat icke-inflammatoriskt tillstånd (se tabell 5). Den slutliga diagnosen stöddes av såväl endoskopiska som andra kliniska fynd.

Det går att uppnå en klinisk känslighet på 93,3% vid 80 µg/g och en klinisk specificitet på 83,7% vid 160 µg/g vid differentieringen mellan IBD och GI-relaterade icke-inflammatoriska tillstånd, däribland IBS. ROC-kurvanalys resulterade i en AUC på 0,923 (se tabell 6).

Det går att uppnå en klinisk känslighet på 93,3% vid 80 µg/g och en klinisk specificitet på 85,4% vid 160 µg/g vid differentieringen mellan IBD och GI-relaterade icke-inflammatoriska tillstånd, däribland IBS. ROC-kurvanalys resulterade i en AUC på 0,933 (se tabell 8).

Den optimala cut-off kombinationen för dessa patientpooler kunde definieras genom ROC-analys vid 80 µg/g och 160 µg/g kalprotektin, vilket är något striktare än en kombination av **en känsligare, nedre cut-off vid 50 µg/g** med lägre prestanda för specificitet, och **en övre cut-off vid 200 µg/g** med något lägre känslighet (tabell 7 och 9).

II. Övervakning av IBD

Kliniska tröskelvärden och utvärdering

Bestämningen av F-kalprotektin är ett pålitligt och enkelt sätt att underlätta övervakningen av IBD-patienter. (ref. 7-18).

Korrelation av kalprotektinnivåer och inflammatorisk status för patientens tarmslemhinna, enligt endoskopiska utvärderingar, bestämdes i tre oberoende studier med hjälp av BÜHLMANN kalprotektintester (tabell 10). Det diagnostiska värdet för kalprotektin för att förutsäga klinisk remission och återfall, enligt patientens symtom, kliniska aktivitetsindex, oplanerat behov av eskalering av behandling, sjukhusvistelse eller akuta fall bestämdes i tre studier med hjälp av BÜHLMANN kalprotektintester (tabell 11).

De resultatkategorier som visas är rekommendationer och deras fastställande är baserad på sammanfattad kunskap om publicerade brytpunktsvärden och studier om klinisk prestanda. Det rekommenderas att sjukvårdspersonal fastställer individuella tröskelvärden för patienten genom att bestämma patientens baslinje-kalprotektinnivå under sjukdomsremission.

Kalprotektinvärden under 100 µg/g

F-kalprotektinnivåer under 100 µg/g kan på ett tillförlitligt sätt påvisa endoskopisk remission hos patienter med låg risk för kliniskt återfall för vilka invasiva endoskopiska förfaranden kan undvikas (ref. 7-18).

Kalprotektinvärden mellan 100 och 300 µg/g

F-kalprotektinnivåer mellan 100 och 300 µg/g kan påvisa behovet av strängare kontroller under den nästföljande perioden för att utvärdera tendenser till sjukdomsutveckling.

Kalprotektinvärden över 300 µg/g

F-kalprotektinnivåer över 300 µg/g ska upprepas och, om förhöjda nivåer bekräftas, ska ytterligare utredningsåtgärder vidtas (ref. 7-18).

PRESTANDAEGENSKAPER

Prestandaegenskaperna för BÜHLMANN fCAL® ELISA har fastställts med hjälp av den manuella extraktionsmetoden, såvida inte annat anges.

Mätområde: 10-600 µg/g

Repetierbarhet: 1,9-8,0% CV

Precision inom laboratoriet: 5,5-14,0 % CV

Repetierbarhet och precision inom laboratoriet fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A2 med hjälp av en studiedesign med 22 dagar × 2 replikat. Tio extraherade avföringsprover med kalprotektinkoncentrationer mellan 13,2-501,4 µg/g testades (tabell 13).

Detektionsgräns (Limit of Detection, LoD): 4,2 µg/g

LoD fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A2 och med andelar av falskt positiva svar (α) mindre än 5% och falskt negativa svar (β) mindre än 5% baserat på 240 bestämningar, med 80 tomma (extraktionsbuffert) och 160 lågnivå-replikat; och en **LoB på 0,29 µg/g**.

Kvantifieringsgräns (Limit of Quantitation, LoQ):

9,8 µg/g

LoQ fastställdes med hjälp av data från studien om precision inom laboratoriet, omfattande ytterligare avföringsprov med en koncentration på 7,4 µg/g. LoQ fastställdes som den kalprotektinkoncentration vid vilken den icke-linjära anpassning av totala precisionsdata korsar precisionsmålet på 20% CV.

Linjäritet: 10 - 600 µg/g

Det linjära området för BÜHLMANN fCAL® ELISA bestämdes enligt CLSI-riktlinjen EP06-A. En maximal avvikelse från linjäriteten på ±20% tilläts. För värden under 75 µg/g tilläts en absolut skillnad på mindre än ±15 µg/g (tabell 14).

Noggrannhet/återhämtning

Total bias: -1,1%

Nedre LoA: -17,5%

Övre LoA: 15,4%

Fyra negativa extraherade avföringsprover spetsades med ökade mängder kalprotektin från serumprover. Resultaten redovisas i figur 2.

Högdos hook-effekt

Prover med teoretiska koncentrationer på upp till ~ 60 000 µg/g kan analyseras utan att begränsa analysen mätområde.

Mätområde: 30-1800 µg/g

Repetierbarhet: 1,7-5,8% CV

Precision inom laboratoriet: 3,1-9,4% CV

Repetierbarhet och precision inom laboratoriet fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av en studiedesign med 10 dagar × 2 körningar × 4 replikat. Sju poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer mellan 38,5-918,0 µg/g testades (tabell 16).

Mellan-lot-precision: 4,2-9,7% CV

Precision mellan loter fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av en studiedesign med 3 loter × 5 dagar × 5 replikat och en modell med slumpmässiga effektvariantkomponenter. Sex poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer mellan 46,4-1476,1 µg/g testades (tabell 17).

Reproducerbarhet (multicenterstudie för utvärdering av precision) 6,4-19,0% CV

Reproducerbarhet fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av en studiedesign med 3 laboratorier × 2 operatörer × 5 dagar × 2 körningar per dag × 4 replikat. Tre reagensloter användes i studien. Fem poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer mellan 42,1-1053,3 µg/g testades (tabell 18).

Detektionsgräns (Limit of Detection, LoD): 12,6 µg/g

LoD fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A2 och med andelar av falskt positiva svar (α) mindre än 5% och falskt negativa svar (β) mindre än 5% baserat på 120 bestämningar, med 60 tomma (extraktionsbuffert) och 60 lågnivå-replikat; och en **LoB på 8,3 µg/g**.

Kvantifieringsgräns (Limit of Quantitation, LoQ):

21,3 µg/g

LoQ fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A2, baserat på 60 bestämningar och en precisionsmål på 20% CV.

Linjäritet: 30-1800 µg/g

Det linjära området för BÜHLMANN fCAL® ELISA bestämdes enligt CLSI-riktlinjen EP06-A. En maximal avvikelse från linjäriteten på ±20% tilläts. För värden under 75 µg/g tilläts en absolut skillnad på mindre än ±15 µg/g (tabell 19).

Noggrannhet/återhämtning: 96,4 - 102,2%

Sju avföringsextrakt med kalprotektinnivåer mellan 46,5 och 990,2 µg/g spetsades med 180 µg/g kalprotektin i kalibratormaterial. Spetsning genomfördes med 1% av provextraktvolymen. "Baseline"-prover spetsades med motsvarande mängd inkubationsbuffert. Proverna "Baseline" och "Baseline + spike (spetsning)" mättes i tre replikat (tabell 20).

Preanalys

Prestandaegenskaper för BÜHLMANN fCAL® ELISA vad gäller preanalytiska procedurer fastställdes med hjälp av mätområdet 30 - 1800 µg/g.

Extraktionsreproducerbarhet - manuell extraktion

9,5 - 20,5%

Extraktionsreproducerbarhet fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av en studiedesign med 10 extraktioner × 2 replikat. Nio kliniska avföringsprover, inklusive prover med solid, semi-solid och flytande konsistens, med kalprotektinkoncentrationer mellan 51,2-1783,7 µg/g, testades (tabell 21).

Extraktionsreproducerbarhet – CALEX® Cap:

7,9 - 16,9%

Extraktionsreproducerbarhet fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av en studiedesign med 3 CALEX® Cap-loter extraktioner × 4 extraktioner × 4 replikat. Fem kliniska avföringsprover, inklusive prover med solid, semi-solid och flytande konsistens, med

kalprotektinkoncentrationer mellan 42,5-2949,9 µg/g, testades (tabell 22).

Metodjämförelse, CALEX® Cap vs. manuell extraktion

Bias vid 80 µg/g: 5,9% (95% KI) 1,4-12,2%

Bias vid 160 µg/g: 12,0% (95% KI) 7,8-17,0%

Genomsnittlig bias: 10,1% (95% KI: 5,7-14,5%)

Metodjämförelsestudien genomfördes enligt CLSI-riktlinjen EP09-A3. Tvåhundra fyrtioen (241) kliniska prover extraherades med en lot CALEX® Cap-enhet. Referensvärden, med en slutlig kalprotektinkoncentration på 30,5-1496,6 µg/g fastställdes med den manuella extraktionsmetoden. Extrakt mättes som enkla bestämningar för båda metoderna. Bias bestämdes med Passing-Bablok linjär regression och Bland-Altman-analys (tabell 23 och 24).

INTERFERERANDE SUBSTANSER

Känsligheten för BÜHLMANN fCAL® ELISA-analys för orala läkemedel, kosttillskott, hemoglobin samt enteropatologiska mikroorganismer bedömdes enligt CLSI-riktlinje EP07-A2 med det utökade mätområdet. Bias i resultat som översteg 10% ansågs som interferens. Ingen interferens detekterades med substanser listade i tabell 25, upp till de angivna koncentrationerna. Ingen interferens detekterades med enterohepatiska mikroorganismer listade i tabell 26, upp till de angivna mängderna kolonibildande enheter (CFU) per mL avföringsextrakt.

TABELLER OCH FIGURER

Kliniska studier

Klinisk studie - hur man särskiljer organisk sjukdom från funktionell mag-tarmsjukdom

Slutlig diagnos	Fördelning av patientresultat i antal (procent) inom BÜHLMANN fCAL® ELISAs diagnostiska intervall.			
	< 80 µg/g	80-160 µg/g	> 160 µg/g	Totalt
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Annan GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabell 5

IBD vs. icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensitivitet (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specificitet (95% KI)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
PPV (95% KI)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
NPV (95% KI)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
ROC AUC (95% KI)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabell 6

IBD vs. icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensitivitet (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specificitet (95% KI)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
PPV (95% KI)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
NPV (95% KI)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabell 7

IBD vs. icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensitivitet (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specificitet (95% KI)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
PPV (95% KI)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
NPV (95% KI)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
ROC AUC (95% KI)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabell 8

IBD vs. icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensitivitet (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specificitet (95% KI)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
PPV (95% KI)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
NPV (95% KI)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabell 9

icke-IBD – IBS + annan GI

CI – confidence interval (konfidensintervall)

PPV – positive predictive value (positivt prediktivt värde)

NPV – negative predictive value (negativt prediktivt värde)

ROC AUC – area under receiver operating characteristic curve (ROC-kurvanalys, area under kurvan)

Kliniska studier – övervakning av IBD

Kalprotektin ¹ vs IBD-aktivitet bestämd med endoskopiska fynd	Studie 1 Spanien (ref. 9)	Studie 2 Spanien (ref. 10)	Studie 3 Australien, Nya Zeeland (ref.11)
Antal patienter och demografi	89 (CD ²) Ålder: 32-58 44% män	123 (UC ³) Ålder: 18-85 66,4% män	99 (CD ² efter resektion) Ålder: 29-47 46,5% män
Brytpunkt	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80,3%	53%

Tabell 10

¹ Studie 1 och 2 – Quantum Blue® fCAL och Quantum Blue® fCAL high range

Studie 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² CD = patienter med Crohns sjukdom

³ UC = patienter med ulcerös kolit

Kliniska studier – övervakning av IBD

Kalprotektin ¹ vs vidare klinisk remission eller återfall	Studie 4 Storbritannien (ref. 12)	Studie 5 Spanien (ref. 13)	Studie 6 Spanien (ref. 14)
Antal patienter och demografi	92 (CD ²) 38% män	30 (CD ²) Adalimumab-behandling Ålder: 24-64 43,3% män	33 (CD ²) 20 (UC ³) infiximab-behandling Ålder: 18-68 47,2% män
Uppföljningstid efter mätning av kalprotektin	12 månader	4 månader	12 månader
Patienter med kliniskt återfall efter uppföljning	11%	30%	23%
Brytpunkt	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96,8%	100%	96,1%
PPV	27,6%	75%	68,7%

Tabell 11

¹ Studie 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Studie 5 och 6 – Quantum Blue® fCAL och Quantum Blue® fCAL high range

² CD = patienter med Crohns sjukdom

³ UC = patienter med ulcerös kolit

TABELLER OCH FIGURER

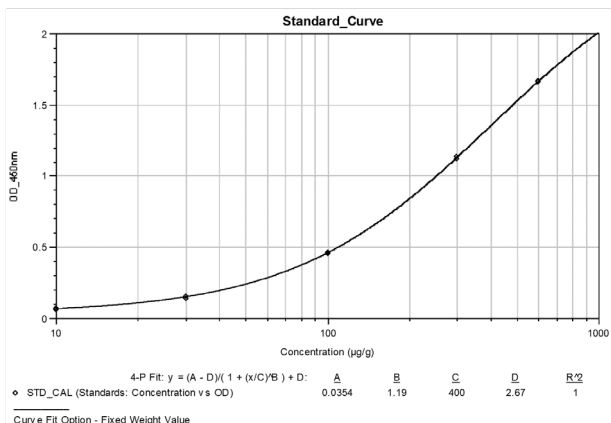
LÄGRE MÄTOMRÅDE-PROCEDUR 10-600 µg/g

Exempel på resultat

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

Tabell 12

Exempel på en standardkurva



Figur 1

Precision inom laboratoriet

Provnr	n	Genomsnitt [µg/g]	Repetierbarhet		Mellan-dag		Total precision	
			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%

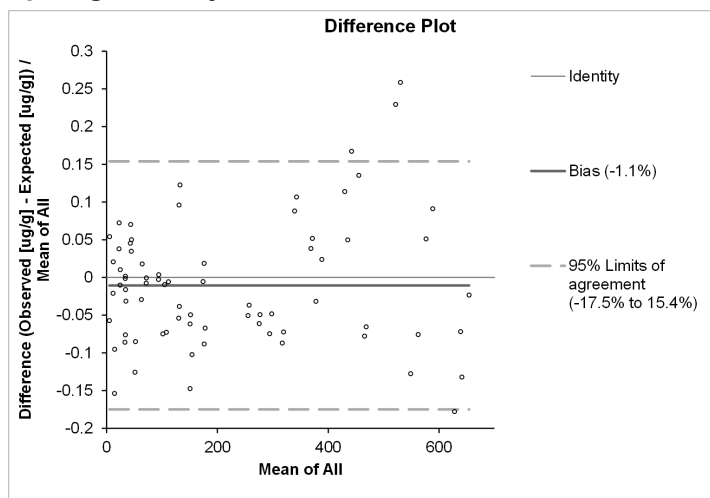
Tabell 13

Linjäritet

ID	Testat mätområde	R ²	p-värde för icke-linjär koefficient	Linjärt område
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

Tabell 14

Spiking recovery



Figur 2

TABELLER OCH FIGURER

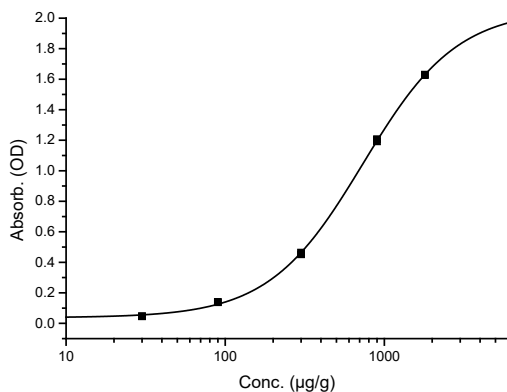
PROCEDUR FÖR UTÖKAT MÄTOMRÅDE 30-1800 µg/g

Exempel på resultat

	Koncentration [µg/g]	Absorbtion [OD]
Kalibrator A	30	0,047
	30	0,046
Kalibrator B	90	0,138
	90	0,140
Kalibrator C	300	0,464
	300	0,452
Kalibrator D	900	1,207
	900	1,192
Kalibrator E	1800	1,627
	1800	1,630
Blank medelv		0,057
Kontroll Låg		0,147
		0,162
Kontroll Hög		0,618
		0,618

Tabell 15

Exempel på en standardkurva



Figur 3

Precision inom laboratoriet

ID	Genomsnitt [µg/g]	n	Repetierbarhet		Mellan-körning		Mellan-dag		Precision inom laboratoriet	
			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%

Tabell 16

Mellan-lot-precision

ID	Genomsnitt [µg/g]	n	Inom-körning		Mellan-dag		Mellan-lot		Totalt	
			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%

Tabell 17

Reproducerbarhet - multicenterstudie för utvärdering av precision

ID	Genomsnitt [µg/g]	n	Mellan-operatör		Mellan-klinik		Total (reproducerbarhet)	
			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%

Tabell 18

Linjäritet

ID	Testat testat mätområde [µg/g]	R ²	p-värde för icke-linjär koefficient	Linjärt område [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

Tabell 19

Noggrannhet/återhämtning

ID	Genomsnitt baseline [µg/g]	Förväntad baseline + "spike" [µg/g]	Observerad baseline + "spike" [µg/g]	Återhämtnings-frekvens [%]
#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%

Tabell 20

TABELLER OCH FIGURER

PRESTANDAEGENSKAPER - PREANALYS

Extraktionsreproducerbarhet – manuell vägningsextraktion

ID	Genomsnitt [µg/g]	n	Inom-extraktion		Mellan-extraktion		Total precision	
			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%

Tabell 21

Extraktionsreproducerbarhet – CALEX® Cap:

ID	Genomsnitt [µg/g]	Inom-extraktion		Mellan-extraktion		Mellan-lot		Total precision	
		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%

Tabell 22

Metodjämförelse, CALEX® Cap-extraktion och manuell extraktion

Bland-Altman-analys		
Medelhög bias (95%)	Nedre LoA (95% KI)	Övre LoA (95% KI)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabell 23

Passing-Bablok-regressionsanalys				
Lutning (95% KI)	Skärning (µg/g) (95% KI)	Bias vid 80 µg/g (95% KI)	Bias vid 160 µg/g (95% KI)	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

Tabell 24

INTERFERERANDE SUBSTANSER

Orala läkemedel, kosttillskott och hemoglobin

Handelsnamn	Aktiv komponent	Koncentration mg/50 mg avföring
gyno-Tardyferon	Järn(III)sulfat (innehåller 0,35 mg folsyra)	0,11
Prednison	Prednison	0,31
Imurek	Azatioprin	0,19
Salofalk	Mesalamin, 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalamin, 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomycin	2,00
Sulfametoxazol	Sulfametoxazol	1,60
Trimetoprim	Trimetoprimlaktat	0,35
Ciproxin	Ciprofloxacin	1,25
E-vitamin	DL-α-Tocoferolacetat	0,30
Bion 3	3 probiotika (107 CFU): <i>Lactobacillus gasseri</i> PA16/8, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>Bifidobacterium longum</i> SP07/3, 12 vitaminer: 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), folsyra (200 µg), niacin (18 mg), pantotensyra (6 mg) och 7 mineraler: jod (100 µg), järn (5 mg), zink (5 mg), selen (30 µg), krom (25 µg), mangan (1,2 mg), molybden (25 µg)	1,06
Hemoglobin	Hemoglobin	1,25

Tabell 25

Enterohepatiska mikroorganismer

Namn	Slutlig koncentration (CFU/mL avföringsextrakt)
<i>Escherichia coli</i>	9,5 × 10 ⁷
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1 × 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	5,4 × 10 ⁷
<i>Citrobacter freundii</i>	9,7 × 10 ⁷
<i>Shigella flexneri</i>	1,5 × 10 ⁸
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,6 × 10 ⁸

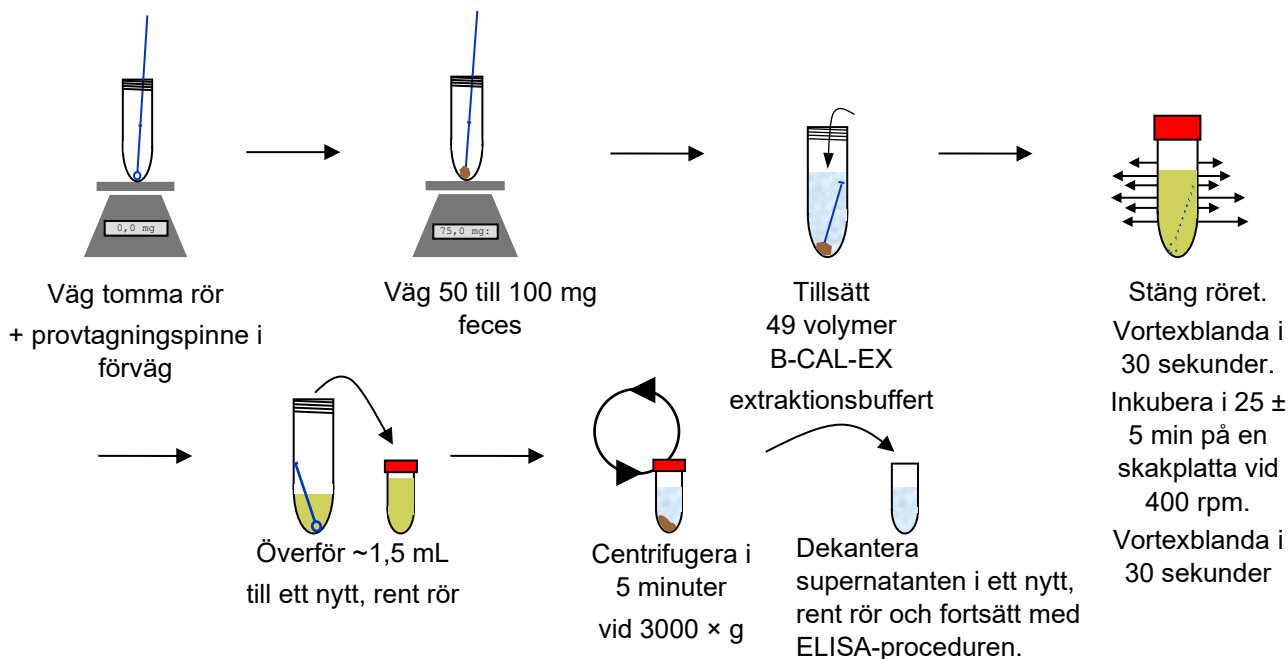
Tabell 26

REFERENSER

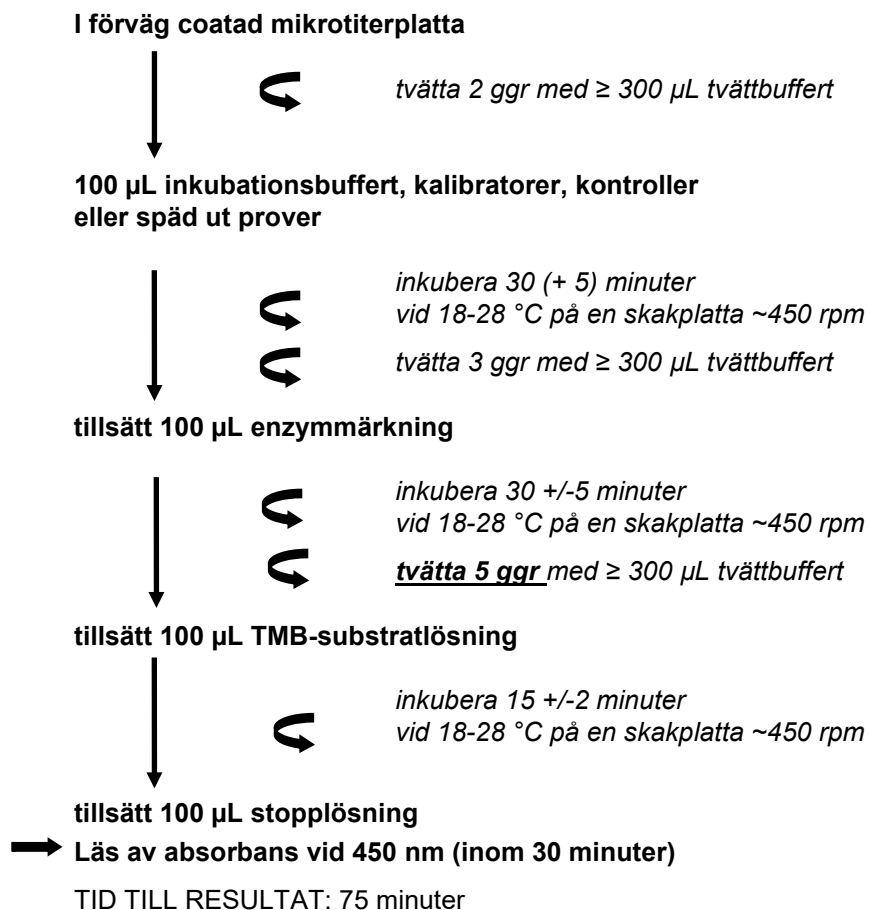
1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and 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. Ferreira-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. Ferreira-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. Lassen 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)

KALPROTEKTINEXTRAKTION

Manuell extraktionsprocedur



KALPROTEKTIN ELISA



ÄNDRINGSLOGG

Datum	Version	Ändring
2022-11-16	A3	Uppdatering i kapitlet <i>Varningar och försiktighetsåtgärder</i> Inkludering av kalibratorsäkerhetsvärden och motivering till intern standardisering i kapitlet <i>Standardisering</i> Uppdatering av ordalydelse och förenkling i kapitlet <i>Prestandaegenskaper</i> Revidering av kapitlet <i>Symboler</i> ny patentinformation Inkludering av det anmälda organets nummer i CE-märke - bedömning av överensstämmelse enligt IVDR 2017/746

HÄNDELSERAPPORTERING I EU:S MEDLEMSSTATER

Vid allvarlig händelse i samband med denna produkt, rapportera till tillverkaren och behörig myndighet i din medlemsstat utan dröjsmål.

LEVERANSSKADA

Meddela återförsäljaren om denna produkt mottogs i skadat skick.

SYMBOLER

BÜHLMANN använder de symboler och tecken som anges och beskrivs i ISO 15223-1. Dessutom används följande symboler och tecken:

Symbol	Förklaring
MP	Mikrotiterplatta
BUF EX	Extraktionsbuffert
BUF WASH 10X	Tvättbuffertkoncentrat (10x)
BUF INC	Inkubationsbuffert
CAL A - CAL E	Kalibrator A -E
CONTROL L	Kontroll Låg
CONTROL H	Kontroll Hög
EL	Enzymmärkning
SUBS TMB	TMB-substrat
SOLN STOP	Stopplösning

Delar av satsen är patentskyddade av EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

