BÜHLMANN fCAL® ELISA

Kalprotektyna ELISA

Do użytku w diagnostyce *In Vitro*

EK-CAL2-WEX 192 testy

Data wydania: 2022-11-16
Wersja A3

Producent

BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Szwajcaria
Tel.: +41 61 487 12 12
Faks: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Zestaw BÜHLMANN fCAL® ELISA jest testem diagnostycznym *in vitro* przeznaczonym do ilościowego oznaczania ludzkiej kalprotektyny w próbkach kału, co pozwala na pomoc w ocenie zapalenia błony śluzowej jelit. Wyniki testu mogą być pomocne w diagnostyce w odróżnieniu organicznej, zapalnej choroby przewodu pokarmowego (Nieswoistego Zapalenia Jelit, IBD, w szczególności choroby Lęśniowskiego-Crohna lub Wrzodziejącego Zapalenia Jelita Grubego, UC) od choroby czynnościowej (Zespół Jelita Drażliwego, IBS) (ref. 1-7), u pacjentów z przewlekłym bólem brzucha oraz jako pomoc w monitorowaniu chorób IBD (ref. 7-18).

Tylko do użytku laboratoryjnego.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Niniejszy zestaw BÜHLMANN fCAL® ELISA umożliwia selektywny pomiar stężenia kalprotektyny w próbkach kału za pomocą testu „sandwich" ELISA – podwójnego wiązania. Płytka mikrotitracyjna BÜHLMANN fCAL® ELISA jest pokryta monoklonalnym przeciwciałem wychwytującym (mAb), wysoce specyficznym dla heterodimerycznych i polimerycznych kompleksów kalprotektyny. Ekstrakty próbek kału pacjenta, kontrole określające akceptowalność testu ELISA oraz kalibratory nanosi się do odpowiednich studzienek na płytce mikrotitracyjnej. Po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej i etapach przemywania, przeciwciało wykrywające (Ab) skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP) wykrywa cząsteczki kalprotektyny związane z przeciwciałem wychwytującym na płytce. Po inkubacji i kolejnych przemywaniach dodaje się chromogenny substrat HRP, tetrametylobenzydynę (TMB) (z utworzeniem niebieskiego koloru), po czym następuje zatrzymanie reakcji (zmiana koloru na żółty). Absorpcję mierzy się przy 450 nm. Ostateczne stężenie kalprotektyny w µg/g kału w próbkach pacjentów określa się przy wykorzystaniu krzywej kalibracyjnej wygenerowanej na podstawie zmierzonych wartości kalibratorów.

DOSTARCZANIE I PRZYGOTOWYWANIE ODCZYNNIKÓW

Odczynniki	Ilość	Kod	Sposób przygotowania
Płytka mikrotitracyjna wstępnie pokryte anty-kalprotektyną mAb	2 x 12 x 8-dołkowe paski z ramką	B-CAL-MP	Gotowa do użycia
Folia do płytki	6 sztuk	-	Gotowa do użycia
Koncentrat buforu płuczącego (10x) z konserwantami	2 butelki x 100 mL	B-CAL-WB	Każdy rozcieńczyć z 900 mL wody dejonizowanej
Bufor inkubacyjny z konserwantami	2 butelki x 125 mL	B-CAL-IB	Gotowy do użycia
Kalibratory od A do E[1) 2)] Kalprotektyna pochodząca z surowicy w matrycy buforu z konserwantami	5 fiolek x 1 mL	B-CAL-CASET	Gotowe do użycia
Kontrola niska / wysoka[3)] Kalprotektyna pochodząca z surowicy w matrycy buforu z konserwantami	2 fiolki x 1 mL	B-CAL-CONSET	Gotowe do użycia
Oznakowany enzym Przeciwciało anty-kalprotektyny sprzężone z HRP	2 fiolki x 12 mL	B-CAL-EL	Gotowy do użycia
Substrat TMB TMB w buforze cytrynianowym	2 fiolki x 12 mL	B-TMB12	Gotowy do użycia
Roztwór zatrzymujący reakcję 0.25 M kwas siarkowy	2 fiolki x 12 mL	B-STS12	Gotowy do użycia **Środek żrący**

Tabela 1

1) Rzeczywiste stężenie kalprotektyny dla kalibratorów od A do E wynosi odpowiednio 4, 12, 40, 120 i 240 ng/mL. Dla niskiego zakresu testu ELISA powinny być stosowane następujące wartości kalibratora: 10, 30, 100, 300 i 600 µg/g kalprotektyny. To przypisanie odpowiada końcowemu rozcieńczeniu próbki 1:2500 w procedurze ELISA niskiego zakresu

2) Dla rozszerzonego testu ELISA należy stosować kalibratory o stężeniu zgodnym z protokołem ELISA: 30, 90, 300, 900 i 1800 µg/g kalprotektyny. To przypisanie odpowiada końcowemu rozcieńczeniu próbki 1:7500 w procedurze ELISA rozszerzonego zakresu.

3) Kontrole z odpowiednim numerem partii zawierają określoną ilość ludzkiej kalprotektyny. Rzeczywiste stężenia umieszczone są w dodatkowym arkuszu danych QC.

PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ ODCZYNNIKÓW I ROZTWORÓW ROBOCZYCH

Fabrycznie zamknięte odczynniki	
Przechowywać w 2-8 °C. Nie używać odczynników po upłynięciu daty ważności umieszczonej na opakowaniu.	
Otwarte/Rozpuszczone odczynniki	
Płytka mikrotitracyjna	Niewykorzystane stripy możliwie jak najszybciej umieścić ponownie w foliowej torebce ze środkiem suszącym. Opakowanie należy szczelnie zamknąć. Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 2-8 °C.
Rozcieńczony Bufor płuczący	Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 2-8 °C.
Bufor inkubacyjny	
Kalibratory	
Kontrole	
Oznakowany enzym	
Substrat TMB	
Roztwór zatrzymujący reakcję	

Tabela 2

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY DODATKOWO DOSTARCZANE

Urządzenie do ekstrakcji kału
Urządzenie do ekstrakcji kału opisane w tabeli 3 nie jest dostarczone z zestawem i musi być zamówione oddzielnie.

Zestaw urządzeń do ekstrakcji	Ilość w zestawie	Kod produktu
CALEX® Cap	Dostępne są opakowania po 50, 200 lub 500 probówek, każda wypełniona 5 mL buforu ekstrakcyjnego.	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500

Tabela 3

NIEZBĘDNE MATERIAŁY, KTÓRE NIE ZOSTAŁY DOSTARCZONE

Procedura ekstrakcji

- Precyzyjne pipety o objętościach 100 µL i 1000 µL z jednorazowymi końcówkami
- Jednorazowe polistyrenowe lub polipropylenowe probówki do przenoszenia ekstraktów (opcjonalnie)
- Stanowisko pracy z przepływem laminarnym
- Wytrząsarka typu Vortex na wiele próbek / zwykła wytrząsarka typu Vortex
- Mikrowirówka (≥3000 x g)
- Wirówka (≥500 x g)

Procedura testu ELISA

- Precyzyjne pipety z jednorazowymi końcówkami o objętości 10 µL, 100 µL i 1000 µL
- Jednorazowe polistyrenowe lub polipropylenowe probówki do przygotowania rozcieńczonych próbek
- Cylinder o objętości 1000 µL do rozcieńczania buforu płuczącego
- Płuczka do płytek mikrotitracyjnych (patrz techniczne środki ostrożności) lub wyciskana butelka na bufor do płukania
- Wytrząsarka do płytek mikrotitracyjnych (patrz techniczne środki ostrożności)
- Bibułka matująca
- Czytnik płytek mikrotitracyjnych z możliwością pomiaru absorbancji przy 450 nm

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Środki ostrożności

- Kalibratory i kontrole w swoim składzie zawierają składniki pochodzenia ludzkiego. Przeprowadzono odpowiednie testy dające negatywny wynik na obecność antygenu powierzchniowego wirusa HBV oraz przeciwciał HCV i HIV ½ i pomimo to odczynniki powinny być traktowane jako potencjalne źródło zakażenia, stosując przy tym odpowiednie środki ostrożności zgodne z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP).
- Zestaw zawiera składniki sklasyfikowane zgodnie z Rozporządzeniem (WE) Nr 1272/2008:

  Chlorowodorek 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu (stężenie ≥0,0015%), dlatego też odczynniki mogą wywoływać reakcje alergiczne skóry (H317).

  Kwas siarkowy (stężenie ≥2,5 - <5%), zatem odczynniki mogą powodować podrażnienie skóry (H315) i poważne podrażnienia oczu (H319).
- Należy unikać bezpośredniego kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi. Jeśli dojdzie do kontaktu, natychmiast przemyć dużą ilością wody; w przeciwnym razie może wystąpić podrażnienie.
- Odczynniki i środki chemiczne należy traktować jako odpady niebezpieczne zgodnie z krajowymi wytycznymi lub przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.

Techniczne środki ostrożności

Elementy zestawu

- Pozostałości w studzienkach płytki mikrotitracyjnej powstają w wyniku procesu produkcji. Są one usuwane na etapie przemywania (punkt 3 Procedura wykonania testu) i nie wpływają na wyniki.
- Nie należy stosować odczynników po upływie terminu ważności, który umieszczony jest na opakowaniu.
- Nie mieszać ze sobą i nie używać odczynników z zestawów o różnym numerze partii.
- Należy dołożyć wszelkich starań, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia między odczynnikami, próbkami oraz pomiędzy studzienkami.
- Przed rozpoczęciem testu należy doprowadzić odczynniki do temperatury pokojowej. Przed użyciem wymieszać odczynniki za pomocą vortexu.
- Mikrostudzienek nie można używać ponownie.

Ekstrakcja

- W celu uzyskania wiarygodnych i ilościowych wyników ważne jest, aby całkowicie zhomogenizować próbkę kału w urządzeniu do ekstrakcji. Nierozpuszczalne (niestrawione) składniki mogą być nadal obecne po ekstrakcji.

Procedura testu ELISA

- W teście ELISA etapy przemywania są konieczne dla zapewnienia powtarzalności wyników. Należy zapewnić minimum 20 sekundową inkubację dla buforu płuczącego wprowadzanego do studzienek, przed jego usunięciem.
- Przy korzystaniu z automatycznej płuczki, zastosowanie „trybu płytka”, co oznacza, że każdy etap (napełniania/opróżniania) prowadzony jest na wszystkich stripach, sekwencyjnie, zanim urządzenie przejdzie do kolejnego cyklu mycia. W ten sposób zagwarantowany jest minimalny czas inkubacji.
- Należy zapewnić wyznaczoną ilość cykli na przemywanie dla zapewnienia powtarzalności wyników.
- Wytrząsarka do płytek powinna osiągnąć szybkość 450 rpm (7,5 Hz). Wyższa częstotliwość obrotów może spowodować słabą liniowość dla rozcieńczonych wartości pomiędzy 300/900 a 600/1800 µg/g. Zamiast ruchu poziomego należy zastosować ruch obrotowy.
- Aby zapewnić całkowitą reakcję antygen/przeciwciało, czas inkubacji w punkcie 5 musi wynosić minimum 30 minut. Umiarkowanie

dłuższy czas inkubacji (do 5 minut) nie ma wpływu na wynik końcowy.

- Oznakowany enzym jest inaktywowany przez tlen i jest wysoce czuły na obecność azydku sodu, tiomersalu, kwasu podchlorawego i aromatycznych chlorowęglowodorów często występujących w wodzie laboratoryjnej. W związku z tym należy używać tylko wysokiej jakości wody dejonizowanej.
- Za każdym razem, gdy przeprowadzany jest test należy wygenerować nową krzywą kalibracyjną (dla każdej płytki lub płytki częściowej)
- Jeśli początkowe stężenie nieznanej próbki jest wyższe niż stężenie najwyższego kalibratora, kalibratora E, próbkę można dalej rozcieńczyć buforem inkubacyjnym, po czym ponownie wykonać oznaczenie zgodnie z procedurą testu. Do obliczenia końcowego wyniku należy uwzględnić całkowity współczynnik rozcieńczenia.

POBIERANIE PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

Do procesu ekstrakcji wymagane jest mniej niż 1 g próbki kału. Próbki kału należy zbierać do zwykłych pojemników.

Ważne: Pobieranie próbki powinno odbywać się bez żadnych dodatków chemicznych lub biologicznych.

Transport próbek

Próbki kału powinny być przekazane do zbadania w laboratorium w ciągu trzech dni od daty ich pobrania. Próbki mogą być transportowane w temperaturze pokojowej bądź w lodówce.

Przechowywanie próbek

Otrzymane próbki kału należy przechowywać w temperaturze 2-8 °C i wyekstrahować w ciągu trzech dni od daty otrzymania ich w laboratorium. Nie przechowywać próbek w podwyższonych temperaturach.

EKSTRAKCJA PRÓBEK KAŁU I STABILNOŚĆ EKSTRAKCJI

1.1 Procedura ekstrakcji

Postępuj zgodnie z instrukcją dostarczoną z urządzeniem CALEX® Cap (kod: B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Płynne próbki kału mogą być pipetowane bezpośrednio do urządzenia CALEX® Cap. Odkręcić niebieską nakrętkę i dodać 10 µL próbki kału do urządzenia. Zamknąć nasadkę urządzenia CALEX® Cap i przejść do etapu worteksowania zgodnie z procedurą ekstrakcji opisaną i zilustrowaną w instrukcji użytkowania dostarczonej razem z urządzeniem CALEX® Cap.

Ważne: Po ekstrakcji należy wirować urządzenie CALEX® Cap przez 5 minut przy 500-3000 x g i kontynuować procedurę testu.

1.2 Stabilność ekstraktu

Ekstrakty kalprotektyny w kale uzyskane przy pomocy urządzenia CALEX® Cap są stabilne w temperaturze pokojowej (23 °C) przez 7 dni i w temperaturze 2-8 °C do 15 dni. W celu dłuższego przechowywania, ekstrakty należy zamrozić w temperaturze -20 °C. Zamrożone ekstrakty są stabilne przez okres do 23 miesięcy.

Ekstrakty CALEX® Cap mogą być zamrożone i przechowywane wewnątrz urządzenia CALEX® Cap. Ekstrakty mogą być poddane czterem cyklom zamrażania-rozmrażania. Przed pomiarem zamrożone ekstrakty należy zrównoważyć do temperatury pokojowej, dokładnie worteksować przez 10 sekund i wirować przez 5 minut (500-3000 x g).

ZAKRES ROBOCZY

Procedurę oznaczania można przeprowadzić na dwa sposoby: stosując niski lub rozszerzony zakres ELISA. Wybór procedury zależny jest od oczekiwanego stężenia kalprotektyny w próbkach:

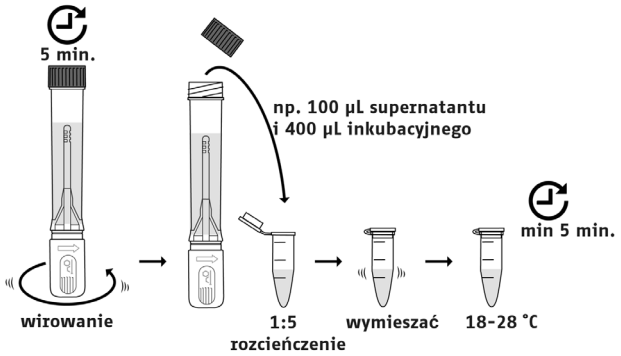
- Dla próbek do 600 µg/g kalprotektyny należy wybrać procedurę z niskim zakresem (zakres roboczy 10-600 µg/g).
- Natomiast dla próbek przekraczających 600 µg/g należy dobrać zakres rozszerzony (zakres roboczy 30-1800 µg/g).

PROCEDURA WYKONANIA TESTU

Ważne: Przed użyciem przez co najmniej 30 minut odczekać na wyrównanie temperatury odczynników do temp. 18-28 °C. Należy rozcieńczyć tylko ekstrakty kału. Kalibratory i kontrole są gotowe do użycia.

1. Rozcieńczanie próbki, opcja 1: Zakres roboczy 10-600 µg/g

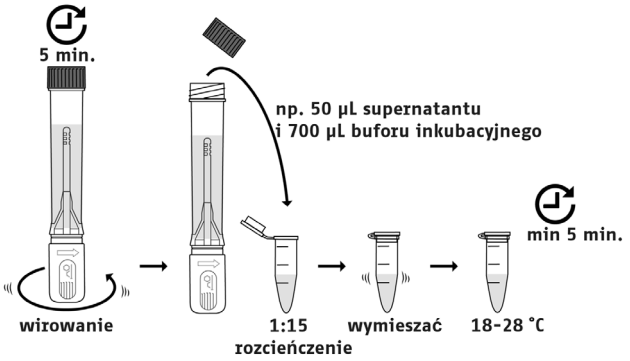
1.1. Po ekstrakcji za pomocą urządzenia CALEX® Cap, ekstrakty kału należy rozcieńczyć w stosunku 1:5 buforem inkubacyjnym (np. 100 µL ekstraktu i 400 µL buforu inkubacyjnego) i dokładnie wymieszać. Przed przystąpieniem do punktu 4c rozcieńczone próbki należy zrównoważyć, w tym celu należy odstawić je na 5 minut w temperaturze 18-28 °C.



1.` Rozcieńczanie próbki, opcja 2: Zakres roboczy 30-1800 µg/g

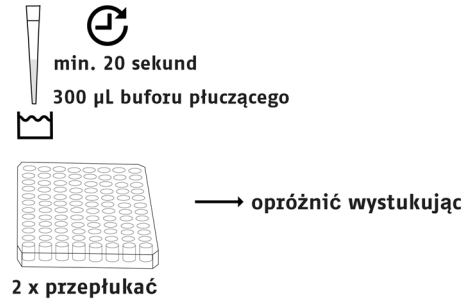
Jeśli próbka zostanie rozcieńczona w stosunku 1:7500 zamiast 1:2500 wówczas zakres pracy może zostać rozszerzony o współczynnik 3. Taka procedura jest zalecana, jeśli spodziewamy się wysokich stężeń kalprotektyny.

1.1` Po ekstrakcji za pomocą urządzenia CALEX® Cap, ekstrakty kału należy rozcieńczyć w stosunku 1:15 buforem inkubacyjnym (np. 50 µL ekstraktu i 700 µL buforu inkubacyjnego) i dokładnie wymieszać. Przed przystąpieniem do punktu 4c pozostawić próbki do zrównoważenia przez 5 minut w temperaturze 18-28 °C.



2. Do badania należy przygotować ramkę płytki z odpowiednią ilością stripów dla wymaganej liczby kalibratorów, kontroli i rozcieńczonych próbek. Niewykorzystane stripy powinny być bezzwłocznie umieszczone w foliowym woreczku z środkiem osuszającym. Przechowywać je w lodówce.
3. Dwukrotnie przemyć powleczone studzienki, za każdym razem stosując co najmniej 300 µL buforu płuczącego na jedną studzienkę. Studzienki opróżnić, wystukując resztki buforu na suchy ręcznik papierowy.

Ważne: Bufor płuczący należy pozostawić przez co najmniej 20 sekund podczas każdego etapu przemywania.

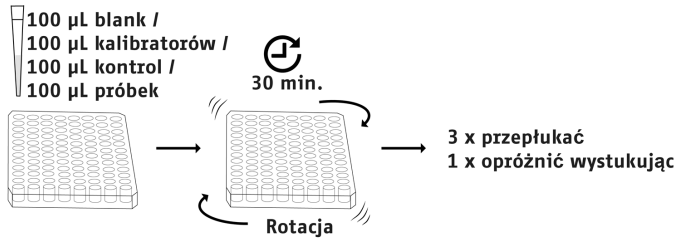


4a. Wprowadzić 100 µL buforu inkubacyjnego (blank) i 100 µL kalibratora A-E do odpowiednich studzienek.

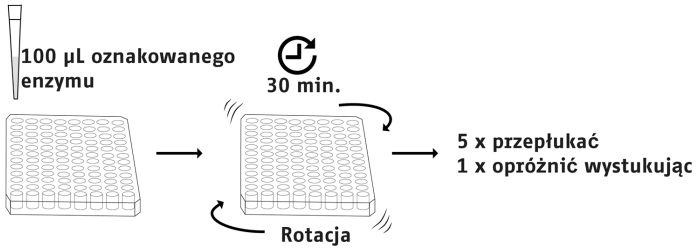
4b. Wprowadzić 100 µL kontroli niskiej i wysokiej do odpowiednich studzienek.

4c. Odmierzyć po 100 µL każdej rozcieńczonej próbki i wprowadzić do kolejnych studzienek.

5. Płytkę należy przykryć folią do płytek i inkubować przez 30 ± max 5 minut na wytrząsarce do płytek w temperaturze 18-28 °C przy 450 rpm (patrz techniczne środki ostrożności - Procedura testu ELISA).
6. Należy zdjąć folię z płytki i wyrzucić. Opróżnić studzienki i przepłukać trzykrotnie, dodając po 300 µL buforu płuczącego na jedną studzienkę (patrz techniczne środki ostrożności - Procedura testu ELISA). Opróżnić studzienki, wystukując resztki buforu na suchy ręcznik papierowy.

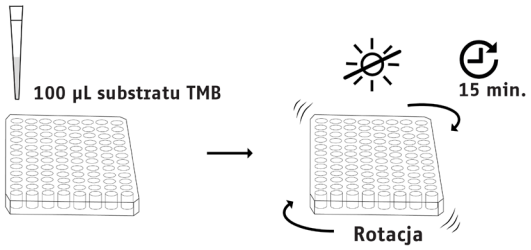


7. Odmierzyć 100 µL oznakowanego enzymu i wprowadzić do każdej studzienki.
8. Płytkę należy przykryć folią do płytek i inkubować przez 30 ± 5 minut na wytrząsarce do płytek w temperaturze 18-28 °C przy 450 rpm.
9. Należy zdjąć folię z płytki i wyrzucić. Opróżnić studzienki i przepłukać pięciokrotnie, dodając co najmniej 300 µL buforu płuczącego na jedną studzienkę. Opróżnić studzienki, wystukując resztki buforu na suchy ręcznik papierowy.

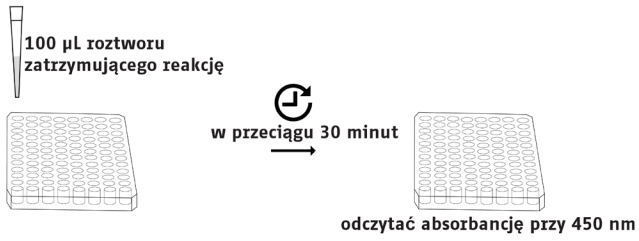


Ważne: Roztwór substratu TMB należy odstawić, aby zrównoważył się do temperatury 18-28 °C.

10. Odmierzyć 100 µL roztworu substratu TMB i wprowadzić do każdej studzienki.
11. Płytkę należy przykryć folią do płytek i chronić przed bezpośrednim światłem, następnie inkubować przez 15 ± 2 minut na wytrząsarce do płytek w temperaturze 18-28 °C przy 450 rpm.



12. Odmierzyć 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję i wprowadzić do każdej studzienki. Usunąć pęcherzyki powietrza przy wykorzystaniu końcówki do pipety. W przeciągu 30 minut przejść do punktu 13.
13. Za pomocą czytnika płytek mikrotitracyjnych odczytać absorbancję przy 450 nm.



KONTROLA JAKOŚCI

Dokładne zrozumienie niniejszej instrukcji obsługi jest niezbędne do prawidłowego wykorzystania produktu. Wiarygodne wyniki można uzyskać przy zastosowaniu precyzyjnych technik laboratoryjnych i postępując według opisanej instrukcji.

Zestaw BÜHLMANN fCAL® ELISA zawiera dwie kontrole: niską i wysoką. Odpowiednie wartości referencyjne kontroli są podane w arkuszu danych QC dołączonym w każdym zestawie. Wartości i zakresy podane w arkuszu danych QC zawsze odnoszą się do aktualnej partii zestawu i należy je wykorzystać do

bezpośredniego porównania wyników. Jeżeli wartości kontroli niskich i/lub wysokich są poza podanym zakresem w arkuszu danych QC, zaleca się uznanie całej serii za nieważną.

Zaleca się stosowanie próbek kontroli wewnętrznej, oprócz kontroli zestawu, zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami. Zaleca się stosowanie próbek kontroli wewnętrznej, aby zapewnić codzienną ważność wyników. Ze względu na to, iż nie występuje komercyjnie dostępna kontrola dla kalprotektyny z kału, do wewnętrznej kontroli jakości zaleca się stosowanie ekstraktów z kału z normalnymi i patologicznymi poziomami kalprotektyny.

Powtarzalność parametrów krzywej kalibracyjnej i wartości kontroli powinny mieścić się w ustalonych granicach dopuszczalności laboratoryjnej. Jeżeli uzyskane wyniki nie mieszczą się w ustalonych granicach a powtórzenie testu wykluczyło błędy techniczne, należy sprawdzić następujące czynniki: i) urządzenia pipetujące, kontrolujące temperaturę i mierzące czas; ii) ustawienia czytnika ELISA; iii) daty ważności odczynników; iv) warunki przechowywania i inkubacji; v) roztwór substratu TMB powinien być bezbarwny; vi) czystość wody; vii) metody aspiracji i płukania.

STANDARYZACJA I IDENTYFIKOWALNOŚĆ METROLOGICZNA

Nie ma międzynarodowych i krajowych materiałów referencyjnych ani referencyjnych procedur pomiarowych dla analitu kalprotektyny w próbce kału. Wartości kalibratorów w zestawie BÜHLMANN fCAL® ELISA są określone na podstawie wielokrotnych pomiarów przy zastosowaniu wewnętrznego materiału referencyjnego pochodzącego z ludzkiej surowicy i procedury pomiaru BÜHLMANN fCAL® ELISA. Stężenie kalprotektyny w wewnętrznym materiale referencyjnym ustanowiono przy zastosowaniu oczyszczonej MRP8/14 pochodzącej z ludzkich granulocytów jako główny materiał referencyjny.
95% przedział ufności łącznej niepewności kalibratorów produktu został określony jako niższy niż 13,3%, łączna niepewność kontroli produktu jest mniejsza niż 16,4%.

OBLICZANIE WYNIKÓW BADAŃ

Krzywa kalibracyjna

Zaleca się korzystanie z oprogramowania zdolnego do wykonania następujących obliczeń; odjęcie wartości OD ślepej próby (blank) z każdego dołka z kalibratorem, w celu obliczenia wartości kalibratora. Ustalić krzywą kalibracyjną przy użyciu 4-parametrowego dopasowania logistycznego (4 PL).

Kontrole i próbki

Zaleca się korzystanie z oprogramowania zdolnego do wykonania następujących obliczeń; odjęcie wartości OD ślepej próby (blank) z każdego dołka z kontrolą/ próbką. Oblicz stężenie kalprotektyny, w µg/g, dla kontroli/ próbki w każdym dołku, wykorzystując ustaloną krzywą kalibracyjną.

Zakres roboczy 10-600 µg/g

Jeżeli wybrano procedurę oznaczenia dla niższego zakresu ELISA, wówczas należy stosować kalibratory o stężeniach zgodnych z protokołem ELISA: 10, 30, 100, 300 i 600 µg/g kalprotektyny. Aby uzyskać ostateczny wynik, należy uwzględnić dodatkowe rozcieńczenia (jeżeli zastosowane jest inne rozcieńczenie niż 1:2500). Przykładowe dane umieszczono w tabela 12 i Rycina 1 (wyniki i krzywa kalibracyjna). Otrzymane wyniki i ilustracja krzywej kalibracyjnej są podawane tylko w celach demonstracyjnych. Krzywa kalibracyjna musi zostać wygenerowana do każdej analizy.

Zakres roboczy 30-1800 µg/g

Jeżeli wybrano procedurę oznaczenia dla rozszerzonego zakresu ELISA, wówczas należy stosować kalibratory o stężeniach zgodnych z protokołem ELISA: 30, 90, 300, 900 i 1800 µg/g kalprotektyny. Aby uzyskać ostateczny wynik, należy uwzględnić dodatkowe rozcieńczenia (jeżeli zastosowane jest inne rozcieńczenie niż 1:7500). Przykładowe dane umieszczono w tabela 15 i Rycina 3 (wyniki i krzywa kalibracyjna). Otrzymane wyniki i ilustracja krzywej kalibracyjnej są podawane tylko w celach demonstracyjnych. Krzywa kalibracyjna musi zostać wygenerowana do każdej analizy.

OGRANICZENIA

- Zestaw odczynników w zestawie BÜHLMANN fCAL® ELISA jest przeznaczony tylko do oznaczania kalprotektyny w próbce kału u człowieka.
- Wyniki badań powinny zostać interpretowane w połączeniu z dostępnymi informacjami o stanie klinicznym pacjenta i innymi badaniami diagnostycznymi.
- W celu monitorowania choroby IBD, zasugerowano, iż wielokrotne pomiary kalprotektyny w kale, wykonywane w odstępach do 4 tygodni, mają najlepszą dokładność diagnostyczną w przewidywaniu nawrotu klinicznego u pacjentów (ref. 19-20).
- Wyniki mogą nie mieć klinicznego zastosowania w przypadku dzieci do 4 roku życia, u których poziom kalprotektyny w kale jest nieznacznie podwyższony (ref. 21-24).
- U niektórych pacjentów przyjmujących leki z grupy NLPZ (NSAID) poziom kalprotektyny w kale będzie podwyższony.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

I. Rozróżnienie chorób organicznych od funkcjonalnych zaburzeń przewodu pokarmowego

Kategorie wyników oparte są na danych z badań klinicznych przeprowadzonych przez BÜHLMANN i są zaleceniami BÜHLMANN. Wszystkie wyniki testów należy interpretować w połączeniu z dostępnymi informacjami na temat objawów klinicznych pacjenta, historii choroby oraz innych wyników klinicznych i laboratoryjnych.

Progi kliniczne

Wyniki 58 próbek klinicznych od pacjentów ze zdiagnozowanym IBS i 131 próbek klinicznych od pacjentów ze zdiagnozowanym IBD, pochodzących z międzynarodowego badania klinicznego, przeanalizowano w celu uzyskania wartości opisanych w tabeli 4.

Stężenie kalprotektyny	Interpretacja	Kontynuacja
< 80 µg/g	Normalna	Brak
80 – 160 µg/g	Strefa szara/granica	Kontrola w ciągu 4 – 6 tygodni
> 160 µg/g	Podwyższona	Powtórzyć w razie potrzeby

Tabela 4

Wartości kalprotektyny poniżej 80 µg/g

Wartość kalprotektyny <80 µg/g nie wskazuje na stan zapalny przewodu pokarmowego. Pacjenci z niskim poziomem kalprotektyny prawdopodobnie nie będą potrzebować inwazyjnych zabiegów w celu ustalenia przyczyny zapalenia.

Wartości kalprotektyny od 80 do 160 µg/g

Średni poziom kalprotektyny w kale mieszczący się w zakresie od 80 do 160 µg/g, zwany szarą strefą, nie wskazuje bezpośrednio na aktywny stan zapalny, który wymagałby natychmiastowych badań inwazyjnych. Jakkolwiek, obecność stanu zapalnego, nie może być wykluczona. Zaleca się ponowną ocenę stężenia kalprotektyny w kale po 4 - 6 tygodniach w celu określenia stanu zapalnego.

Wartości kalprotektyny powyżej 160 µg/g

Stężenie kalprotektyny w kale wynoszące >160 µg/g wskazuje na naciek neutrofili w przewodzie pokarmowym, co może sygnalizować o występowaniu aktywnego stanu zapalnego. Zaleca się przeprowadzenie odpowiednich, dalszych badań wykonanych przez specjalistów w celu postawienia ogólnej diagnozy klinicznej.

Ocena kliniczna

Zdolność testu BÜHLMANN fCAL® ELISA do rozróżniania pacjentów z IBD i innymi niezapalnymi zaburzeniami przewodu pokarmowego, w tym IBS, została przetestowana w badaniu klinicznym obejmującym łącznie 337 pacjentów, w tym dorosłych i dzieci. U 135 pacjentów zdiagnozowano IBD (choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub nieokreślone zapalenie jelita grubego), u 130 pacjentów zdiagnozowano IBS, a 72 pacjentów zgłosiło się z bólem brzucha i/lub biegunką lub innymi niezapalnymi chorobami przewodu pokarmowego (tabela 5). Ostateczna diagnoza została poparta wynikami endoskopowymi oraz innymi wynikami klinicznymi.

W różnicowaniu między IBD a stanami niezapalnymi związanymi z przewodem pokarmowym, w tym IBS, można osiągnąć czułość kliniczną wynoszącą 93,3% przy 80 µg/g i swoistość kliniczną 83,7% przy 160 µg/g. Analiza krzywej ROC dała AUC 0,923 (tabela 6).

W różnicowaniu IBD i IBS można osiągnąć czułość kliniczną wynosi 93,3% przy 80 µg/g i swoistość kliniczną 85,4% przy 160 µg/g. Analiza krzywej ROC dała AUC 0,933 (tabela 8).

Optymalną kombinację punktu odcięcia (ang. cut-off) dla tych pul pacjentów można określić za pomocą analizy krzywej ROC przy stężeniach kalprotektyny wynoszących 80 µg/g i 160 µg/g, która jest nieco bardziej rygorystyczna niż kombinacja **bardziej czułego dolnego odcięcia wynoszącego 50 µg/g** z niższą wydajnością swoistości oraz **górnej granicy 200 µg/g** przy nieco niższej czułości (tabela 7 i 9).

II. Monitorowanie IBD

Progi i ocena kliniczna

Oznaczanie kalprotektyny w kale jest niezawodnym i prostym sposobem wspomagania monitorowania pacjentów z zdiagnozowanym IBD (ref. 7-18).

Korelację pomiędzy poziomem kalprotektyny a stanem zapalnym błony śluzowej jelit pacjentów, według ocen endoskopowych, określono w trzech niezależnych badaniach z użyciem testów kalprotektyny BÜHLMANN (tabela 10). Wartość diagnostyczną kalprotektyny w przewidywaniu remisji klinicznej i nawrotu choroby, w zależności od objawów pacjenta, wskaźników aktywności klinicznej, nieplanowanej potrzeby eskalacji terapii, hospitalizacji lub nagłego przypadku, określono w trzech badaniach z użyciem testów kalprotektyny BÜHLMANN (tabela 11).

Przedstawione kategorie wyników są zaleceniami, a ich ustalenie opiera się na skondensowanej wiedzy o opublikowanych wartościach granicznych i badaniach skuteczności klinicznej. Zaleca się, aby lekarze ustalili indywidualne wartości progowe pacjenta, określając wyjściowy poziom kalprotektyny w okresie remisji choroby.

Wartości kalprotektyny poniżej 100 µg/g

Stężenie kalprotektyny w kale poniżej 100 µg/g może wiarygodnie wskazywać pacjentów z niskim ryzykiem nawrotu klinicznego, w remisji endoskopowej, u których można uniknąć inwazyjnych zabiegów endoskopowych (ref. 7-18).

Wartości kalprotektyny pomiędzy 100 a 300 µg/g

Stężenie kalprotektyny w kale między 100-300 µg/g może wskazywać na konieczność ściślejszej kontroli w kolejnym okresie w celu oceny tendencji rozwoju choroby.

Wartości kalprotektyny powyżej 300 µg/g

Stężenie kalprotektyny w kale powyżej 300 µg/g należy powtórzyć, a jeśli zostanie potwierdzony podwyższony poziom, należy przystąpić do dalszych procedur badawczych (ref. 7-18).

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

Charakterystyka działania zestawu BÜHLMANN fCAL® ELISA, o ile nie zaznaczono inaczej, została ustalona przy użyciu ręcznej metody ekstrakcji.

Zakres roboczy: 10 - 600 µg/g

Powtarzalność: 1,9 – 8,0% CV

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna: 5,5 – 14,0% CV

Powtarzalność i precyzję wewnątrzlaboratoryjną określono zgodnie z wytycznymi EP05-A2 CLSI, przy zastosowaniu projektu badania: 22 dni x 2 powtórzenia. Zbadano 10 wyekstrahowanych próbek kału o stężeniach kalprotektyny mieszczących się w zakresie 13,2 – 501,4 µg/g (tabela 13).

Granica wykrywalności (LoD): 4,2 µg/g

Granica wykrywalności została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP17-A CLSI, z odsetkiem wyników fałszywie dodatnich (α) poniżej 5% i fałszywie ujemnych (β) poniżej 5% na podstawie 240 oznaczeń, z 80

powtórzeniami próby ślepej (bufor ekstrakcyjny) i 160 powtórzeniami niskiego poziomu; i **LoB 0,29 µg/g.**

Granica oznaczalności (LoQ): 9,8 µg/g

LoQ ustalono na podstawie danych uzyskanych w ramach wewnątrzlaboratoryjnego badania precyzji, w tym dodatkowej próbki kału o stężeniu 7,4 µg/g. LoQ określono jako stężenie kalprotektyny, przy którym nieliniowe dopasowanie danych dotyczących całkowitej precyzji przecinało cel precyzji przy 20% CV.

Liniowość: 10 - 600 µg/g

Liniowość testu BÜHLMANN fCAL® ELISA została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP06-A CLSI. Dopuszczalne było maksymalne odchylenie od liniowości ±20%. Dla wartości poniżej 75 µg/g dopuszczalna była różnica bezwzględna mniejsza niż ±15 µg/g (tabela 14).

Dokładność/Odzysk
Błąd całkowity: -1,1%;
Dolna granica: -17,5%,
Górna granica: 15,4%

Do czterech negatywnych wyekstrahowanych próbek kału dodano wzrastające ilości kalprotektyny z próbek surowicy. Wyniki przedstawiono na rycinie 2.

Wysoka dawka efektu Hook'a

Próbki o teoretycznych stężeniach do ~60 000 µg/g można oznaczać bez ograniczania zakresu pomiarowego testu.

Zakres roboczy: 30 - 1800 µg/g

Powtarzalność: 1,7 – 5,8% CV
Precyzja wewnątrzlaboratoryjna: 3,1 – 9,4% CV

Powtarzalność i precyzję wewnątrzlaboratoryjną określono zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI, przy zastosowaniu projektu badania: 10 dni x 2 serie x 4 powtórzenia. Zbadano 7 wyekstrahowanych próbek kału o stężeniach kalprotektyny mieszczących się w zakresie 38,5 - 918,0 µg/g (tabela 16).

Precyzja między partiami: 4,2 – 9,7% CV

Precyzja pomiędzy partiami określono zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI, przy zastosowaniu projektu badania: 3 partie x 5 dni x 5 powtórzeń, wykorzystano model składowych wariancji efektów losowych. Zbadano 6 wyekstrahowanych próbek kału o stężeniach kalprotektyny mieszczących się w zakresie 46,4 – 1476,1 µg/g (tabela 17).

Odtwarzalność (badanie oceny precyzji w wielu miejscach): 6,4 – 19,0% CV

Odtwarzalność określono zgodnie z wytycznymi EP05-A3 CLSI, przy zastosowaniu projektu badania: 3 miejsca x 2 operatorów x 5 dni x 2 serie na dzień x 4 powtórzenia. W badaniu zastosowano trzy różne partie odczynników. Przetestowano pięć połączonych ekstraktów z próbek kału o stężeniach kalprotektyny w zakresie od 42,1 µg/g do 1053,3 µg/g (tabela 18).

Granica wykrywalności (LoD): 12,6 µg/g

Granica wykrywalności została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP17-A2 CLSI, z odsetkiem wyników fałszywie dodatnich (α) poniżej 5% i fałszywie ujemnych (β) poniżej 5% na podstawie 120 oznaczeń, z 60 powtórzeniami próby ślepej (bufor ekstrakcyjny) i 60 powtórzeniami niskiego poziomu; i **LoB 8,3 µg/g.**

Granica oznaczalności (LoQ): 21,3 µg/g

LoQ ustalono zgodnie z wytycznymi CLSI EP17-A2 na podstawie 60 oznaczeń i celu precyzji 20% CV.

Liniowość: 30 - 1800 µg/g

Liniowość testu BÜHLMANN fCAL® ELISA została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP06-A CLSI. Dopuszczalne było maksymalne odchylenie od liniowości ±20%. Dla wartości poniżej 75 µg/g dopuszczalna była różnica bezwzględna mniejsza niż ±15 µg/g (tabela 19).

Dokładność / Odzysk: 96,4 – 102,2%

Do siedmiu ekstraktów z próbek kału o poziomach kalprotektyny obejmujących zakres pomiarowy 46,5 – 990,2 µg/g dodano 180 µg/g kalprotektyny w materiale kalibracyjnym. Spajkowanie przeprowadzono przy 10% objętości ekstraktu próbki. Do próbek „podstawowych" dodano odpowiednią ilość buforu inkubacyjnego. Próbki „podstawowe" i „podstawowe + spajkowanie" mierzono w trzech powtórzeniach (tabela 20).

Analiza wstępna

Charakterystykę wydajności testu BÜHLMANN fCAL® ELISA w odniesieniu do procedur przedanalitycznych ustalono w zakresie roboczym 30 – 1800 µg/g.

Odtwarzalność ekstrakcji – CALEX® Cap: 7,9 – 16,9%

Odtwarzalność ekstrakcji została wyznaczona zgodnie z wytycznymi EP05-A3, przy zastosowaniu projektu badania: 3 partie zestawu CALEX® Cap x 4 ekstrakcje x 4 powtórzenia. Zbadano 5 klinicznych próbek kału, wliczając w to próbki o konsystencji: stałej, półstałej i płynnej, o stężeniach kalprotektyny mieszczących się w zakresie 42,5 – 2949,9 µg/g (tabela 21).

Porównanie metod CALEX® Cap vs. ekstrakcja ręczna
Odchylenie przy 80 µg/g: 5,9% (95% CI: 1,4 – 12,2%)
Odchylenie przy 160 µg/g: 12,0% (95% CI: 7,8-17,0%)
Średnie odchylenie: 10,1% (95% CI: 5,7 – 14,5%)

Porównanie metod określono zgodnie z wytycznymi EP09-A3. Wyekstrahowano 241 próbek klinicznych przy wykorzystaniu jednej partii urządzenia CALEX® Cap. Wartości referencyjne, z końcowym przedziałem stężenia kalprotektyny wynoszącym 30,5 – 1496,6 µg/g, ustalono względem ekstraktów otrzymanych za pomocą metody ręcznej ekstrakcji. Dla obu metod przeprowadzono pojedyncze ekstrakcje i oznaczenia testowe. Odchylenie określono za pomocą regresji liniowej Passinga-Babloka i analizy Blanda-Altmana (tabela 22 i 23).

SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

Wrażliwość testu BÜHLMANN fCAL® ELISA na doustne środki farmaceutyczne, suplementy diety, hemoglobinę oraz mikroorganizmy enteropatologiczne określono zgodnie z wytycznymi CLSI EP07-A2 przy użyciu rozszerzonego zakresu roboczego. Odchylenie w wynikach przekraczające 10% uznano za zakłócenie. Nie wykryto zakłóceń w przypadku substancji podanych w tabeli 24, do wskazanych stężeń. Nie wykryto zakłóceń w przypadku mikroorganizmów enteropatologicznych wymienionych w tabeli 25 do wskazanych ilości jednostek tworzących kolonie (CFU) na mL ekstraktu próbki kału.

TABELE I RYCINY

Badania kliniczne

Badanie kliniczne - odróżnienie choroby organicznej od choroby czynnościowej przewodu pokarmowego

Ostateczna diagnoza	Rozkład wyników pacjentów w liczbach (w procentach) w zakresach diagnostycznych BÜHLMANN fCAL® ELISA			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Suma
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Inne GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabela 5

IBD vs. nie-IBD	Kliniczny punkt decyzyjny	
	80 µg/g	160 µg/g
Czułość (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specyficzność (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)	

Tabela 6

IBD vs. non-IBD	Kliniczny punkt decyzyjny	
	50 µg/g	200 µg/g
Czułość (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specyficzność (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%)

Tabela 7

IBD vs. IBS	Kliniczny punkt decyzyjny	
	80 µg/g	160 µg/g
Czułość (95% CI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specyficzność (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)	

Tabela 8

IBD vs. IBS	Kliniczny punkt decyzyjny	
	50 µg/g	200 µg/g
Czułość (95% CI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specyficzność (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%)

Tabela 9

nie-IBD – IBS + inne GI

CI (ang. confidence interval) – przedział ufności

PPV (ang. positive predictive value) - dodatnia wartość predykcyjna

NPV (ang. negative predictive value) - ujemna wartość predykcyjna

ROC AUC (ang. area under receiver operating characteristic curve) – obszar pod krzywą charakterystyki pracy odbiornika

Badania kliniczne – monitorowanie IBD

Aktywność kalprotektyny[1] vs aktywność NZJ określona na podstawie wyników badań endoskopowych	Badanie 1 Hiszpania (ref. 9)	Badanie 2 Hiszpania (ref. 10)	Badanie 3 Australia, Nowa Zelandia (ref.11)
Liczba pacjentów i dane demograficzne	89 (CD[2]) Wiek: 32-58 44% mężczyzn	123 (UC[3]) Wiek: 18-85 66,4% mężczyzn	99 (CD[2] after resection) Wiek: 29-47 46,5% mężczyzn
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80,3%	53%

Tabela 10

[1] Badanie 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL i Quantum Blue® fCAL high range
Badanie 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
[2] CD = pacjenci z chorobą Crohn`a
[3] UC = pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

Badania kliniczne – monitorowanie IBD

Kalprotektyna[1] vs remisja lub nawrót w przyszłości	Badanie 4 Wielka Brytania (ref. 12)	Badanie 5 Hiszpania (ref. 13)	Badanie 6 Hiszpania (ref. 14)
Liczba pacjentów i dane demograficzne	92 (CD[2]) 38% mężczyzn	30 (CD[2]) terapia adalimuma-bem Wiek: 24-64 43,3% mężczyzn	33 (CD[2]) 20 (UC[3]) terapia infliximabem Wiek: 18-68 47,2% mężczyzn
Czas obserwacji po pomiarze kalprotektyny	12 miesięcy	4 miesięcy	12 miesięcy
Pacjenci z nawrotem klinicznym po obserwacji	11%	30%	23%
Cut-off	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96,8%	100%	96,1%
PPV	27,6%	75%	68,7%

Tabela 11

[1] Badanie 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
Badanie 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range
[2] CD =pacjenci z chorobą Crohn`a
[3] UC = pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

TABELE I RYCINY

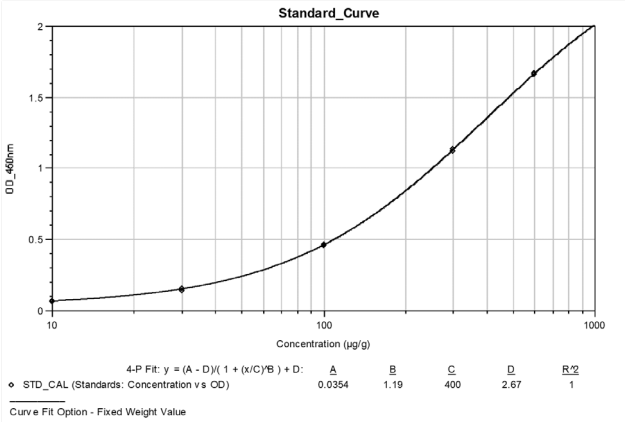
Procedura zakresu niskiego 10-600 µg/g

Przykładowe wyniki

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

Tabela 12

Przykładowa krzywa kalibracyjna



Rycina 1

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Nr próbki	n	Stężene [µg/g]	Powtarzalność		Precyzja między dniami		Całkowita precyzja	
			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%

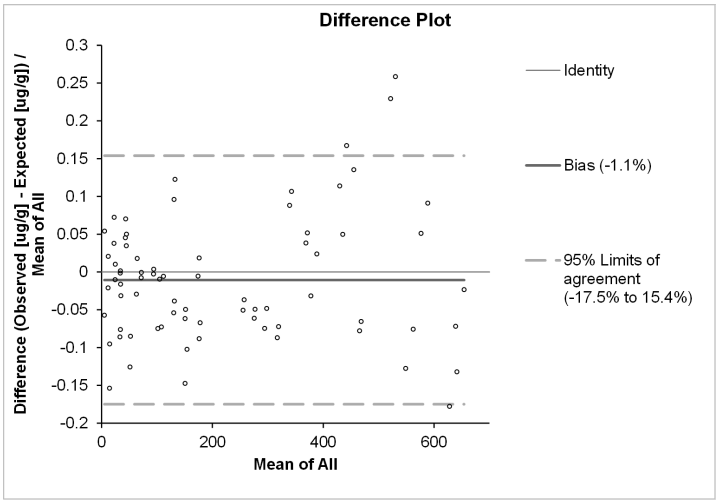
Tabela 13

Liniowość

ID	Zakres pomiarowy testu	R^2	Wartość p dla współczynnika nieliniowego	Zakres liniowy
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

Tabela 14

Odzysk



Rycina 2

TABELE I RYCINY

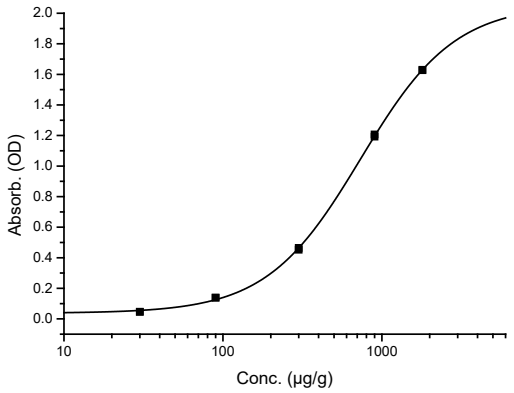
ZAKRES ROZSZERZONY 30-1800 µg/g

Przykładowe wyniki

	Stężenie [µg/g]	Absorpcja [OD]
Kalibrator A	30 30	0,047 0,046
Kalibrator B	90 90	0,138 0,140
Kalibrator C	300 300	0,464 0,452
Kalibrator D	900 900	1,207 1,192
Kalibrator E	1800 1800	1,627 1,630
Blank średnia		0,057
Kontrola niska		0,147 0,162
Kontrola wysoka		0,618 0,618

Tabela 15

Przykładowa krzywa kalibracyjna



Rycina 3

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

ID	Średnia [µg/g]	n	Powtarzalność SD	Powtarzalność %CV	Precyzja między seriami SD	Precyzja między seriami %CV	Precyzja pomiedzy dniami SD	Precyzja pomiedzy dniami %CV	Precyzja wewnątrzlaboratoryjna SD	Precyzja wewnątrzlaboratoryjna %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%

Tabela 16

Precyzja pomiędzy partiami

ID	Średnia [µg/g]	n	Precyzja w przebiegu jednej serii SD	Precyzja w przebiegu jednej serii %CV	Precyzja między dniami SD	Precyzja między dniami %CV	Precyzja między partiami SD	Precyzja między partiami %CV	Całkowita precyzja SD	Całkowita precyzja %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%

Tabela 17

Odtwarzalność – badanie oceny precyzji w wielu lokalizacjach

ID	Średnia [µg/g]	n	Precyzja między operatorami SD	Precyzja między operatorami %CV	Precyzja między miejscami SD	Precyzja między miejscami %CV	Całkowita precyzja (Odtwarzalność) SD	Całkowita precyzja (Odtwarzalność) %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%

Tabela 18

Liniowość

ID	Testowy zakres pomiarowy [µg/g]	R^2	Wartość p dla współczynnika nieliniowego	Zakres liniowy [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

Tabela 19

Dokładność / Odzysk

ID	Średnia linia bazowa [µg/g]	Oczekiwana linia bazowa + skok [µg/g]	Obserwowana linia bazowa + skok [µg/g]	Wskaźnik odzysku [%]
#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%

Tabela 20

TABELE I RYCINY

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI - ANALIZA WSTĘPNA

Powtarzalność ekstrakcji – CALEX® Cap

ID	Średnia [µg/g]	Wewnątrz jednej ekstrakcji		Między ekstrakcjami		Między Partiami		Całkowita precyzja	
		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%

Tabela 21

Porównanie metod – ekstrakcji CALEX® Cap i ręcznej ekstrakcji

Analiza Bland-Altman		
Średnie odchylenie (95%)	**Niższe LoA (95% CI)**	**Wyższe LoA (95% CI)**
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabela 22

Analiza regresji Passing-Bablok				
Nachylenie (95% CI)	**Odcięcie (µg/g) (95% CI)**	**Odchylenie przy 80 µg/g (95% CI)**	**Odchylenie przy 160 µg/g (95% CI)**	**r**
1,181 (1,120, 1,235)	-9,7 (-16,0, -2,4)	5,9% (1,4%, 12,2%)	12,0% (7,8%,16,9%)	0,948

Tabela 23

SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

Doustne środki farmaceutyczne, suplementy odżywcze i hemoglobina

Nazwa handlowa	Aktywny składnik	Stężenie mg/50 mg kału
gyno-Tardyferon	Siarczan żelaza (II) (zawiera 0,35 mg kwasu foliowego)	0,11
Prednisone	Prednizon	0,31
Imurek	Azatiopryna	0,19
Salofalk	Mesalamina; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazolum	0,18
Asacol	Mesalamina; 5-ASA	2,50
Vancocin	Wankomycyna	2,00
Sulfamethoxazole	Sulfam etoksazol	1,60
Trimethoprim	Mleczan trimetoprimu	0,35
Ciproxine	Cyprofloksacyna	1,25
Vitamin E	DL-α-Octan tokoferolu	0,30
Bion 3	3 probiotyki (107 CFU): *lactobacillus gasseri* PA16 / 8, *bifidobacterium bifidum* MF 20/5, *bifidobacterium longum* SP07 / 3, 12 witamin: 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), Biotyna (150 µg), kwas foliowy(200 µg), niacyna (18 mg), kwas pantotenowy (6 mg) i 7 minerałów: jodyna(100 µg), żelazo (5 mg), cynk (5 mg), selen (30 µg), chrom (25 µg), mangan (1,2 mg), molibden (25 µg)	1,06
Hemoglobin	Hemoglobina	1,25

Tabela 24

Enteropatologiczne mikroorganizmy

Nazwa	Stężenie końcowe (CFU/mL ekstraktu kału)
Escherichia coli	$9,5 \times 10^7$
Salmonella enterica subsp. enterica	1×10^9
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia	$5,4 \times 10^7$
Citrobacter freundii	$9,7 \times 10^7$
Shigella flexneri	$1,5 \times 10^8$
Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica	$1,6 \times 10^8$

Tabela 25

REFERENCJE

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

KALPROTEKTYNA ELISA

Wstępnie powlekana płytka mikrotitracyjna

↓ *Przemywanie 2x buforem płuczącym ≥300 µL*

po 100 µL buforu inkubacyjnego, kalibratorów, kontroli lub rozcieńczonych próbek

↓ *Inkubować 30 (+ 5) minut w temp. 18-28 °C na wytrząsarce do płytek ~450 rpm*

Przemywać 3x buforem płuczącym ≥300 µL

dodać 100 µL oznakowanego enzymu

↓ *Inkubować 30 +/-5 minut w 18-28 °C na wytrząsarce do płytek ~450 rpm*

Przemywać 5x *buforem płuczącym ≥300 µL*

Dodać 100 µL roztworu substratuTMB

↓ *Inkubować* przez *15 +/-2 minut w 18-28 °C na wytrząsarce do płytek ~450 rpm*

dodać 100 µL roztworu stop solution

→ **Odczytać absorbancję przy 450 nm (w ciągu 30 minut)**

CZAS OTRZYMANIA WYNIKU: 75 MINUT

LISTA ZMIAN

Data	Wersja	Zmiana
2022-11-16	A3	Aktualizacja rozdziału *Ostrzeżenia i środki ostrożności* Uwzględnienie wartości niepewności kalibratora *oraz uzasadnienie wewnętrznej standaryzacji w rozdziale Standaryzacja* Aktualizacja sformułowań i uproszczenie rozdziału *Charakterystyka Wydajności* Aktualizacja rozdziału *Symbole* Nowe informacje patentowe Włączenie numeru jednostki notyfikowanej – procedura oceny zgodności wg IVDR 2017/746

RAPORTOWANIE WYPADKÓW W PAŃSTWACH CZŁONKOWSKICH UE

W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek poważnego wypadku z udziałem tego urządzenia, nalezy bezzwłocznie zgłosić to producentowi I właściwemu organowi państwa człownkowskiego.

USZKODZENIE PRZESYŁKI

Jeżeli produkt został uszkodzony należy poinformować o tym dystrybutora.

SYMBOLE

Firma BÜHLMANN stosuje symbole i oznaczenia wymienione i opisane w normie ISO 15223-1. Dodatkowo stosowane są następujące symbole i oznaczenia:

Symbol	Wyjaśnienie
MP	Płytka mikrotitracyjna
BUF WASH 10X	Koncentrat buforu płuczącego Wash buffer (10x)
BUF INC	Bufor inkubacyjny
CAL A - CAL E	Kalibrator A - E
CONTROL L	Kontrola niska
CONTROL H	Kontrola wysoka
EL	Oznakowany enzym
SUBS TMB	Substrat TMB
SOLN STOP	Roztwór Zatrzymujący reakcję

Części zestawu są chronione patentem EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

CE 0123