

## 1 ÚČEL POUŽITÍ

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** je kvantitativní metoda na stanovení kalprotektinu ve vzorcích stolice, a tudíž ho lze použít u pacientů jako pomůcku při identifikaci orgánového onemocnění tenkého střeva, tlustého střeva nebo žaludku, pro stanovení aktivity onemocnění a monitorování reakce na léčbu u pacientů sulcerativní kolitidou nebo Crohnovou chorobou.

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** byl validován na vzorky stolice.

**Tento test je určen pro *in vitro* diagnostické použití.**

## 2 PODSTATA

Různé typy orgánových onemocnění v gastrointestinálním traktu mohou způsobit poškození linií střevního epitelu (slizniční vrstvy). Takové poškození může mít rozsah od zvýšené permeability sliznice až k zánětům a ulceracím. Obsah střeva je bohatý na bakterie a další mikroorganismy vylučované substance, které mohou být toxické nebo chemotaktické, tj. stimulující leukocyty, zejména polymorfonukleární neutrofilní granulocyty (PMN), k migraci do průsvitu střeva, kde uvolňují svůj obsah, včetně antimikrobiálních substancí jako je kalprotektin. Tento protein tvoří až 60% z celkových proteinů v cytoplasmě PMN<sup>2)</sup> a může být spolehlivě zjišťován ve vzorcích stolice skladované až sedm dní při pokojové teplotě<sup>3)</sup>.

Kalprotektin je 36 kilodaltonový protein vazající zinek a vaník.<sup>4)</sup> Produkovaný PMN, monocyty a dlaždicovými epitelálními buňkami (kromě těch v normální pokožce)<sup>5,6)</sup>. Po navázání vaníku může odolat degradaci leukocytickými a mikrobiálními enzymy<sup>3,7)</sup>. Soutěžením s různými enzymy o omezené lokální množství zinku, může kalprotektin inhibovat mnoho enzymů závislých na zinku<sup>8)</sup> a tudíž zabíjet mikroorganismy nebo zvířecí a lidské buňky v kultuře<sup>9,10)</sup>. Různé typy onemocnění, například bakteriální infekce, revmatoidní artritida a karcinom, vedou k aktivaci PMN a zvýšeným hladinám kalprotektinu v plazmě, cerebrospinální tekutině, synoviální tekutině, cervikulární tekutině, moči nebo jiných lidských vzorcích<sup>1)</sup>.

Zvláštní význam má to, že koncentrace kalprotektinu ve stolici odpovídá množství PMN, migrujících do průsvitu střeva<sup>11)</sup>, a že může být spolehlivě detekován také v malém (menším než jeden gram) randomizovaném vzorku stolice<sup>3,12)</sup>. Navíc orgánové onemocnění střeva dává silný signál kalprotektinu, tj. zvýšení je pravidelně pět až několik tisíckrát vyšší než horní reference u zdravých jedinců<sup>3,13,14,15)</sup>, což indikuje intestinální zánět.

Zánětlivé onemocnění střeva (IBD), tj. ulcerativní kolitida a Crohnova choroba, se může objevit od raného dětství do pozdní dospělosti a diagnóza se často opozdí z důvodu vágních symptomů nebo neochoty provést endoskopii a biopsii. **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** může přispět ke včasné diagnóze IBD vzhledem k tomu, že test je při aktivním IBD obvykle pozitivní.

Funkční poruchy, jako syndrom dráždivého střeva (IBS), nezvyšují koncentraci fekálního kalprotektinu, avšak organické abdominální poruchy, jako IBD, je zvyšují. Pacienti s organickými a funkčními abdominálními poruchami mohou mít podobné symptomy a samotné klinické vyšetření nemusí být dostatečné pro zjištění specifické diagnózy. Další diagnostické postupy jsou komplexní, drahé a mohou vystavit pacienta bolesti a dalším rizikům. Test stolice na kalprotektin je jednoduchou, neinvazivní, levnou a objektivní metodou, která může pomoci s výběrem pacientů na další vyšetření, jako je endoskopie. Abdominální symptomy jsou velmi běžné, jak u dětí, tak u dospělých, a negativní výsledek testování s **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** může s vysokou pravděpodobností vyloučit zánětlivá střevní onemocnění<sup>13)</sup>.

Vyhojení sliznice je optimálním výsledkem léčby IBD a test kalprotektinu ve stolici může prokázat, zda toho bylo dosaženo. Mnoho pacientů s IBD v klinické remisi s normální hladinou C-reaktivního proteinu (CRP) má stále pokračující zánět<sup>16)</sup>, odrážející zvýšený kalprotektin ve stolici. Tito pacienti mají zvýšené

riziko relapsu během několika měsíců<sup>17)</sup>. Pokud se dosáhne vyhojení sliznice, bude se riziko relapsu a potřeba operace břicha redukovat<sup>18,19)</sup>. Normalizace hladiny kalprotektinu znamená, že bylo dosaženo vyhojení sliznice<sup>20)</sup>. Riziko a závažnost vedlejších efektů léčby by mělo být zváženo proti riziku pokračujícího zánětu, vážného klinického relapsu a komplikací.

Význam dosažení vyhojení sliznice je předmětem mnoha vědeckých prací<sup>21-29)</sup> a článků<sup>30-35)</sup>.

### 3 PRINCIP TESTU

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** je založen na přípravě extraktu stolice s použitím našeho patentovaného extrakčního pufru na stolici (Faecal Extraction Buffer). Hladina kalprotektinu se určí testováním extraktu ELISA testem (enzyme-linked immunoassay) specifickým pro kalprotektin.

Při ELISA testu se vzorky a standardy inkubují v oddělených mikrotitračních jamkách, potažených monoklonálními protilátkami, které vážou kalprotektin. Po inkubaci a promytí jamek se nechá navázaný kalprotektin reagovat s enzymem značenými, imunoafinitně purifikovanými, pro kalprotektin specifickými protilátkami. Po této reakci je enzymaticky vázané množství v mikrotitračních jamkách přímo úměrné množství kalprotektinu ve vzorku nebo standardu, což se stanoví po inkubaci se substrátem za vzniku barevného produktu. Intenzita barvy je stanovena absorbancí s použitím ELISA destičkového readeru a je úměrná koncentraci kalprotektinu ve standardech a vzorcích. Toto stanovení je kalibrováno pomocí kalprotektinu purifikovaného z extraktu leukocytů.

### 4 MATERIÁLY

#### 4.1 Reagencie a komponenty dodané v kitu

- **MTP** **Koutovaná Mikrotitrační destička:** 12 stripů, 8 jamek na stripu, potažená afinitně purifikovanými monoklonálními myšimi protilátkami, specifickými pro kalprotektin. Destička se skladuje v uzavřeném sáčku s vysoušedlem.
- **DIL 5x** **Ředící pufr na vzorek (5x konc.)** \*\*\*: 1 x 20 ml, 5x koncentrovaný, k naředění destilovanou/deionizovanou vodou; pH 8.0 ± 0.2, žlutě zbarvený roztok, lahvička s modrým víčkem.
- **WASH|BUF 20x** **Promývací roztok (20x konc.)** \*: 1 x 50 ml, 20x koncentrovaný, k naředění destilovanou/deionizovanou vodou, pro promytí mikrotitračních jamek; pH 7.8 ± 0.2, čirý roztok, lahvička s bílým víčkem.
- **FEC|EXTR|BUF 2,5x** **Extrakční pufr na stolici (2.5x konc.)** \*\*: 2 x 90 ml, 2.5x koncentrovaný, k naředění destilovanou/deionizovanou vodou; pH 8.0 ± 0.2, čirý roztok, lahvičky s bílým víčkem.
- **CAL|A - F** **Standardy kalprotektinu** \*\*\*: 6 ampulek s 1.0 ml, k přímému použití; žlutě zbarvené roztoky, s různobarevnými víčky:
 

Standard A: modré víčko	0	ng/ml
Standard B: zelené víčko	7.8	ng/ml
Standard C: žluté víčko	31.3	ng/ml
Standard D: červené víčko	62.5	ng/ml
Standard E: bílé víčko	125	ng/ml
Standard F: černé víčko	500	ng/ml
- **CTR|LOW|CTR|HIGH** **Kontroly kalprotektinu “Low - nízká” a “High- vysoká”** \*\*\*: 2 ampuleampule s 1.0 ml, k přímému použití; žlutě zbarvený roztok; Ctr Low: ampule s hnědým víčkem; Ctr High: ampule s fialovým víčkem.

- **CONJ Enzymový konjugát \*\*\*\*:** 13 ml, alkalickou fosfatázou značené, imunoafinitně purifikované polyklonální králičí protilátky proti kalprotektinu, k přímému použití; červeně zbarvený roztok, 25 ml reagenční zkumavka Dynex s bílým víčkem.
  - **SUB pNPP Roztok enzymového substrátu (pNPP):** 13 ml, k přímému použití; čirý až nažloutlý roztok, neprůhledná lahvička se žlutým víčkem.  
*Pozn.:* Pokud použijete přístroj Dynex, musí se substrát přenést do 25ml reagenční zkumavky Dynex před provedením testu.
- \*                   Obsahuje <0.1 % Kathon  
\*\*                   Obsahuje <0.1% azid sodný  
\*\*\*                  Obsahuje <0.1 % Kathon a <0.1% azid sodný  
\*\*\*\*                 Obsahuje 0.02% metylizothiazolon a 0.02% bromonitrodioxan
- 2 krycí fólie
  - 1 příbalová informace (Instrukce na použití se může stáhnout z [www.calpro.no](http://www.calpro.no))
  - 1 plán destičky

#### 4.2 Materiály a vybavení nutné ale nedodané.

- Destilovaná/deionizovaná voda
- Extrakční pomůcky (viz sekce 7.1.1 a 7.1.2)
- Jednorázové, odlomitelné inokulační kličky (při použití odvažovací metody v sekci 7.1.3)
- Citlivá digitální váha (40 – 150 mg) (při použití odvažovací metody v sekci 7.1.3)
- Jednorázové polystyrénové šroubovací zkumavky, 5 ml (při použití odvažovací metody v sekci 7.1.3)
- Vortex mixer
- Jednorázové zkumavky na ředění vzorků: Eppendorf zkumavky nebo podobné (pokud se provádí ruční stanovení)
- Pipety na objemy 10 – 1000 µl (pokud se stanovení provádí ručně)
- Opakovací pipety nebo multikanálová pipeta, 100 µl (pokud se stanovení provádí ručně)
- Mikrodestičková promývačka nebo multikanálová pipeta, 300 µl (pokud se stanovení provádí ručně)
- Třepačka destiček (500 – 700 rpm) (pokud se stanovení provádí ručně)
- Minutka (pokud se stanovení provádí ručně)
- Mikrodestičkový reader, filtr 405 nm (pokud se stanovení provádí ručně)
- 1M NaOH (stop roztok; případně)

## 5 STABILITA A SKLADOVÁNÍ

Neotevřené reagentie jsou při skladování při teplotě 2 – 8°C, stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

Otevřené destičky, reagentie a koncentrované pufrы jsou stabilní až tři měsíce, při skladování při teplotě 2 – 8°C.

Pokud se připraví do čistých nádob, mohou být pracovní roztoky (1x) promývacího roztoku, pufru na ředění vzorku a pufru na extrakci stolice skladování při teplotě 2 – 8°C až jeden měsíc.

Nevystavujte vysoké teplotě.

## 6 PŘÍPRAVA

Všechny reagenty, vzorky a kontroly je třeba před započítáním testu vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 25°C).

### 6.1. Koutované mikrotitrační destičkové stripy

Destičkové stripy k přímému použití jsou potažené afinitně purifikovanými monoklonálními myšími protilátkami, specifickými pro kalprotektin. Nepoužité stripy je třeba vyjmout z rámečku a ihned znovu uzavřít do aluminiové fólie s vysoušedlem. Skladujte při teplotě 2 – 8°C

### 6.2. Pufr na ředění vzorku

Naředte 5x koncentrovaný pufr na ředění vzorku přidáním 1 části (20 ml) ke 4 částem (80 ml) destilované/deionizované vody do čisté nádoby na finální objem 100 ml. Dobře promíchejte. Naředěný pufr na ředění vzorku skladujte v uzavřené nádobce při teplotě 2 – 8°C.

*Pozn.:* Pokud použijete automat Dynex DS2 ELISA, musí se pufr na ředění vzorku přenést do 25 ml reagenční zkumavky Dynex před započítáním testu.

### 6.3. Promývací roztok

Naředte 20x koncentrovaný promývací roztok přidáním 1 části (50 ml) k 19 částem (950 ml) destilované/deionizované vody do čisté nádoby na finální objem 1000 ml. Dobře promíchejte. Skladujte uzavřený naředěný promývací roztok v uzavřené nádobce při teplotě 2 – 8°C.

### 6.4. Pufr na extrakci stolice

Naředte 2.5x koncentrovaný pufr na ředění stolice přidáním 1 části (90 ml) k 1.5 části (135 ml) destilované/deionizované vody do čisté nádoby na konečný objem 225 ml. Dobře promíchejte. Skladujte naředěný pufr v uzavřené nádobce při teplotě 2 – 8°C.

### 6.5. Standardy a kontroly

Ampule, označené jako Standard A – F, a také kontroly, každá o obsahu 1.0 ml, jsou k přímému použití. Koncentrace kalprotektinu je uvedena na štítku každé ampule. Vložte je přímo do automatů Dynex DS2 a DSX ELISA.

### 6.6. Enzymový konjugát

Zkumavka obsahuje 13 ml alkalickou fosfatázou (ALP) značené, imunoafinitně purifikované králičí protilátky proti kalprotektinu, v pufru se stabilizátory, konzervačními látkami a inertním červeným barvivem. Roztok je k přímému použití. Zkumavky se přímo vloží do automatu Dynex DS2 ELISA.

### 6.7. Roztok enzymového substrátu (pNPP)

Lahvička obsahuje 13 ml *p*-nitrofenylfosfátového roztoku (pNPP). Roztok je určen k přímému použití a musí se uchovávat v originální neprůhledné lahvičce.

*Pozn.:* Při použití automatu Dynex DS2 ELISA se musí roztok enzymového substrátu přenést do 25 ml reagenční zkumavky Dynex před započítáním testu.

## 7 POSTUP TESTU

### 7.1 Vzorky stolice

Jelikož je kalprotektin ve stolici velmi stabilní, mohou si pacienti odebrat malé množství vzorku stolice doma. Odeberte 1 – 5 g (asi jednu čajovou lžičku), dejte ji do vhodného čistého kontejneru a dodejte do laboratoře co nejdříve, nejpozději do pěti dnů. Pokud jej vložíte do kontejneru schváleného pro transport, může se zasílat obyčejnou poštou, tj. bez potřeby chlazení. Je třeba zabránit vystavení teplotě nad 30°C.

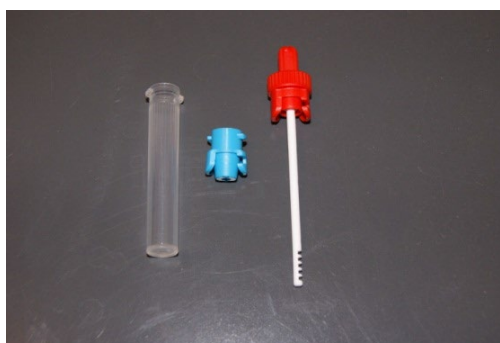
Vzorky také mohou být zmrazeny na  $-20^{\circ}\text{C}$  nebo níže, do doručení nebo odeslání poštou. Zmrazené vzorky se musí rozmrazit a vytemperovat na pokojovou teplotu ~~místnosti~~ před extrakcí a testováním.

*Pozn.:* Před začátkem extrakce je třeba vzorky stolice dobře zhomogenizovat např. použitím špachtle, před odebráním malého množství na extrakci.

Na extrakci je doporučeno použít Calpro EasyExtract® nebo originální odvažovací metodu viz kapitola 7.1.1 a 7.1.2.

### 7.1.1 Extrakce s použitím Calpro EasyExtract™

Instrukce na použití: přečtěte si prosím příbalovou informaci na produkt č. CAL0510/CAL0510L



(Calpro AS, produkt č. CAL0510)

### 7.1.2 Extrakce pomocí odvažovací metody (bez extrakční pomůcky)

1. Odvažte (vytárujte) prázdnou šroubovací zkumavku s inokulační kličkou.
2. Nabere **přibližně** 100 mg (40 až 120 mg) stolice pomocí inokulační kličky a dejte ji do zkumavky se šroubovacím víčkem. Vyvarujte se odběru pevných nestrávených materiálů, jako jsou vlákna a semena.
3. Zvažte zkumavku s kličkou obsahující stolici, čímž zjistíte čistou váhu stolice.
4. Odlomte nebo odstříhnete konec kličky a nechte ji na dně zkumavky.
5. Přidejte extrakční pufr na váhu: poměr objemu 1:50, např. 4.9 ml pufru ke 100 mg stolice. Zkumavku uzavřete.
6. Silně promíchejte 30 sekund na vortexu.
7. Pokračujte v míchání na třepačce (asi 1000 rpm) po  $30 \pm 5$  minut s kličkou uvnitř zkumavky jako míchátkem.
8. Nechte pár minut stát na usazení částic a opatrně pipetujte z povrchu zkumavky. Není nezbytná centrifugace, ale může se krátce zcentrifugovat, pokud je nutné zbavit roztok částic.
9. Extrakt, který představuje ředění 1:50 (váha:objem) vzorku stolice, je nyní připraven na ředění a testování.
10. Pro uchování přeneste asi 0.5 ml do nové zkumavky. Extrakty lze uchovávat při teplotě  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  nejméně pět dní nebo zmrazené pod  $-20^{\circ}\text{C}$  až 2 roky <sup>48)</sup>.

## 7.2 Doporučené rozložení destičky

	1	2	3	4	atd.	
<b>A</b>	Standard A 0 ng/ml	Standard E 125 ng/ml	Vzorek 1	Vzorek 5		
<b>B</b>	Standard A 0 ng/ml	Standard E 125 ng/ml	Vzorek 1	Vzorek 5		
<b>C</b>	Standard B 7.8 ng/ml	Standard F 500 ng/ml	Vzorek 2	Vzorek 6		
<b>D</b>	Standard B 7.8 ng/ml	Standard F 500 ng/ml	Vzorek 2	Vzorek 6		
<b>E</b>	Standard C 31.3 ng/ml	Kontrola "Low"	Vzorek 3	Vzorek 7		
<b>F</b>	Standard C 31.3 ng/ml	Kontrola "Low"	Vzorek 3	Vzorek 7		
<b>G</b>	Standard D 62.5 ng/ml	Kontrola "High"	Vzorek 4	Vzorek 8		
<b>H</b>	Standard D 62.5 ng/ml	Kontrola "High"	Vzorek 4	Vzorek 8		

Doporučené rozložení ELISA destičky pro standardy, kontroly a vzorky s použitím manuální metody. Je doporučeno duplicitní stanovení jamek pro zvýšení správnosti výsledku. Plná destička pojme 40 vzorků.

## 7.3 Postup ELISA

Následující postup je pro manuální zpracování. Validované protokoly pro automat Dynex DS2 ELISA jsou dostupné na vyžádání. Pamatujte, že se ampule standardů a pozitivních kontroly, a také zkumavka konjugátu, se vkládají přímo do automatu DS2 ELISA.

### Procedurální poznámky

- Příprava: Přečtěte si prosím pečlivě protokol testu *před* jeho provedením. Přesnost výsledku závisí na striktním dodržení popsaného protokolu testu. Před započítáním testu je třeba si rozvrhnout rozložení všech standardů, vzorků a kontrol, např. pomocí listu dodaného v kitu. Zvolte požadovaný počet mikrotitračních stripů. Nepoužité stripy je třeba znovu uzavřít do aluminiového obalu a uložit podle postupu v sekci 6.1.
- Je doporučeno ředění extraktu stolice 1:100. Toto ředění předurčuje výsledky vzorku mezi 22.2 mg/kg (LoQ) a 2500 mg/kg ve stolici. Extrakty s vyššími hodnotami kalprotektinu mohou být zředěny více (> 1:100) a testovány znovu, pokud je vyžadována hodnota. Extrakty s nižšími hodnotami kalprotektinu se mohou zředit méně (1:50). Upravený faktor ředění se musí vzít do úvahy při konverzi z ng/ml na mg/kg.
- Proveďte všechny kroky postupně a bez prodlevy mezi kroky.
- Použit lze jen čisté jednorázové pipetovací špičky pro dávkování každého standardu, kontroly a vzorku.
- K dosažení nejlepších výsledků by měly vždy být testovány duplikáty standard, kontrol a vzorky pacientu.

### Postup ELISA

1. Naředte extrahované vzorky stolice 1:100 (např. 10  $\mu$ l vzorku + 990  $\mu$ l ředicího pufru) a dobře promíchejte na vortexu.
2. Dejte 100  $\mu$ l každého standardu, kontroly a naředěného vzorku duplicitně do jamek; viz doporučené rozvržení destičky v Sekci 8.

3. Překryjte destičku krycí fólií a inkubujte při pokojové teplotě  $40 \pm 5$  min na horizontální třepače destiček (asi 500 – 700 rpm).
4. Na konci inkubační doby odstraňte tekutinu a promyjte jamky přidáním 300  $\mu$ l promývacího roztoku do každé jamky. Odstraňte co nejvíc tekutiny a opakujte, dokud nejsou provedena celkem tři promytí. Pokud se použijte promývačka destiček, ověřte, že nejsou blokovány sondy pro plnění a odsávání, aby se zajistilo efektivní promytí všech jamek. Po konečném promytí překlopte destičku a vyklepněte obrácené jamky na absorbční ubrousek pro odstranění zbývajícího promývacího roztoku.
5. Před použitím lehce promíchejte obsah enzymového konjugátu (netřepejte). Dejte 100  $\mu$ l konjugátu do každé jamky, preferujte použití opakovací nebo multikanálové pipety.
6. Překryjte destičku krycí fólií a inkubujte při pokojové teplotě  $40 \pm 5$  min na horizontální třepače destiček (asi 500 – 700 rpm).
7. Opakujte promývací kroky podle popisu výše, třikrát se 300  $\mu$ l promývacího roztoku na jamku.
8. Dejte 100  $\mu$ l enzymového roztoku substrátu do každé jamky, preferujte použití opakovací nebo multikanálové pipety.
9. Inkubujte destičku při pokojové teplotě (bez třepání) po dobu 20 – 30 minut, chraňte před světlem.
10. Případně: Přidejte 100  $\mu$ l 1M NaOH stop roztoku do každé jamky, pokud je požadovaná fixní doba inkubace.
11. Krátce destičku protřepejte (2-3 sekundy) a odečítejte optickou denzitu (OD) při 405 nm na ELISA readeru.

## 8 KONTROLA KVALITY

- V každém běhu musí být zahrnuta nová standardní křivka.
- Pozitivní kontroly je třeba zahrnout do každého běhu. Hodnota kontrol musí ležet v rozmezí hodnot uvedených na štítcích lahvíček.
- Hodnota OD u Standardu F (500 ng/ml) musí být  $\geq 1.6$  a hodnota OD u Standardu A (0 ng/ml) musí být  $\leq 0.25$ . Reprezentativní standardní křivka je na obrázku 1.

## 9 HODNOCENÍ

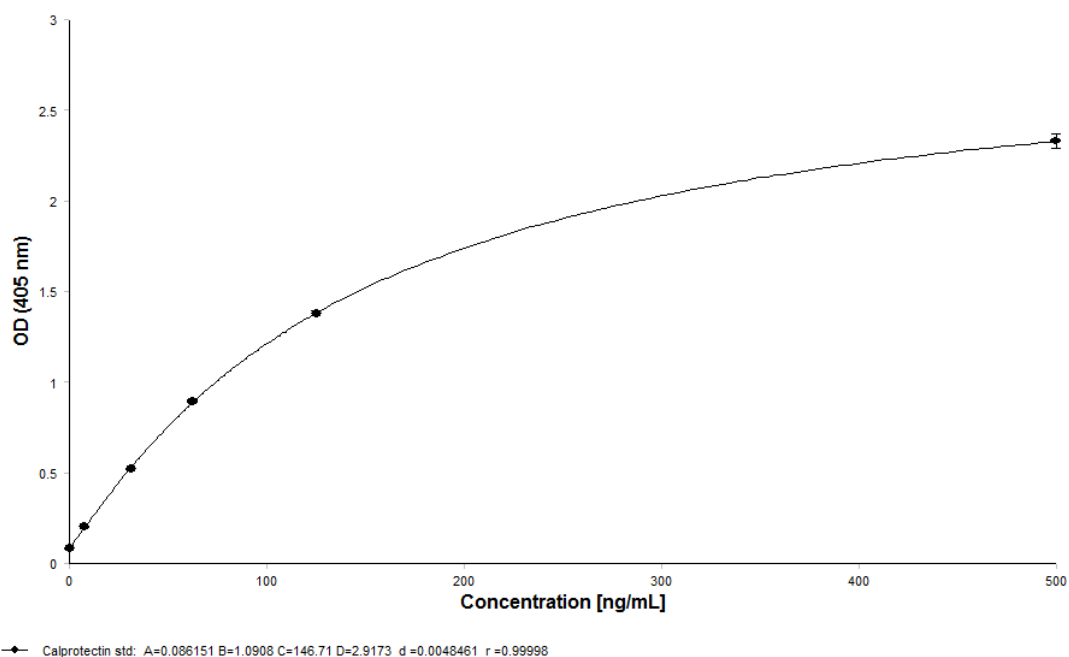
Výpočet koncentrace kalprotektinu v ~~pacientských~~ vzorcích stolice pacienta:

1. Vypočítejte průměrné hodnoty OD všech duplicitních jamek (standardů a vzorků).
2. Vyneste hodnotu každé koncentrace standardu (ng/ml) na ose x proti své hodnotě OD na ose y, abyste získali standardní křivku. **Je doporučen 4-parametrový fit** (viz obr. 1 níže). Pokud je nutná logaritmická osa x, musí se použít hodnota 0.001 ng/ml pro standard A (0 ng/ml).
3. Použijte kalibrační křivku na stanovení koncentrace kalprotektinu v nařaděných vzorcích (ng/ml) na základě jejich hodnot OD.
4. **Vynásobte 5x koncentraci kalprotektinu (ng/ml) v nařaděných vzorcích stolice, abyste je převedli na kalprotektin v mg/kg v původním vzorku stolice.**

Tento faktor koriguje celkové zředění 1:5000 (1:50 během procesu extrakce a následných 1:100 při naředění extraktu) a převádí hodnotu z ng/ml na mg/kg.

*Příklad: Pokud má naředěný extrahovaný vzorek hodnotu 100 ng/ml, byla koncentrace v originálním vzorku stolice  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

Pozn.: Pokud byly extrakty naředěny více než je doporučených 1:100, musí se další ředící faktor vložit do výpočtu.



Obr. 1: Reprezentativní standardní křivka s použitím 4-parametrového fitu.



## 10 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Následující hodnoty kalprotektinu ve vzorcích stolice pro klinické posouzení byly uvedeny v publikované literatuře<sup>3, 36, 37</sup>:

<b>Normální hodnota</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Pozitivní hodnota</b>	> 50 mg/kg
<b>Šedá zóna*</b>	50-100 mg/kg
<b>Aktivní, symptomatické zánětlivé onemocnění střev</b>	200 – 40,000 mg/kg

\*) pacienti s výsledky, ležícími v šedé zóně, je doporučeno opakovat pro zlepšení diagnostické přesnosti testu.

Pamatujte, že nemůže být diagnóza založena pouze na výsledku testu. Při diagnóze se musí vzít do úvahy klinická historie a symptomy.

Na základě vědecké literatury a publikovaných klinických studií<sup>36, 37</sup>, lze očekávat následující klinické provedení při detekci zánětlivého onemocnění střev versus poruch funkce:

Cut-off	Senzitivita (95% CI)	Specifická (95 % CI)	Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
50 mg/kg	0.90-0.99	0.70-0.77	0.31-0.44	0.98-1.00
100 mg/kg	0.89-0.99	0.84-0.90	0.46-0.62	0.98-1.00

## 11 SPECIFIKACE A PROVEDENÍ

**Pozn.:** Všechny studie ověření návrhu byly provedeny manuálním testováním extrahovaných vzorků stolice (ředění 1:100).

**Přesnost:** Studie přesnosti uvnitř a mezi stanoveními byla provedena třemi laboratořemi na stejných vzorcích se dvěma různými šaržemi kitu Calprolab.

Přesnost uvnitř stanovení (Intra-assay - repeatability), extrakty stolice (n=20)

Koncentrace ve stolici (mg/kg)	%CV
29.9	7.3
166.9	4.4
349.2	4.4
583.0	6.0
1138.5	14.0
1795.7	9.6

Přesnost mezi stanoveními (Inter-assay - total), extrakty stolice (n=80)

Koncentrace ve stolici (mg/kg)	%CV
33.5	14.6
175.1	7.1
583.0	6.0
1136.5	14.0
1795.7	9.6

#### Shoda mezi metodami extrakce; odvažovací metoda versus EasyExtract® \*

Záchyt: -6.7, sklon: 1.05, R= 0.97

\*) Další detaily a data provedení ohledně extrakce stolice viz návod na použití pro EasyExtract® (prod. č. CAL0510).

#### Výtěžnost:

Stolice: 85 – 105%; testováno s extraktem stolice s přidavkem purifikovaného kalprotektinu v pěti různých hladinách.

#### Limit kvantifikace, limit detekce a limit blanku:

- Limit blanku (LoB): 0.54 mg/kg
- Limit detekce (LoD): 4.36 mg/kg
- Limit kvantifikace (LoQ): 22.15 mg/kg

Limit kvantifikace, detekce a blanku byl proveden podle postupu CLSI EP17A-Ed2

#### Shoda s

##### a) Phical Test (Eurospital)

Phical Test versus CALP0170: Akceptovatelná korelace a shoda byla zjištěna mezi vzorky analyzovanými v obou stanoveních:

- Záchyt: -1.8, (95%CI: -6,6—4.6), sklon: 0.94 (95% CI: 0.84-1.03), R = 0.92

##### b) Calpro Calprotectin ELISA (prod. č. CAL0100)

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) versus CALP0170: Akceptovatelná korelace a shoda byla zjištěna mezi vzorky analyzovanými v obou stanoveních:

- Záchyt: 4.3 (95%CI: -0.84 – 14.3), sklon: 0.89 (95% CI: 0.85-0.93), R = 0.93

#### Interference

Nebyla pozorována žádná interference u ELISA s běžně používanými léčivými v seznamu níže:

Prednisolon, Imurel, Salazopyrin, Trimetoprim, Ciprofloaxcin, Pentasa, Asacol, Ibux, multivitaminy a lidský hemoglobin

Dále byl testován S001A12 pro možnou zkříženou reaktivitu a nebyla reaktivita pozorována.

### Rozmezí měření

22.2-2500 mg/kg

Linearita matrice

**-Lineární rozmezí: 36 až 1755 mg/kg**

Studie linearity matrice byla provedena podle CLSI postupu EP06-Ed2.

## 12 OMEZENÍ PROCEDURY

- Diagnóza by neměla být založena na výsledku jednotlivého testu. Diagnóza také musí zohlednit klinickou historii a symptomy.

## 13 KONTRAINDIKACE

- Falešně negativní výsledky se mohou objevit u pacientů s granulocytopenií z důvodu potlačení kostní dřeně.
- Pacienti léčení azathioprinem mohou také mít granulocytopenii, vedoucí k falešné negativitě.
- Někteří pacienti, kteří berou nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID), budou mít zvýšené hodnoty kalprotektinu ve stolici.  
Výsledky nemusí být klinicky aplikovatelné u dětí pod 2 roky věku, jelikož často mají zvýšenou hladinu kalprotektinu ve stolici.
- Ostatní střevní onemocnění, včetně mnoha gastrointestinálních infekcí a kolorektálního karcinomu, mohou vést ke zvýšeným hladinám kalprotektinu.
- Kalprotektin ve stolici je nespecifický indikátor zánětu ve střevě. Zvýšené hodnoty neznamenají nezbytně, že má pacient aktivní IBD. Je třeba vždy hodnotit celý klinický obraz

## 14 UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ

- Podle Článku 1, par. 2b Evropské direktivy 98/79/EC je *in vitro* diagnostický zdravotnický prostředek výrobcem určen k zajištění vhodnosti, výkonu a bezpečnosti produktu. Tudiž se musí striktně dodržet postup testu, informace, upozornění a varování v instrukci na použití. Použití testovacích kitů na analyzátoru a podobných zařízeních musí být validováno. Jakékoliv změny designu složení a postupu testu a také jakékoliv použití v kombinaci s jinými produkty, neschválené výrobcem, není autorizováno; za takové změny je odpovědný sám uživatel. Výrobce neodpovídá za falešné výsledky a incidenty z těchto důvodů. Výrobce neodpovídá za jakékoliv výsledky vizuální analýzy patientských vzorků.
- Pouze pro *in vitro* diagnostické použití.
- Všechny složky lidského původu, použité na výrobu těchto reagentů, byly testovány na protilátky proti HIV, HCV a HBsAg, a byly shledány nereaktivní. Nicméně je třeba všechny materiály považovat za potenciálně infekční.
- Nezaměňujte reagentie nebo stripy různých výrobních šarží.
- Nepoužívejte reagentie jiných výrobců s reagentiemi z tohoto testovacího kitu.
- Nepoužívejte reagentie po datu expirace na obalu. Nepoužívejte pracovní promývací roztok po 1 měsíci od přípravy.

- Používejte pouze čisté pipetovací špičky, dávkovače a laboratorní nádobí.
  - Na prevenci zkřížené kontaminace nezaměňujte šroubovací víčka na vialkách reagensů.
  - Ihned po použití ampule uzavřete, abyste zabránili odpařování a mikrobiální kontaminaci.
  - Po prvním otevření a následném uchovávání před dalším použitím ověřte mikrobiální kontaminaci lahvíček s konjugátem, standardy a kontrolami.
  - K zabránění zkřížené kontaminace a falešně zvýšených výsledků pipetujte standardy, kontroly a extrakty vzorků stolice, a dispenzujte konjugát a substrát na dno jamek mikrodestičky, bez vyšplouchnutí.
  - Některé reagensie obsahují azid sodný, méně než 0.1% (váž./obj.) a/nebo méně než 0.1% Kathonu.
  - Uchovávejte roztok substrátu v originální tmavé lahvičce; roztok musí být čirý až slabě nažloutlý. Před použitím lehce promíchejte.
- **CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** je určen pro použití kvalifikovaným personálem, který je školený na správnou laboratorní praxi.

## 15 POKYNY K LIKVIDACI

Rezidua chemikálií a přípravků jsou obecně považována za nebezpečný odpad. Likvidace tohoto druhu odpadu je regulována národními zákony a nařízeními. Kontaktujte vaše místní autority ohledně společností nakládajících s odpadem, které vám dají pokyny, jak s nebezpečným odpadem nakládat.

## 16 REFERENCE






- 1) Johnes B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50:113-123.
- 2) Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p. 187-210
- 3) Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798.
- 4) Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134: 1-6.
- 5) Dale I et al.: Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. *American J of Clin Pathology* 1985; 84: 24-34
- 6) Brandtzaeg P et al.: Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *American J of Clin Pathology* 1987; 87: 700-707.
- 7) Fagerhol MK: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: M74-M79.
- 8) Isaksen B and Fagerhol MK: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 289-292.
- 9) Steinbakk M et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336: 763-765.
- 10) Yui S et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukaemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudates cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58: 650-658.
- 11) Røseth AG et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54
- 12) Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292: 41-54.
- 13) Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
- 14) Bunn SK et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33: 14-22.
- 15) Bjarnason I and Sherwood R: Fecal calprotectin: A significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Paediatric Gastroenterology Nut* 2001; 33: 11-13

- 16) Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. *Internist* 2010;51:1492-1498
- 17) Tibble JA et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.
- 18) Schnitzler F et al.: Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1295-1301
- 19) Björkesten CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, Sep 21
- 20) Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58:176-80
- 21) Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. *Med Clin North Am*. 2010;94:1-18
- 22) Pineton de Chambrun G et al.: Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(1):15-29
- 23) Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:338-346
- 24) Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics*, 2010;11(3):421-437
- 25) Lin MV et al.: What is the optimal therapy for Crohn's disease: step-up or top-down? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):167-180
- 26) Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010;15(2):309-322
- 27) Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? *Dig Dis* 2010;28(3):548-555
- 28) Schwartz M and Regueiro M: Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011 Feb;13(1):95-100
- 29) Ha C and Kornbluth A: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(6):471-478.
- 30) Fagerberg UL et al.: Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(4):414-420
- 31) Rutgeerts P et al.: Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2009;136(5):1182-1197
- 32) Jalocha L et al.: Mucosal healing in Crohn disease. *Pol Merkur Lekarski*. 2009;26(155):554-555;
- 33) Baert F et al.: Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2010;138(2):463-468
- 34) Allez M and Lémann M: Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2626-2632
- 35) Lasson A: Calprotectin in feces a well-documented marker of gastrointestinal inflammation. Indicates disease intensity--normalization of values predict mucosal healing. *Läkartidningen*, 2010;107(143):2645-2649
- 36) Sander J et al.: Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*. 1984 Jun;44(4): 357-62
- 37) Golden BE et al.: Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1996 Feb;74(2):136-9
- 38) Berntzen HB et al.: The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(2): 74-82
- 39) Haga HJ et al.: Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993; 2(1): 47-50
- 40) Madland TM et al.: Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol*. 2002;31(6):351-354
- 41) Frosch M et al.: Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2622-2626
- 42) Hammer HB et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1093-97
- 43) Arvesen K et al.: *Eur Heart J*. 1996 Aug;17 Abstr Suppl:1-646.
- 44) Katashima et al.: Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ Journal* 2010;74(4):741-8
- 45) Altwegg LA et al.: Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2007;28(8):941-8
- 46) Calpro AS Information letter, June 2012 (available upon request: [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no))

- 47) Johne B et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia, Scand J Gastroenterol 2001; 36: 291-296
- 48) Internal Design Verification Report: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027.2014-04-09

## 17 INFORMACE K OBJEDNÁVÁNÍ

Produkt č: CALP0170, CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP) (96 stanovení)

Tabulka symbolů	
	Výrobce
<b>IVD</b>	In vitro diagnostický prostředek
<b>LOT</b>	Číslo šarže
	Datum expirace
	Teplota skladování
<b>CE</b>	CE značka
<b>REF</b>	Katalogové číslo
	Viz příbalová informace
<b>MTP</b>	Mikrodestička
<b>CONJ</b>	Konjugát
<b>CAL</b>	Kalibrátor A-F
<b>CTR LOW</b>	Nízká kontrola
<b>CTR HIGH</b>	Vysoká kontrola
<b>DIL 5x</b>	Pufr na ředění vzorku 5x koncentrovaný
<b>SUB pNPP</b>	pNPP roztok substrátu
<b>FEC EXTR BUF 2,5x</b>	Extrakční pufr na stolici (2,5x koncentrovaný)
	Obsahuje dostatek pro "n" testů

## 18 ZKRÁCENÝ POSTUP

### CalproLab® ELISA (ALP) pro analýzu kalprotektinu ve stolici

Viz sekce 7 – 9 v příbalové informaci s plným popisem praktických kroků.

#### Extrakce

- Provedte extrakci podle jedné z metod popsanych v sekci 7.1.1 a 7.1.2

#### ELISA (manuální postup)

- Naředte extrakty stolice 1:100 v pufru na ředění vzorku.
- Dejte 100 µl standardů, kontrol a vzorků na ELISA destičku.
- Inkubujte na třepačce destiček při pokojové teplotě po dobu 40±5 min.
- Promyjte jamky třikrát s 300 µl promývacího roztoku.
- Přidejte 100 µl ALP enzymového konjugátu do každé jamky.
- Inkubujte na třepačce destiček při pokojové teplotě za teploty místnosti po dobu 40±5 min.
- Promyjte jamky třikrát s 300 µl promývacího roztoku.
- Dejte 100 µl pNPP roztoku enzymového substrátu do každé jamky.
- Inkubujte zakryté po dobu 20 – 30 min.
- Případně:* dejte 100 µl 1M NaOH do každé jamky.
- Destičku třepete 2-3 sekundy a odečítejte hodnoty OD při 405 nm pomocí ELISA readeru.
- S použitím křivky 4-parametrového fitu vypočtete výsledky (ng/ml)
- mg/kg ve stolici = ng/ml × 5

Pro dotazy prosím kontaktujte [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

verze 09, 23.03.2023

**Výrobce:**

**Produkce v EU pro CALPRO AS**

CALPRO AS

Arnstein Arnebergs vei 30

N-1366 Lysaker, Norway

Tel: +47 67 43 01 34

mail@calpro.no

[www.calpro.no](http://www.calpro.no)