

## 1 POUŽITIE

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP)** je kvantitatívna metóda na stanovenie kalprotektínu vo vzorkách stolice a môže byť využitá ako pomoc pri identifikácii organických ochorení tenkého čreva, hrubého čreva alebo žalúdka, pri zistení aktivity ochorenia a pri sledovaní odpovede na liečbu u pacientov s ulceróznou kolitídou alebo Crohnovou chorobou.

**CALPROLAB® Calprotectin ELISA Test (ALP)** je validovaný pre vzorky stolice.

Test je určený pre *in vitro* použitie. .

## 2 ZHRNUTIE

Rôzne typy organických ochorení gastrointestinálneho traktu spôsobujú poškodenie vrstiev črevného epitelu (vrstva sliznice). Takéto poškodenie môže byť v rozsahu zvýšenia permeability slizníc až po zápal a tvorbu vredov. Obsah čriev je bohatý na baktérie a iné mikroorganizmy, produkujúce látky toxického alebo chemotaktického charakteru, ktoré, ako príklad, stimulujú leukocyty, obzvlášť polymorfonukleárne neutrofilné granulocyty (PMN), ktoré migrujú do čriev kde uvoľňujú svoj obsah spolu s antimikrobiálnymi látkami ako je kalprotektín. Tento proteín tvorí približne 60% zo všetkých proteínov v cytoplazme PMNs<sup>2)</sup> a dá sa spoľahlivo stanoviť vo vzorkách stolice, ktoré boli uskladnené počas siedmich dní pri teplote prostredia <sup>3)</sup>.

Kalprotektín je 36 kilodaltonový proteín viažuci vápnik a zinok<sup>4)</sup>, ktorý produkujú polymorfonukleárne neutrofilné leukocyty (PMN), monocyty a šupinaté epiteliálne bunky, odlišné od normálnych kožných<sup>5,6)</sup>. Po naviazaní vápnika pomáha odolávať degradácii spôsobenej leukocytickými a mikrobiálnymi enzýmami<sup>3,7)</sup>. Súperením s rôznymi enzýmami obmedzujúcimi lokálne množstvá zinku, kalprotektín môže inhibovať množstvo od zinku závislých enzýmov<sup>8)</sup> a tým ničí mikroorganizmy alebo živočíšne a ľudské bunky v kultúre<sup>9,10)</sup>. Rôzne typy ochorení, ako napríklad bakteriálne infekcie, reumatická artritída alebo rakovina vedú k aktivácii PMN a zvýšeniu hladiny kalprotektínu v plazme, v cerebrospinálnej tekutine, v synoviálnej tekutine, v štrbinovej (crevicular) tekutine, v moči a ostatných ľudských vzorkách<sup>1)</sup>.

Dôležitý je fakt, že koncentrácia kalprotektínu v stolici koreluje s množstvom PMN migrujúcich do čriev<sup>11)</sup> a tak môže byť spoľahlivo stanovená aj pri malých (menej ako gram) náhodných vzorkách stolice<sup>3,12)</sup>. Okrem toho organické ochorenia čriev vykazujú silne kalprotektínový signál, rozdiel je pravidelne päť až niekoľko tisíc násobne vyšší v porovnaní so zdravými jedincami<sup>3,13,14,15)</sup> čo je indikátor intestinálneho zápalu.

Zápalové ochorenia čriev (IBD), ako napr. ulcerózna kolitída a Crohnova choroba sa môžu vyskytovať v rannom detstve až po pokročilý vek a vzhľadom na nejasné symptómy alebo odpor k uskutočneniu endoskopie či biopsie sa stanovenie diagnózy predlžuje. **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** môže prispieť k skoršiemu diagnostikovaniu zápalového ochorenia čriev, pretože je zvyčajne pozitívny v aktívnom IBD.

Funkčné poruchy ako syndróm dráždivého čreva nezvyšujú fekálnu koncentráciu kalprotektínu, ale organické brušné poruchy ako IBD áno. Pacienti s organickými a funkčnými brušnými poruchami môžu mať podobné symptómy a klinické vyšetrenie nemusí byť dostatočné na stanovenie špecifickej diagnózy. Ďalšie diagnostické procedúry sú komplexné, drahé a môžu byť pre pacienta bolestivé a riskantné. Test fekálneho kalprotektínu je CALP170

jednoduchá, neinvazívna, lacná a objektívna metóda, ktorá môže pomôcť s výberom pacientov na ďalšie vyšetrenie, ako napríklad endoskopia. Brušné príznaky sú veľmi bežné ako u detí tak aj u dospelých a negatívny výsledok zistený pomocou **CALPROLAB™Calprotectin ELISA (ALP)** môže s vysokou pravdepodobnosťou vylúčiť IBD<sup>13</sup>.

Hojenie sliznice je optimálny cieľ pre liečbu IBD a test kalprotektínu v stolici dokáže povedať, kedy je cieľ dosiahnutý. Mnoho IBD pacientov v klinickej remisii s normálnou hladinou C-reaktívneho proteínu (CRP) majú neustále prebiehajúci zápal<sup>16</sup>, ktorý sa prejavuje zvýšením fekálneho kalprotektínu. Takýto pacienti majú zvýšené riziko recidívy počas niekoľkých mesiacov<sup>17</sup>. Ak sa dosiahne hojenie sliznice, riziko recidívy a potreba veľkej brušnej chirurgie sa zníži<sup>18,19</sup>. Normalizácia úrovne kalprotektínu znamená, že hojenie sliznice bolo dosiahnuté<sup>20</sup>. Riziko a závažnosť nežiaducich účinkov liečby by mala byť v rovnováhe s rizikom ďalšieho zápalu, ťažkej klinickej recidívy a komplikácií.

Na význam dosiahnutia hojenia sliznice je zameraných niekoľko posudkov<sup>21-29</sup> a článkov<sup>30-35</sup>.

### 3 PRINCÍP TESTU

Test **CALPROLAB™Calprotectin ELISA (ALP)** je založený na príprave extraktu zo stolice použitím patentovaného fekálneho extrakčného pufru. Hodnota kalprotektínu je stanovená na základe testovania extraktu enzymatickým imunologickým testom (ELISA), ktorý je špecifický pre kalprotektín.

V teste ELISA sa vzorky a štandardy inkubujú na mikrotitračnej platničke, potiahnutej monoklonálnymi protilátkami proti kalprotektínu. Po inkubácii a premytí platničky, naviazaný kalprotektín reaguje s enzýmom-značenými, imunoafinitne čistenými kalprotektín špecifickými protilátkami. Po tejto reakcii, množstvo naviazaného enzýmu na mikrotitračnej platničke je proporcionálne k množstvu kalprotektínu vo vzorke alebo štandarde, ktoré je určené inkubáciou so substrátom pre daný enzým dávajúc farebné zafarbenie.

Intenzita zafarbenia je určená absorbanciou s použitím ELISA platničkového readeru a je úmerná koncentrácii kalprotektínu vo vzorkách alebo v štandardoch. Test je kalibrovaný použitím čisteného kalprotektínu z leukocytového extraktu.

## 4 MATERIÁLY

### 4.1. Reagenty a komponenty dodané v kite

- **MTP Mikrotitračná platnička (Coated microplate)**: 12 stripov, 8 jamiek na stripe, potiahnuté s afinitne purifikovanými monoklonálnymi myšacími protilátkami špecifickými pre kalprotektín. Platnička je skladovaná vo vzduchotesnom obale spolu s vysušacím prostriedkom.
- **DIL /5x Roztok na riedenie vzoriek\*\*\* (Sample Dilution buffer 5x konc.)\*\*\***: 1x 20 ml **5 x koncentrovaný**, nutnosť riediť s destilovanou/deionizovanou vodou, pH 8,0 +/- 0,2, žltý sfarbený roztok, fľaštička s modrým vrchnákom.
- **WASH/ BUF/ 20x Premývací roztok\* (Washing solution 20x konc.)\***: 1 x 50 ml, **20 x koncentrovaný**, nutné riediť destilovanou/deionizovanou vodou, na premývanie mikrotitračných jamiek; pH 7,8 +/- 0,2, čirý roztok, fľaštička s bielym vrchnákom.
- **FEC/EXTR/BUF/2,5x Extrakčný roztok\*\* (Fecal Extraction Buffer 2,5x konc.)\*\***, 2x90 ml, **2,5 x koncentrovaný**, nutnosť riediť destilovanou/deionizovanou vodou, pH 8,0 +/- 0,2, čirý roztok, fľaštička s bielym vrchnákom.

- **CAL A-F Calprotectin štandardy\*\*\* (Calprotectin Standards)**, 6 fľaštičiek po 1,0 ml roztoku, pripraveného k použitiu, žltý sfarbený roztok, fľaštičky s rôznymi uzávermi:
 

štandard A: modrý vrchnák	0 ng/ml
štandard B: zelený vrchnák	7,8 ng/ml
štandard C: žltý vrchnák	31,3 ng/ml
štandard D: červený vrchnák	62,5 ng/ml
štandard E: biely vrchnák	125 ng/ml
štandard F: čierny vrchnák	500 ng/ml
- **CTRL/LOW CTRL/HIGH Calprotectin kontroly „nízka“ a „vysoká“ (Calprotectin Controls “Low” and “High”)\*\***: 2 fľaštičky po 1,0 ml, pripravené k použitiu, žltý sfarbený roztok, **CTR Low** :fľaštička s hnedým uzáverom; **CTR High**: fľaštička s purpurovým uzáverom.
- **CONJ Enzymový konjugát\*\*\*\* (Enzyme Conjugate)**, 13 ml alkalickou fosfatázou značených, imunoafinitne čistených polyklonálnych králičích protilátok proti kalprotektínu, pripravený na použitie; červený roztok, 25 ml Dynex reakčná skúmavka s bielym uzáverom.
- **SUB/ pNPP Enzymový substrátový roztok (pNPP)**, 13 ml, pripravený k použitiu, čirý až slabozltý roztok, matná fľaštička so žltým uzáverom.

*Poznámka:* Ak používate Dynex reader/analyzátor, substrát musí byť premiestnený do 25 ml Dynex reakčnej skúmavky pred vykonaním testu.

- \* Obsahuje 0,1 % Kathonu
- \*\* Obsahuje <0,1 % Azidu sodného
- \*\*\* Obsahuje 0,1 % Kathonu a <0,1 % Azidu sodného
- \*\*\*\* Obsahuje 0,02 % methylisothiazolonu a 0,02 % bromonitrodioxanu

2 tesniace fólie

1 príbalový leták (návod na použitie nájdete a stiahnete na stránke [www.calpro.no](http://www.calpro.no))

1 pracovný list

#### 4.2 Ďalší požadovaný, ale nedodaný materiál

- Destilovaná/ deionizovaná voda
- Extrakčné skúmavky (pozrite kapitolu 7.1.1 a 7.1.2)
- Jednorázové, lámateľné inokulačné slučky (ak používate metódy váženia v kapitole 7.1.3)
- Citlivá digitálna váha (40 – 150 mg) (ak používate metódy váženia v kapitole 7.1.3)
- Jednorázové polystyrénové skúmavky so skrutkovacím uzáverom, 5 ml (ak používate metódy váženia v kapitole 7.1.3)
- Vortex
- Jednorázové skúmavky na riedenie vzorky: Ependorfky alebo podobné (ak sa test vykonáva manuálne)
- Pipety na dávkovanie objemov od 10 do 1000 µl (ak sa test vykonáva manuálne)
- Dávkovač alebo multi-kanálová pipeta, 100 µl (ak sa test vykonáva manuálne)
- Premývačka platničiek alebo multikanálová pipeta, 300µl. (ak sa test vykonáva manuálne)

- Trepáčka (500-700 rpm) (ak sa test vykonáva manuálne)
- Stopky (ak sa test vykonáva manuálne)
- Mikroplatničkový reader na odčítanie platničiek, filter 405 nm (ak sa test vykonáva manuálne)
- 1M NaOH (roztok na zastavenie reakcie STOP SOLUTION , voliteľné)

## 5 STABILITA A USKLADNENIE

Neotvorené kity skladované pri teplote 2 – 8 °C sú stabilné až do doby expirácie uvedenej na obale. Otvorené platničky, činidlá a koncentrované pufre sú stabilné po dobu **3 mesiacov** pri skladovaní pri teplote 2 – 8 °C.

Pracovné roztoky ako premývací roztok(1x), riediaci pufoer na vzorky a extrakčný pufoer pripravené v čistých nádobách môžu byť skladované pri teplote 2 – 8 °C po dobu **jedného mesiaca**.

Vyhňte sa vystaveniu reagentov vysokým teplotám.

## 6 PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Pred začatím testu je veľmi dôležité priviesť všetky reagenty, vzorky a kontroly na izbovú teplotu (18-25°C).

### 6.1. Potiahnuté mikrotitračné stripy (Coated Microtiter Plate Strips)

Stripy pripravené na použitie sú potiahnuté afinitne-purifikovanými monokanálnymi myšacími protilátkami špecifickými pre kalprotektín. Nepoužitú stripy by mali byť opätovne uzavreté do hliníkového obalu s vysušovacím prostriedkom. Uskladňujú sa pri 2 - 8°C.

### 6.2. Roztok na riedenie vzoriek (Sample Dilution Buffer)

Rozriedte 5x koncentrovaný roztok na riedenie vzoriek pridaním 1 dielu (20 ml) k 4 dielom (80 ml) destilovanej/deionizovanej vody na konečný objem 100 ml v čistej nádobke. Dobre premiešajte. Zriedený roztok na riedenie vzoriek skladujte v uzavretej nádobke pri 2 – 8°C.

Poznámka: Ak používate Dynex DS2 alebo DSX ELISA automat, roztok na riedenie vzoriek musí byť preliaty do 25ml Dynex reakčnej skúmavky pred vykonaním testu.

### 6.3. Premývací roztok (Washing Solution)

Rozriedte 20x koncentrovaný premývací roztok pridaním 1 dielu (50 ml) k 19 dielom (950 ml) destilovanej/deionizovanej vody v čistej nádobke na konečný objem 1000 ml. Dobre premiešajte. Zriedený premývací roztok skladujte v uzavretej nádobke pri 2 – 8°C.

### 6.4. Extrakčný pufoer na stolicu (Faecal Extraction Buffer)

Rozriedte 2,5x koncentrovaný Extrakčný pufoer na stolicu (Faecal extraction buffer) pridaním 1 dielu (90ml) k 1,5 dielu (135ml) destilovanej/deionizovanej vody v čistej nádobke, aby ste dosiahli 225 ml pracovného roztoku. Dobre premiešajte. Zriedený pufoer skladujte v uzavretej nádobke pri 2 – 8°C.

### 6.5. Štandardy a kontroly (Standards and controls)

Fľaštičky sú označené Štandard **A – F** a tak ako každá kontrola obsahuje po 1,0 ml roztoku pripraveného na použitie (*Ready to use*). Rôzne koncentrácie kalprotektínu sú označené na štítku fľaštičiek. Fľaštičky sa zmestia priamo do Dynex DS2 a DSX ELISA automatu.

### 6.6. Enzýmový konjugát (Enzyme conjugate)

Fľaštička obsahuje 13 ml roztoku alkalickéj fosfatázy (ALP) označenej imunoafinitne-purifikovanými králičími protilátkami proti kalprotektínu v pufrí so stabilizátorom, konzervantmi a inertného červeného farbiva. Roztok je pripravený k použitiu (*Ready to use*).

Fľaštička sa zmesť priamo do Dynex DS2 a DSX ELISA automatu.

### 6.7. Enzýmový substrátový roztok (pNPP) (Enzyme Substrate Solution)

Fľaštička obsahuje 13 ml p-nitrophenylphosphatového (pNPP) roztoku. Roztok je pripravený k použitiu, musí byť skladovaný v originálnom balení, v matnej fľaštičke.

*Poznámka:* Ak používate Dynex DS2 alebo DSX ELISA automat, enzýmový substrátový roztok musí byť preliaty do 25 ml Dynex reakčných skúmaviek pred vykonaním testu.

## 7 ODBER A PRÍPRAVA VZORIEK

### 7.1. Vzorky stolice

Vzhľadom k tomu, že kalprotektín je veľmi stabilný v stolici, pacienti môžu vzorky stolice zbierať doma. Zozbierajte 1 – 5 g (približne 1 čajovú lyžičku), dajte do vhodnej čistej odberovej nádoby a doručte čo najskôr do laboratória alebo v priebehu 4 dní. Vo vhodných prepravných nádobách môže byť doručená poštou (nie je nutné žiadne chladenie). Malo by sa vyhnúť vystaveniu vzoriek vysokým teplotám nad 30°C.

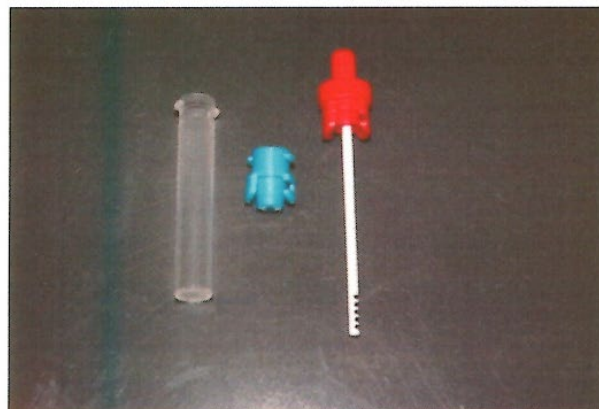
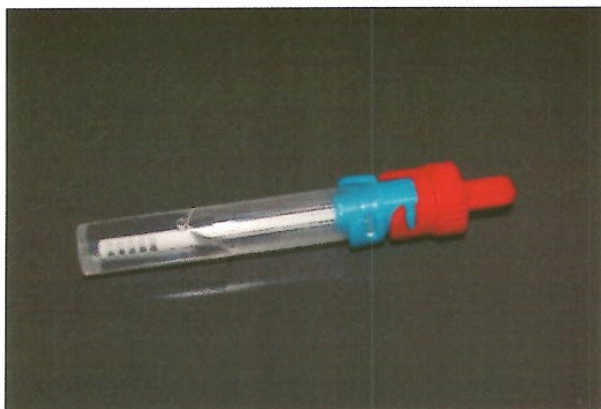
Vzorky sa môžu skladovať zmrazené pri -20°C alebo menej až pokiaľ nie sú doručené. Pred prípravou extraktu a testovania sa zmrazené vzorky musia rozmraziť na izbovú teplotu.

*Poznámka:* Predtým než sa odoberie malé množstvo vzorky na extrakciu mala by byť vzorka stolice homogenizovaná napríklad pomocou špachtličky

Pre extrakciu sa odporúča použiť Calpro EasyExtract™, alebo jednu z nasledovných metód (kapitola 7.1.1 a 7.1.2).

#### 7.1.1. Extrakcia pomocou Calpro EasyExtract™

Návod na použitie: prosím prečítajte si príbalový leták pre produkt č. CAL0510/CAL0510L



(Calpro AS, Product No. CAL0510)

#### 7.1.2 Extrakcia pomocou navažovacej metódy (bez extrakčnej súpravy)

1. Odvážte prázdnu skrutkovaciu skúmavku s inokulačnou slučkou.

2. Pomocou inokulačného slučky odoberte približne 100 mg (medzi 40 až 120 mg) stolice a vložte do uzatvárateľnej skúmavky. Pri odbere sa vyhnite pevnému, nestrávenému materiálu ako sú vlákna a semenka.
3. Odvážte skúmavku s inokulačnou slučkou, čo vám poskytne celkovú hmotnosť stolice.
4. Odlomte vrchnú manipulačnú časť inokulačnej slučky a spodok nechajte v skúmavke.
5. Pridajte pripravený extrakčný roztok v pomere 1:50 w/v (váha/objem) napríklad 4,9 ml k 100 mg stolice. Uzatvorte skúmavku.
6. Dôkladne premiešajte po dobu 30 s, použite vortex.
7. Pokračujte v miešaní na trepačke (približne 1000 rpm) po dobu 30 +/- 5 minút s ponechanou inokulačnou slučkou ako agitátorom.
8. Nechajte pár minút pôsobiť kvôli usadeniu častíc a potom opatrne pipetujte z vrchnej časti skúmavky. Centrifugácia nie je veľmi dôležitá, ale krátka centrifugácia môže byť vykonaná ak sa požaduje roztok bez usadenín.
9. Extrakt, ktorý predstavuje 1:50 riedenie (váha : objem) vzorky stolice, je teraz pripravený na riedenie a testovanie.
10. V prípade uskladnenia napipetujte asi 0,5 ml roztoku do novej tuby. Extrakty tak môžu byť skladované pri teplote 2 – 8 °C po dobu 5 dní, alebo mrazené pod -20 °C po dobu až 2 rokov<sup>48)</sup>.

## 7.2 ODPORÚČANÁ KONFIGURÁCIA PLATNIČKY

	1	2	3	4	atď.	
<b>A</b>	Štandard A 0 ng /ml	Štandard E 125 ng /ml	Vzorka 1	Vzorka 5		
<b>B</b>	Štandard A 0 ng /ml	Štandard E 125 ng /ml	Vzorka 1	Vzorka 5		
<b>C</b>	Štandard B 7,8 ng /ml	Štandard F 500 ng /ml	Vzorka 2	Vzorka 6		
<b>D</b>	Štandard B 7,8 ng /ml	Štandard F 500 ng /ml	Vzorka 2	Vzorka 6		
<b>E</b>	Štandard C 31,3 ng /ml	Nízka kontrola Control „Low“	Vzorka 3	Vzorka 7		
<b>F</b>	Štandard C 31,3 ng /ml	Nízka kontrola Control „Low“	Vzorka 3	Vzorka 7		
<b>G</b>	Štandard D 62,5 ng/ml	Vysoká kontrola Control „High“	Vzorka 4	Vzorka 8		
<b>H</b>	Štandard D 62,5 ng/ml	Vysoká kontrola Control „High“	Vzorka 4	Vzorka 8		

Odporúčaná konfigurácia ELISA platničky pre štandardy, kontroly a vzorky pri manuálnom vykonaní testu. Duplicitné jamky sú odporúčané pre zvýšenie spoľahlivosti výsledkov. Plná platnička predstavuje 40 vzoriek.

### 7.3 POSTUP STANOVENIA

Nasledovný postup je určený pre manuálne testovanie. Validované protokoly pre DYNEX DS2 a DSX ELISA automaty sú k dispozícii na požiadanie. Vezmite prosím na vedomie, že štandardy a pozitívne kontroly ako aj konjugáty z kitu (ready to use) sa zmestia priamo do DS2 a DSX ELISA automatov.

#### Procedurálne poznámky

- *Predtým* než prevediete test si pozorne prečítajte návod (protokol). Spoľahlivosť výsledkov závisí od presného dodržania tohto návodu. Pred začatím testu by mala byť naznačená schéma pipetovania mikrotitračnej platničky (Plate Layout) pre všetky vzorky a kontroly, napríklad pomocou pracovného listu, ktorý je súčasťou súpravy. Vyberte požadovaný počet mikrotitračných stripov. Nepoužitú stripu by sa mali uskladniť opäť v hliníkovom obale, viď kapitolu 6.1.
- Odporúča sa riedenie extraktov stolice 1:100. Toto riedenie stanoví výsledky vzoriek medzi 22,2 mg/kg (LoQ) a 2500 mg/kg v stolici. Extrakty s vyššími hodnotami kalprotektínu môžu byť nariadené viac ako (> 1:100) a znova testované ak sa takáto hodnota požaduje. Extrakty s nízkymi hodnotami kalprotektínu možno nariediť menej (1:50). Upravený riediaci faktor je potrebné vziať do úvahy pri prevode z ng/ml na mg/kg.
- Vykonávajúce všetky kroky v uvedenom poradí a bez zbytočných prestávok medzi jednotlivými krokmi.
- Čisté, jednorázové pipetovacie špičky by mali byť použité pre dávkovanie každého štandardu, kontroly a vzoriek.
- K dosiahnutiu najspoľahlivejších výsledkov, štandardy, kontroly a vzorky pacientov by mali testovať v duplikátoch.

#### ELISA pracovný postup

1. Rozriedte extrahované vzorky stolice 1:100 (10 µl vzorky + 990 µl roztok na riedenie vzoriek Sample Dilution Buffer) a dobre premiešajte vortexovaním.
2. Pridajte 100 µl z každého štandardu, kontroly a rozriedenej vzorky v duplicitnom stanovení do jamiek (viď odporúčanú platničkovú konfiguráciu v časti 8).
3. Prikryte platničku s tesniacou fóliou a inkubujte na horizontálnej trepačke pri izbovej teplote počas 40 +/- 5 min. pri 500 – 700 rpm.
4. Po skončení inkubácie odstráňte tekutinu a premyte každú jamku pridaním 300 µl premývacieho roztoku (Washing solution). Dobre odstráňte zvyšky premývacieho roztoku. Premytie opakujte 3 krát. Ak je používaná premývačka platničiek, skontrolujte či nie je upchané nasávanie alebo plnenie platničky, v takom prípade by premývanie platničky bolo nedostačujúce. Po skončení premývania vyklepte opatrne platničku na absorpčnom papieri, dobre odstráňte zvyšky premývacieho roztoku.
5. Pred použitím jemne premiešajte fľaštičku enzýmového konjugátu (Enzyme conjugate) (netrepte!) a pridajte do každej jamky 100 µl, najlepšie použitím dávkovacej pipety alebo multikanálovej pipety.
6. Prikryte platničku s tesniacou fóliou a inkubujte na horizontálnej trepačke pri teplote miestnosti počas 40 +/- 5 min. pri cca 500 – 700 rpm.
7. Premyte platničku ako v kroku 5 (3x s 300 µl premývacieho roztoku na jamku).
8. Pridajte do každej jamky 100 µl roztoku substrátu (Enzyme Substrat Solution), najlepšie použitím dávkovacej pipety alebo multikanálovej pipety.

9. Inkubujte platničku v tme pri izbovej teplote po dobu 20-30 min. bez trepania.
10. Voliteľné: Do každej jamky pridajte 100 µl stop roztoku 1M NaOH ak je dodržanie inkubačného času požadované.
11. Pomocou ELISA readra zmerajte hodnoty optickej denzity (OD) pri vlnovej dĺžke 405 nm. Ak má reader tú možnosť, krátko (2-3 sekundy) pretrepte platničku pred odčítaním výsledkov.

## 8 KONTROLA KVALITY

- S každým stanovením musí byť stanovovaná aj nová štandardná krivka.
- S každým stanovením by mali byť stanovené pozitívne kontroly. Hodnoty kontroly by mali byť v medziach vytlačených na štítkoch.
- Hodnota OD Štandardu F (500 ng/ml) by mala byť  $\geq 1.6$  a hodnota OD Štandardu A (0 ng/ml) by mala byť  $\leq 0.25$ . Reprezentatívna štandardná krivka je znázornená na obrázku 1.

## 9 VYHODNOTENIE

Výpočet koncentrácie kalprotektínu vo vzorkách stolice pacientov:

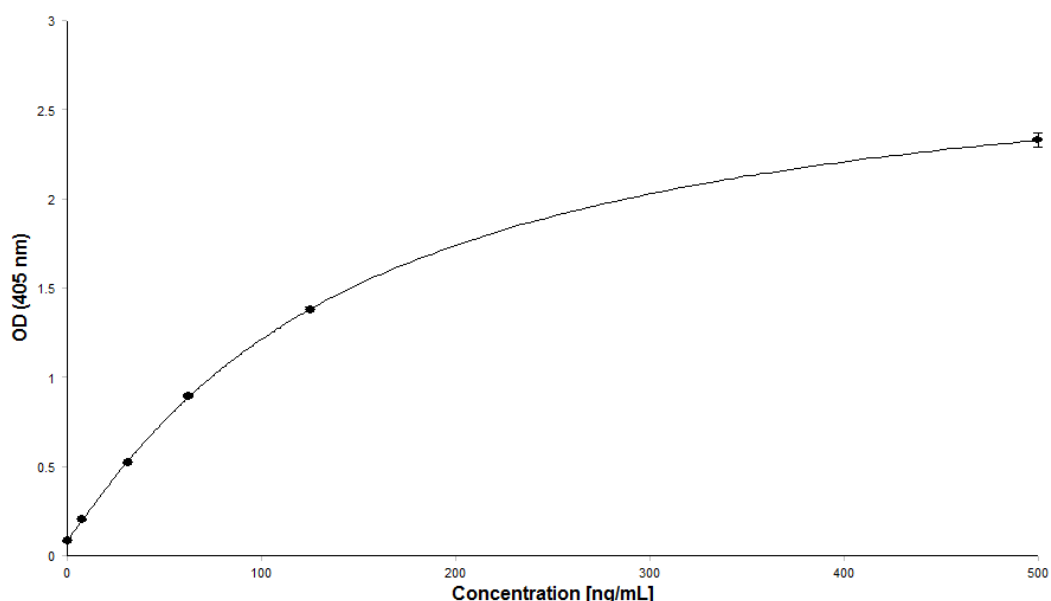
1. Vypočítajte priemernú hodnotu OD v duplikovanom stanovení (štandardy a vzorky)
2. Vyneste hodnotu každej koncentrácie štandardu (ng/ml) na osi x voči jeho strednej hodnote OD na osi y pre získanie štandardnej krivky. **Odporúča sa 4-parametrová funkcia krivky** (viď obrázok 1). Ak je požadovaná logaritmická os x, pre štandard A (0 ng/ml) musí byť použitá hodnota 0,001 ng/ml.
3. Na stanovenie koncentrácie kalprotektínu zriedených vzoriek (ng/ml) na základe ich OD hodnôt použite kalibračnú krivku.
4. **Vynásobte koncentráciu kalprotektínu (ng/ml) v zriedených extraktoch stolice faktorom 5, aby bolo možné previesť výsledok na mg/kg kalprotektínu v pôvodnej vzorke stolice.**

Tento faktor koreluje celkovému riedeniu 1:5000 (1:50 v priebehu extrakcie a nasledujúce 1:100 riedenie extraktov) a prevádza hodnotu z ng/ml na mg/kg.

*Príklad: ak zriedený extrakt vzorky má hodnotu 100 ng/ml, koncentrácie v pôvodnej vzorke stolice je  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

Poznámka: Ak extrakty boli viac (menej) koncentrované, než je odporúčaná 1:100, musí byť ďalší faktor zriedenia zohľadnený vo výpočte.





Obrázok 1: Reprezentatívna štandardná krivka použitím 4 parametrovej krivky

## 10 INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Nasledovné hodnoty kalprotektínu vo vzorke stolice namerané súpravou sú uvedené v publikovanej literatúre<sup>3,36,37</sup>:

<b>Normálna hodnota</b>	5 – 50 mg/kg
<b>Pozitívna hodnota</b>	>50 mg/ kg
<b>Šedá zóna*</b>	50-100 mg/kg
<b>Aktívne, symptomatické zápalové ochorenie čreva</b>	200 – 40 000 mg/kg

\*) pacientom s výsledkami v šedej zóne sa odporúča test zopakovať, aby sa zvýšila diagnostická presnosť.

Všimnite si, že diagnóza nemôže byť stanovená na základe jedného testu. Pre stanovenie diagnózy by sa mala vziať do úvahy klinická anamnéza pacienta a tiež príznaky.

V súlade s vedeckou literatúrou a publikovanými klinickými štúdiami<sup>36,37</sup> možno očakávať nasledujúcu klinickú výkonnosť pri detekcii zápalového ochorenia čriev v porovnaní s funkčným ochorením:

<b>Cut-off</b>	<b>Citlivosť (95% CI)</b>	<b>Špecifita (95% CI)</b>	<b>Pozitívna prediktívna hodnota</b>	<b>Negatívna prediktívna hodnota</b>
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 ŠPECIFIKÁCIA

**Poznámka:** Všetky štúdie a ich overenia boli vykonané manuálne na vzorkách extraktu stolice (riedenie 1:100).

**Presnosť:** Štúdie presnosti v rámci a medzi laboratóriami sa vykonali v troch laboratóriách, ktoré testovali rovnaké vzorky na dvoch rôznych šaržiach súpravy Calprolab.

Presnosť v rámci testu (opakovateľnosť), extrakty stolice (n=20).

Koncentrácia v 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

Presnosť (celková) medzi testami, vzorky stolice (n=80)

Koncentrácia v stolici (mg/kg)	% CV
33,5	14,6
175,1	7,1
583,0	6,0
1136,5	14,0
1795,7	9,6

**Zhoda medzi extrakčnými metódami; metóda váženia v porovnaní s metódou EasyExtract\***

Intercept: -6,7, sklon: 1.05, R= 0.97

\*) Ďalšie podrobnosti a údaje o výkone týkajúce sa extrakcie stolice možno nájsť v príbalovom letáku pre EasyExtract (prod. č. CAL0510).

### **Výtťažnosť:**

Stolica: Testovanie: 85 - 115 %; testované s extraktom stolice s prímiesou purifikovaného kalprotektínu v piatich rôznych hladinách.

### **Limit kvantifikácie, limit detekcie a limit Blank:**

- Limit Blank (LoB): 0,54 mg/kg

- Limit detekcie (LoD): 4,36 mg/kg

- Limit kvantifikácie (LoQ): 22,15 mg/kg

Limit kvantifikácie, detekcie a Blank boli vykonané podľa usmernenia CLSI EP17A-Ed2.

### Zhoda s

#### a) testom Phical (Eurospital)

Phical Test oproti CALP0170: Medzi vzorkami analyzovanými v oboch testoch sa zistila prijateľná korelácia a zhoda: - Intercept: -1,8, (95 %CI: -6,6-4,6), sklon: -1,8, (95 %CI: -6,6-4,6): 0,94 (95% CI: 0,84-1,03), R = 0,92

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

Calpro Calprotectin ELISA (CAL100) oproti CALP0170: Medzi vzorkami analyzovanými v oboch testoch sa zistila prijateľná korelácia a zhoda: - Intercept: 4,3 (95 %CI: -0,84 - 14,3), sklon: 4,3 (95 %CI: -0,84 - 14,3): 0,89 (95% CI: 0,85-0,93), R = 0,93

### Interferencia

Neboli pozorované žiadne interferencie s bežne používanými farmaceutickými prípravkami, pozri zoznam nižšie:

Prednizolón, Imurel, Salazopyrin, Trimetoprim, Cipofloaxcin, Pentasa, Asacol, Ibox, Multivitamín a ľudský hemoglobín

Okrem toho bol S001A12 testovaný na možnú skríženú reaktivitu a nebola pozorovaná žiadna reaktivita.

### Rozsah merania

22,2 - 2500 mg/kg

Matričná linearita

- **Lineárny rozsah: 36 až 1755 mg/kg**

Štúdia linearity matrice bola vykonaná podľa pokynov CLSI EP06-Ed2

## 12 LIMITOVANIE V PREVEDENÍ

- Diagnóza by nemala byť stanovená len na základe jedného výsledku testu. Diagnóza by mala brať do úvahy klinickú anamnézu pacienta a symptómov.

## 13 KONTRAINDIKÁCIE

- Falošne negatívne výsledky by sa mohli vyskytnúť u pacientov, ktorí majú granulocytopéniu v dôsledku supresie kostnej drene.
- Pacienti liečení azatioprínom môžu mať tiež granulocytopéniu, čo môže viesť k falošne negatívnym výsledkom.
- Niektorí pacienti užívajúci nesteroidné protizápalové lieky (NSAID) budú mať zvýšené hladiny fekálneho kalprotektínu.
- Výsledky nemusia byť klinicky použiteľné u detí mladších ako 2 roky, pretože majú často zvýšené hladiny fekálneho kalprotektínu.
- Iné črevné ochorenia vrátane mnohých gastrointestinálnych infekcií a kolorektálneho karcinómu môžu viesť k zvýšeným hladinám kalprotektínu.

- Fekálny kalprotektín je nešpecifický ukazovateľ zápalu v čreve. Zvýšené hladiny nemusia nevyhnutne znamenať, že pacient má aktívne IBD. Vždy je potrebné zhodnotiť celý klinický obraz.

## 14 BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A UPOZORNENIA

- Súprava bola vyrobená a uvedená na trh v súlade s článkom 1 paragrafu 2b Európskej legislatívy IVD 98/79/EC pre *in vitro* použitie pre medicínsku diagnostiku, určená podľa výrobcu pre zabezpečenie vhodnosti, funkčnosti a bezpečnosti produktu. Preto postup testu ako aj informácie o teste, upozornenia a varovania v návode na použitie musia byť striktné dodržiavané. Použitie testovacej súpravy s analyzátorom alebo podobným zariadením musí byť overené. Akékoľvek zmeny v dizajne, zložení a postupu použitia v kombinácii s inými produktmi neschválenými výrobcou nie sú oprávnené. Sám užívateľ je zodpovedný za takéto zmeny. Výrobca z týchto dôvodov nezodpovedá za falošné výsledky a súvisiace incidenty. Výrobca nezodpovedá za žiadne výsledky vizuálnej analýzy vzoriek pacientov.
- Určené len pre diagnostiku *in vitro*.
- Všetky zložky súpravy použité pri výrobe, ktoré majú humánny pôvod boli testované na anti-HIV protilátky, anti-HCV protilátky a antigén hepatitídy B (Bag) a boli preukázané ako nereaktívne. Aj napriek tomu je nutné s týmito reagenciami zaobchádzať ako s potenciálne infekčným materiálom.
- Nezamieňajte reagenty alebo stripy so súpravou s rôznymi výrobnými šaržami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov súčasne s reagentami tohto kitu.
- Nepoužívajte reagenty po uplynutí doby expirácie vyznačenej na obale, alebo dlhšie ako jeden mesiac po príprave pracovných roztokov.
- Používajte len čisté pipety, zásobníky a ďalšie laboratórne zariadenia.
- Aby ste sa vyhli skříženej kontaminácii, nezamieňajte skrutkovacie viečka medzi rôznymi fľaštičkami reagentov.
- Aby ste sa vyhli vyparovaniu a mikrobiálnej kontaminácii reagentov, ihneď po použití ich dobre uzatvorte.
- Pre ďalšie použitie sa uistite, či konjugáty, štandardy a kontroly nie sú mikrobiologicky kontaminované po prvom otvorení a následnom skladovaní.
- Aby ste sa vyhli skříženej kontaminácii a získaniu falošne pozitívnych výsledkov pipetujte štandardy, kontroly a extrahované vzorky stolice, konjugáty a substráty tesne na spodok mikrotitračných jamiek bez odfrkania stien.
- Niektoré reagenty v súprave obsahujú azid sodný < 0,1% (w/v) a/alebo 0,1% Kathon
- Roztok substrátu skladujte v originálnom balení, v nepriehľadných fľaštičkách, ktorých roztok musí byť číry až svetlo žltý. Pred použitím jemne premiešajte.
- **CALPROLab® Calprotectin ELISA Test (ALP)** je určený pre kvalifikovaných pracovníkov, ktorí sú vyškolení a majú dobrú laboratórnu prax.

## 15 ÚVAHY O LIKVIDÁCII

Zvyšky chemikálií a preparátov sú všeobecne považované za nebezpečný odpad. Ich likvidácia je regulovaná národnými a miestnymi predpismi a zákonmi. Je potrebné sa obrátiť na miestne úrady zaoberajúce sa odpadmi, ktoré Vám poradia ako nakladať s nebezpečným odpadom.

## 16 LITERATÚRA






1. Johne 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  
Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
13. 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.
14. 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
15. Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. *Internist* 2010;51:1492-1498
16. 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.
17. 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
18. Bjørkestén CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, Sep 21
19. Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58:176-80
20. Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. *Med Clin North Am*. 2010;94:1-18

21. 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
22. Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:338-346
23. Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics*, 2010;11(3):421-437
24. 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
25. Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010;15(2):309-322
26. Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? *Dig Dis* 2010;28(3):548-555
27. 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
28. Ha C and Kornbluth A: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(6):471-478.
29. 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
30. Rutgeerts P et al.: Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2009;136(5):1182-1197
31. Jalocha L et al.: Mucosal healing in Crohn disease. *Pol Merkur Lekarski.* 2009;26(155):554-555;
32. Baert F et al.: Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2010;138(2):463-468
33. Allez M and Lémann M: Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:2626-2632
34. Lason 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
35. 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
36. Golden BE et al.: Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1996 Feb;74(2):136-9
37. 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
38. 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
39. Madland TM et al.: Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol.* 2002;31(6):351-354
40. 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
41. 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
42. Arvesen K et al.: *Eur Heart J.* 1996 Aug;17 Abstr Suppl:1-646.
43. Katashima et al.: Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ Journal* 2010;74(4):741-8

44. 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
45. Calpro AS Information letter, June 2012 (available upon request: [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no))
46. John B et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia, *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 291-296
47. Internal Design Verification Report: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027.2014-04-09

## 17 INFORMÁCIA K OBJEDNAVKE

Kat. číslo: CALP0170, CALPROLAB® Calprotectin ELISA (ALP) (96 stanovení)

<b>Kľúčové symboly</b>	
	Výrobca
<b>IVD</b>	Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	Číslo šarže
	Exspirácia
	Teplota skladovania
<b>CE</b>	Označenie CE
<b>REF</b>	Katalógové číslo
	Vid' návod na použitie
<b>MTP</b>	Mikrotitračná platnička
<b>CONJ</b>	Konjugát
<b>CAL</b>	Štandardy A-F
<b>CTR LOW</b>	Nízka kontrola
<b>CTR HIGH</b>	Vysoká kontrola
<b>DIL 5x</b>	5x koncentrovaný pufoer na riedenie vzorky
<b>SUB pNPP</b>	pNPP substrátový roztok
<b>FEC EXTR BUF 2,5x</b>	2,5x koncentrovaný pufoer na extrakciu stolice
	

verzia 01, 04.12.2024

**Vyrobené:**  
CALPRO AS  
Arnstein Arnebergs vei 30

**Vyrobené v EÚ pre spoločnosť CALPRO AS**

## 18 RÝCHLY SPRIEVODCA

### Test CalproLab® ELISA (ALP) na analýzu kalprotektínu v stolici

*Plný opis testovacích krokov nájdete v častiach 7 - 9 v príbalovom letáku.*

#### Extrakcia

- Extrakciu vykonajte podľa jednej z metód opísaných v časti 7.1.1 a 7.1.2.

#### ELISA (manuálny postup)

- Zriedte extrakty stolice v pomere 1:100 v pufrí na riedenie vzoriek
- Pridajte 100 µl štandardov, kontrol a vzoriek na ELISA platničku.
- Inkubujte na trepačke pri izbovej teplote  $40 \pm 5$  min.
- Jamky trikrát premyte 300 µl premývacieho roztoku
- Do každej jamky pridajte 100 µl enzýmového konjugátu ALP
- Inkubujte na trepačke pri izbovej teplote  $40 \pm 5$  min.
- Jamky trikrát premyte 300 µl premývacieho roztoku
- Do každej jamky pridajte 100 µl roztoku enzýmového substrátu pNPP.
- Inkubujte pod krytom 20 - 30 min.
- Voliteľne:* do každej jamky pridajte 100 µl 1M NaOH
- Platničku pretrepte 2 - 3 sekundy a pomocou readra ELISA odčítajte hodnoty OD pri 405 nm.
- Pomocou 4-parametrovej krivky vypočítajte výsledky (ng/ml)
- $\text{mg/kg v stolici} = \text{ng/ml} \times 5$

V prípade otázok kontaktujte [mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

N-1366 Lysaker, Norway

Tel: +47 67 43 01 34

[mail@calpro.no](mailto:mail@calpro.no)

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