

RIDASCREEN® Calprotectin

REF G09036



1. Účel použití

Pro *in-vitro* diagnostiku. Test RIDASCREEN® Calprotectin je enzymová imunoanalýza určená ke kvantitativní detekci lidského calprotectinu ve vzorcích stolice.

2. Souhrn a vysvětlení testu

Calprotectin je protein, který váže kalcium. Tvoří se v buňkách, jako jsou neutrofily, a uvolňuje se během zánětu.

Fekální calprotectin slouží jako biomarker gastrointestinálního zánětu a neoplazií v gastrointestinálním traktu.

Calprotectin (také známý jako MRP-8/14, calgranulin A/B a S100A8/A9) je protein, který váže kalcium a zinek, ze skupiny proteinů S100.

Calprotectin za fyziologických podmínek váže kalcium, což jej činí stabilním proteinem, který je vysoce rezistentní vůči teplotě a proteolýze.

Calprotectin je tvořen jak neutrofily (neutrofilními granulocyty), tak monocyty.

Koncentrace calprotectinu v neutrofilech se nachází v rozmezí od 5 do 15 mg/l, což je přibližně 60 % rozpustné frakce proteinů cytosolu a 5 % celkové proteinové frakce těchto buněk.

Biologická funkce calprotectinu není zcela známá. Předpokládá se, že calprotectin slouží jako biologická ochrana buněk před leukocytárními a bakteriálními proteázami. Calprotectin má také dle předpokladů antibakteriální vlastnosti, díky své schopnosti vazby zinku. Navíc calprotectin vykazuje intra- i extracelulární regulační funkce v zánětlivých procesech.

Granulocyty při zánětlivých střevních onemocněních migrují do lumen střeva a uvolňují calprotectin, který je vylučován ve stolici. Koncentrace calprotectinu ve stolici koreluje s počtem neutrofilních granulocytů, které migrují do lumen střeva a uvolňují calprotectin. Současně může být koncentrace calprotectinu ve stolici použita k měření počtu granulocytů ve střevním lumen a jako indikátor závažnosti střevního zánětu.

Měření calprotectinu ve stolici má zvláštní klinický význam, jelikož umožňuje spolehlivou diagnostiku zánětů intestinálního traktu. V mnoha případech vznikají u chronických zánětlivých onemocnění střev (CIBD) příznaky, které lze velmi těžko rozlišit od těch u syndromu dráždivého tračníku (IBS). Měření calprotectinu ve stolici poskytuje spolehlivou informaci o přítomnosti zánětu ve střevech. S použitím tohoto biomarkeru může být mnoho pacientů se syndromem dráždivého tračníku ušetřeno kolonoskopie, která není nutná.

V mnoha publikacích se uvádí, že koncentrace fekálního calprotectinu silně koreluje s histologickými a endoskopickými parametry aktivity onemocnění u pacientů s CIBD. Proto poskytuje měření calprotectinu prostředek objektivního hodnocení odpovědi na léčbu chronických zánětlivých onemocnění střev a monitorování těchto pacientů během klinické remise, čímž umožňuje včasnou detekci a léčbu relapsů.

Fekální calprotectin je měřen:

- ke spolehlivému odlišení chronického zánětlivého onemocnění střev a syndromu dráždivého tračníku,
- k brzkému zjištění vzplanutí zánětlivých onemocnění střev,
- k objektivní dokumentaci závažnosti zánětu při sledování odpovědi během léčebného procesu,
- k poskytnutí markeru akutního střevního zánětu.

3. Princip testu

Test RIDASCREEN® Calprotectin využívá specifických protilátek v sendvičové metodě. Povrch mikrotitrační destičky s jamkami je potažen monoklonálními protilátkami proti lidskému calprotectinu. Suspenze testovaného vzorku stolice je pipetována do jamek mikrotitrační destičky a inkubována. Poté následuje krok promytí a druhá inkubace společně s monoklonálními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou. Imobilizované protilátky, calprotectin a konjugované protilátky vytváří v přítomnosti calprotectinu sendvičový komplex. Nenavázané enzymem označené protilátky jsou odstraněny během navazujícího kroku promytí. U pozitivních vzorků změně navázaný enzym po přidání substrátu bezbarvý roztok v jamkách mikrotitrační destičky na modrý. Přidání stop činidla změně barvu z modré na žlutou. Naměřená absorbance je úměrná koncentraci calprotectinu ve vzorku.

4. Dodávaná činidla

Činidla v kitu vystačí na 96 stanovení.

Plate	96 testů	Mikrotitrační destička; 12 mikrotitračních stripů (odlomitelných) v držáku stripů; potaženo monoklonálními protilátkami proti lidskému calprotectinu
Extract	2x 100 ml	Extrakční roztok (3x konc.); roztok Tris; obsahuje 0,05 % NaN ₃
Diluent 3	100 ml	Zředěný roztok vzorku 3 (ke konečnému ředění), roztok NaCl pufrovaný proteiny; obsahuje 0,1 % NaN ₃ ; připraveno k použití, obarveno červeně
Wash buffer	100 ml	Promývací roztok 10x (10x koncentrovaný); roztok NaCl pufrovaný fosfátem; obsahuje 0,1 % thimerosalu
Calibrator	1 ml	Kalibrátor (postup 1bodové kalibrace); obsahuje 0,1 % ml NaN ₃ ; připraveno k použití
Standard 1 a ž Standard 5	1 ml	5 standardů (postup standardní křivky); koncentrace calprotectinu pro standardy 1 až 5: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; obsahuje 0,1 % NaN ₃ ; připraveno k použití
Control +	1 ml	Pozitivní kontrola; obsahuje 0,1 % NaN ₃ ; připraveno k použití
Low control +	1 ml	Slabě pozitivní kontrola; obsahuje 0,1 % NaN ₃ ; připraveno k použití
Conjugate	12 ml	Monoklonální protilátky (myší) konjugované peroxidázou ve stabilizovaném proteinovém roztoku; připraveno k použití
SeroSC	12 ml	Substrát; peroxid vodíku / TMB; připraveno k použití
Stop	12 ml	Stop činidlo; 1 N kyselina sírová; připraveno k použití

Nebezpečné látky jsou označeny v souladu s předpisy pro značení.

Podrobnosti uvádí bezpečnostní listy (SDS), které jsou k dispozici na stránkách www.r-biopharm.com.

5. Pokyny k uskladnění

Všechna činidla skladujte při teplotě 2–8 °C a používejte do data použitelnosti vytištěného na příslušném štítku. Dodávaný naředěný promývací roztok skladujte při teplotě 2–8 °C a používejte maximálně 4 týdny. Naředěný extrakční roztok můžete používat 6 měsíců, pokud jej skladujete při teplotě 2–8 °C, maximálně však do data použitelnosti koncentrátu. Je nutné, abyste zabránili mikrobiální kontaminaci. Po datu použitelnosti již není platná záruka kvality. Otevřete hliníkový obal s mikrotitračními stripy pomocí nůžek, ale dejte u toho pozor, abyste neroztrhli těsnicí sponu. Veškeré nepotřebné mikrotitrační stripy neprodleně vraťte do hliníkového obalu a skladujte při teplotě 2–8 °C. Bezbarvý substrát chraňte také před přímým světlem, aby se nerozložil nebo nezmodral vlivem autooxidace. Jakmile substrát zmodrá, nelze jej používat.

6. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky

6.1. Činidla

– Destilovaná nebo deionizovaná voda

6.2. Vybavení

- Mikrováha nebo RIDA®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016)
- Vortex mixer (volitelný, viz 9.4.)
- Mikropipeta na objemy 20–100 µl a 1 ml
- Odměrný válec (1 000 ml)
- Stopky
- Promývačka mikrodestiček nebo multikanálová pipeta (300 µl)
- Fotometr na mikrotitrační destičky (450 nm; referenční filtr 620 nm)
- Filtrační papír (laboratorní ubrousek)
- Nádoba na odpad obsahující 0,5% roztok chlornanu

7. Varování a bezpečnostní opatření pro uživatele

Pouze pro *in-vitro* diagnostiku.

Tento test smí provádět výhradně vyškolený laboratorní personál. Dodržujte pokyny pro práci ve zdravotnických laboratořích. Vždy striktně dodržujte uživatelské pokyny pro provádění testu.

Se vzorky stolice zacházejte jako s potenciálně infekčními v souladu s národními bezpečnostními požadavky.

Vzorky ani činidla nepipetujte ústy a zabraňte jejich kontaktu s poraněnou kůží nebo sliznicemi. Při práci se vzorky mějte nasazené rukavice a po dokončení testu si umyjte ruce. Nekuřte, nejezte ani nepijte v oblastech, kde se zpracovávají vzorky nebo testová činidla.

Podrobnosti viz bezpečnostní listy (SDS), které jsou k dispozici na stránkách www.r-biopharm.com.

Promývací roztok obsahuje 0,1 % thimerosalu jako konzervační přípravek. Tato látka nesmí přijít do kontaktu s kůží ani sliznicemi.

Kalibrátor, standardy, pozitivní kontrola, slabě pozitivní kontrola, extrakční roztok a zředěný roztok vzorku obsahují 0,0 % nebo 0,1 % NaN_3 jako konzervační přípravek. Extrakční roztok obsahuje také chlorid guanidinia jako renaturační a denaturační přípravek. Tato látka nesmí přijít do kontaktu s kůží ani sliznicemi. Peroxid vodíku (substrát) může způsobit chemické popáleniny. Zacházejte s ním opatrně.

Stop činidlo obsahuje 1 N kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s kůží a oděvem. Pokud přijde činidlo do styku s vaší kůží, opláchněte ji vodou.

Všechna činidla a materiály, které přijdou do kontaktu s potenciálně infekčními vzorky, je nutné ošetřit vhodnými dezinfekčními přípravky nebo sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C alespoň jednu hodinu. POZOR: Abyste zabránili tvorbě jedovatých plynů, neutralizujte před přidáním do roztoku chlornanu všechen tekutý odpad, který obsahuje stop činidlo.

8. Odběr a uskladnění vzorků

Vzorky stolice musí být přepravovány pokud možno v chladu a před testováním skladovány při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou vzorky použity ihned po přijetí (do 3 dnů), doporučujeme je skladovat při teplotě -20 °C a méně. Když jsou vzorky stolice zmrazené, mohou neutrofilní granulocyty prasknout a uvolnit calprotectin. To může lehce zvýšit koncentraci calprotectinu v mražených vzorcích ve srovnání s čerstvými. Vyhněte se opětovnému mrazení a rozmrazování vzorků. Vzorky stolice by neměly být odebírány do transportních nádob s obsahem transportního média s konzervačními přípravky, zvířecího séra, kovových iontů, oxidačního činidla nebo detergentů, jelikož by mohlo dojít k interferenci s testem RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Průběh testu

9.1. Obecné informace

Všechna činidla a mikrotitrační destička **Plate** musí před použitím dosáhnout pokojové teploty (20–25 °C). Poté, co dosáhne pokojové teploty, vyndejte z hliníkového obalu mikrotitrační stripy. Činidla před použitím dobře promíchejte. Po použití skladujte mikrotitrační stripy (v utěsněném obalu) a činidla opět při teplotě 2–8 °C. Použité mikrotitrační stripy nelze znovu použít. Nepoužívejte činidla ani mikrotitrační stripy, pokud je balení poškozené nebo nejsou kontejnery pevně uzavřené. Zabraňte přímému kontaktu vzorků se složkami kitu, abyste předešli zkřížené kontaminaci. Nesmíte provádět test na přímém slunečním světle. Doporučujeme, abyste mikrotitrační destičku přikryli nebo utěsnili přilnavou fólií a zabránili ztrátám odpařováním.

9.2. Příprava promývacího roztoku

Smíchejte 1 díl koncentrátu promývacího roztoku **Wash** s 9 díly destilované vody (1 : 10 AM). V tomto kroku přidejte 100 ml koncentrátu do 1 000ml odměrného válce a doplňte ho destilovanou vodou do 1 000 ml. Předtím by měly být zahříváním (vodní lázeň o teplotě 37 °C) rozpuštěny všechny krystaly přítomné v koncentrátu.

9.3. Příprava extrakčního roztoku

Smíchejte 1 díl extrakčního roztoku **Extract** (100 ml) s 2 díly destilované vody (200 ml) (1 : 3).

9.4. Příprava vzorků

Vzorky stolice před použitím skladujte pokud možno nepřetržitě při teplotě 2–8 °C. Při delším skladování (> 3 dny) je udržujte při teplotě -20 °C a méně. Mražené vzorky nechte, aby se pomalu přizpůsobily pokojové teplotě.

9.4.1 Příprava vzorku a suspenze vážením

Navažte 100 mg vzorku stolice do označené testovací zkumavky a poté pipetou přidejte 5 ml naředěného extrakčního roztoku (ředění 1 : 50).

Také lze do testovací zkumavky umístit mezi 80 a 130 mg stolice a vytvořit z ní suspenzi s přiměřeně větším nebo menším objemem naředěného extrakčního roztoku (viz Tabulka 1) tak, abyste udrželi konstantní poměr ředění (1 : 50).

Tabulka 1: Údaje o požadovaných množstvích naředěného extrakčního roztoku v závislosti na odváženém množství stolice

Hmotnost vzorku [mg]	Objem [ml]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Při opětovném vytváření suspenze v konstantním objemu 5 ml extrakčního roztoku musíte při výpočtu brát v úvahu proměnlivý faktor ředění (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Údaje o faktoru ředění s konstantním přídatkem naředěného extrakčního roztoku (5 ml) v závislosti na odváženém množství stolice

Hmotnost vzorku [mg]	Objem [ml]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

Bez ohledu na metodu použitou pro odvážení vzorku stolice vytvořte důkladným mícháním ve vortexu homogenní suspenzi. Pokud je stolice tekutá, použijte pipetu, naberte přesně 100 µl a v přesně 5 ml naředěného extrakčního roztoku vytvořte suspenzi.

Po přidání extrakčního roztoku a opětovném důkladném vortexování byste měli vzorky 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Poté musíte homogenní suspenzi 10 minut centrifugovat na alespoň 3 000 xg, aby se usadily hrubé částice stolice. Doporučujeme, abyste k použití v testu supernatant z extraktu ihned dále ředili.

a. Manuální ředění vzorku

Dále naředte 20 µl pročištěného supernatantu v 980 µl roztoku k ředění vzorku RIDASCREEN® **Diluent | 3** (1 : 50). V testu poté použijete 100 µl konečného naředěného vzorku stolice.

Také lze vzorky připravit a homogenizovat pomocí zkumavky RIDASCREEN®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016, viz 9.4.2.).

b. Ředění vzorku v automatizovaném systému

Pokud má test běžet v automatizovaném DSX systému ELISA (Dynex Technologies, Inc.), měli byste k tomu požádat o specifický protokol testu od společnosti R-Biopharm AG a v systému ho použít. Vzorek je poté automaticky naředěn dle popisu níže.

20 µl pročištěného supernatantu je pipetováno automatickým systémem ELISA do destičky s hlubokými jamkami a naředěno s 980 µl naředěného roztoku **Diluent | 3** (1 : 50). Následují dva míchací cykly.

Do držáku na proužky je umístěno požadované množství mikrotitračních stripů pro mikrotitrační destičku RIDASCREEN® Calprotectin **Plate**. Z destičky s hlubokými jamkami je přeneseno 100 µl zředěného roztoku vzorku do mikrotitrační destičky RIDASCREEN® Calprotectin **Plate** (konečné ředění 1 : 2 500).

Chcete-li získat pokyny k provedení testu s jinými automatickými pipetovacími systémy ELISA, kontaktujte společnost R-Biopharm AG.

9.4.2 Příprava vzorku a suspenze pomocí zkumavky RIDA®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016)

Zkumavka RIDA®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016) je rychlá a čistá alternativa vážení vzorků stolice při jejich přípravě a tvorbě suspenze, jak je popsáno v části 9.4.1. Je nabízena jako doplněk k testu RIDASCREEN® Calprotectin a významně usnadňuje přípravu vzorku.

Do zkumavky RIDA®TUBE Calprotectin předem naplněné 2,5 ml extrakčního roztoku připraveného k použití přidejte 10 mg vzorku stolice. Pokud je vzorek stolice tekutý, naberte 10 µl vzorku stolice pipetou a pipetujte ho přímo do extrakčního roztoku.

Sběr vzorku a proces extrakce je podrobně popsán v návodu dodávaném se zkumavkou RIDA®TUBE Calprotectin, který lze také stáhnout ze stránek www.r-biopharm.com.

Doporučujeme použít extrakt stolice v testu ihned po jeho naředění.

a. Manuální ředění vzorku

Jak je popsáno pod položkou 8 v návodu k použití k GZ3016, 100 µl suspenze stolice, získané pomocí zkumavky RIDA®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016), je dále ředěno v 900 µl roztoku k ředění vzorku RIDASCREEN® **Diluent | 3**. V testu ihned použijete 100 µl konečného naředěného vzorku stolice.

b. Ředění vzorku v automatizovaném systému

Pokud má test běžet v automatizovaném DSX systému ELISA (Dynex Technologies, Inc.), měli byste k tomu požádat o specifický protokol testu od společnosti R-Biopharm AG a v systému ho použít.

Do držáku na stripy je umístěno požadované množství mikrotitračních stripů pro mikrotitrační destičku RIDASCREEN® Calprotectin [Plate]. Suspenze stolice, extrahovaná pomocí zkumavky na stolici, je v systému ELISA automaticky naředěná 1 : 10 na mikrotitrační destičce [Plate] (konečné ředění 1 : 2 500). Přímo do mikrotitrační destičky calprotectinu je pipetováno 10 µl suspenze stolice ze zkumavky RIDA®TUBE Calprotectin (položka č. GZ3016) a dále ředěno s 90 µl roztoku [Diluent | 3].

Chcete-li získat pokyny k provedení testu s jinými automatickými pipetovacími systémy ELISA, kontaktujte společnost R-Biopharm AG.

9.5. První inkubace

Po umístění dostatečného počtu jamek do držáku přidejte do příslušných jamek 100 µl kalibrátoru [Calibrator] (1bodová kalibrace, doporučena duplicitně) nebo 100 µl standardu 1 až standardu 5 [Standard 1] – [Standard 5] (standardní křivka, doporučena duplicitně) a 100 µl roztoku k ředění vzorku RIDASCREEN® [Diluent | 3] (=negativní kontrola), pozitivní kontrolu [Control | +] a konečný zředěný vzorek stolice. Pokud používáte slabě pozitivní kontrolu [Low control | +], přidejte do testu také 100 µl. Následně desku inkubujte jednu hodinu při pokojové teplotě (20–25 °C).

9.6. První promytí

Aby bylo dosaženo správného vyhodnocení, je důležité opatrné promytí, a mělo by tedy být provedeno stripktně podle pokynů. Inkubovaná substance v jamkách musí být vyprázdněna do odpadní nádoby obsahující roztok chlornanu k dezinfekci. Poté vyklepejte destičku nad savým papírem, abyste odstranili zbylou vlhkost. Potom 5x promyjte destičku, pokaždé pomocí 300 µl naředěného promývacího roztoku (viz 9.2.). Ujistěte se, že jsou jamky zcela vyprázdněné tak, že je po každém promytí vyklepete na nepoužitou suchou část savého papíru.

Upozornění: Při použití promývačky destiček se ujistěte, že je přístroj správně nastaven dle typu používané mikrotitrační destičky. Navíc musíte před prvním promytím ručně centrifugací odstranit suspenzi stolice, která není zcela zbavena částic, abyste se vyhnuli ucpání promývacích jehel.

Upozornění: Také se ujistěte, že je během každé fáze promytí nasáta všechna tekutina. Po posledním promytí destičku důkladně vyklepejte na čistý savý papír nebo laboratorní utěrku, aby byla odstraněna veškerá zbylá vlhkost.

9.7. Druhá inkubace

Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu [Conjugate]. Následně destičku inkubujte jednu hodinu při pokojové teplotě (20–25 °C).

9.8. Druhé promytí

Po inkubační době vyprázdněte konjugát z jamek do odpadní nádoby obsahující roztok chlornanu k dezinfekci. Poté vyklepejte destičku nad savým papírem, abyste odstranili zbylou vlhkost. Potom pětkrát promyjte destičku, pokaždé pomocí 300 µl naředěného promývacího roztoku. Ujistěte se, že jsou jamky zcela vyprázdněné tak, že je po každém promytí vyklepete na nepoužitou suchou část savého papíru.

9.9. Třetí inkubace

Do každé jamky přidejte 100 µl substrátu [SeroSC]. Následně destičku inkubujte 15 minut ve tmě při pokojové teplotě (20–25 °C). Pak reakci zastavte přidáním 50 µl stop činidla [Stop] do každé jamky.

Po opatrném míchání (jemným klepáním na okraj destičky) změřte absorbanci při 450 nm a při referenční vlnové délce 620 nm.

Upozornění: Vysoce pozitivní vzorky pacientů mohou vytvořit černě zbarvené sraženiny substrátu. Tyto vzorky musíte naředit 1 : 10 a použít v testu znovu (viz 9.5.) (konečné ředění vzorku stolice: 1 : 25 000).

10. Kontrola kvality – známky zkažení činidel

Pro účely kontroly kvality musí být pokaždé při provádění testu použit kalibrátor [Calibrator] (1bodová kalibrace, doporučena duplicitně) nebo standard 1 až standard 5 [Standard 1] – [Standard 5] (standardní křivka, doporučeno duplicitně) a roztok k ředění vzorku RIDASCREEN® [Diluent | 3] jako negativní kontrola a pozitivní kontrola [Control | +], aby byla zajištěna stabilita činidel a správná funkce testu. Použití slabě pozitivní kontroly je volitelné.

Test byl proveden správně, pokud je střední hodnota extinkce (OD) negativní kontroly při 450/620 nm menší než 0,05 a průměrná střední hodnota extinkce (OD) kalibrátoru (při použití 1bodové kalibrace) se nachází v rozmezí uvedeném v datovém listu, specifickém pro tuto šarži. Pokud se použije kalibrátor a pět standardů, poskytuje pozitivní kontrola informaci o validitě testu. Rozsah koncentrací se musí nacházet v rozmezí specifickém pro šarži, uvedeném v datovém listu.

Pokud je test RIDASCREEN® Calprotectin zpracováván na otevřeném, plně automatizovaném systému ELISA, může se naměřená hodnota OD kalibrátoru [Calibrator] (při použití 1bodové kalibrace) v závislosti na systému lišit od rozmezí uvedeného v certifikátu specifickém pro šarži. I na plně automatizovaných systémech ELISA je pozitivní kontrola [Control | +] rozhodující pro validitu vyhodnocení testu a musí být tedy vždy testována. Není naprosto nutné používat slabě pozitivní kontrolu [Low control | +].

Odchylka od požadovaných hodnot, zakalení činidla nebo modré zbarvení bezbarvého substrátu před jeho přidáním do jamek může znamenat, že jsou činidla prošlá. Pokud nejsou dosaženy stanovené hodnoty, musí být před opakováním testu zkontrolovány následující body:

- datum použitelnosti použitých činidel,
- funkční výkonnost použitého vybavení (např. kalibrace),
- správný postup testu,
- vizuální kontrola kontaminace nebo úniku u složek ktiu; roztok substrátu, který zmodral, nesmí se použít.

Pokud nejsou podmínky po zopakování testu stále dosaženy, obraťte se na výrobce nebo svého místního distributora R-Biopharm.

11. Hodnocení a interpretace

Koncentrace calprotectinu v mg/kg stolice je určena testem RIDASCREEN® Calprotectin v systému ELISA buď pomocí 1bodové kalibrace (viz 11.1.) dle 4parametrového logistického protokolovacího modelu (4PL), nebo pomocí standardní křivky (viz 11.2.).

K výpočtu výsledků je požadován vyhodnocovací software RIDA®SOFT Win.NET. Software RIDA®SOFT Win.NET nebo jeho aktualizace můžete získat na vyžádání kontaktováním společnosti R-Biopharm AG nebo svého místního distributora R-Biopharm.

Namísto softwaru RIDA®SOFT Win.NET lze použít také jiný vyhodnocovací software, který poskytuje 4parametrový logistický protokolovací model.

11.1. Jednobodová kvantifikace dle 4parametrového logistického protokolovacího modelu

Parametry (A–D) požadované pro výpočet 4PL standardní křivky a cílové hodnoty kalibrátoru, pozitivní kontroly a slabě pozitivní kontroly naleznete v datovém listu specifickém pro šarži, který je dodáván s kitem, a musíte je před měřením srovnat s hodnotami vyhodnocovacího softwaru.

Při konečné kontrole kvality vypočítává společnost R-Biopharm AG pro každou šarži kitu v ideálních podmínkách testu standardní křivku (včetně parametrů A–D), stejně jako cílovou hodnotu a přípustné rozmezí koncentrací hodnot OD kalibrátoru, pozitivní kontroly a slabě pozitivní kontroly. Kalibrátor je testován také proto, aby byly kompenzovány výkyvy testu a zkontrolována kvalita postupu testu. Pozitivní kontrola poskytuje informaci o validitě testu.

Software RIDA®SOFT Win.NET počítá korekční faktor F interně ze střední hodnoty duplikované analýzy kalibrátoru a jeho požadované hodnoty. Tento korekční faktor se pak porovná s absorbancí pro vzorky stolice. Výsledky testu mohou být s jistotou a spolehlivě vyhodnoceny v rozmezí standardní křivky.

11.2. Kvantifikace s použitím standardní křivky

Test RIDASCREEN® Calprotectin je vyhodnocován pomocí standardní křivky, která musí být zahrnuta v každém běhu. Příklad standardní křivky je uveden v datovém listu specifickém pro šarži.

Při konečné kontrole kvality stanovuje společnost R-Biopharm AG pro každou šarži kitu v ideálních podmínkách testu referenční hodnotu a přípustná rozmezí koncentrací pro pozitivní kontrolu a slabě pozitivní kontrolu. Při kvantifikaci pomocí standardní křivky poskytuje pozitivní kontrola informaci o validitě testu. Pozitivní kontrola musí ležet uvnitř specifického rozmezí koncentrací.

11.3. Vyhodnocení testu

Hraniční hodnota, kdy musí být výsledky považovány za pozitivní, je > 50 mg/kg lidského calprotectinu ve stolici. Pokud se výsledek nachází pod hraniční hodnotou, musí být vzorky považovány za negativní.

Hraniční hodnotu 50 mg/kg navrženou pro dospělé lze použít také pro děti ve věku 4–17 let.

Doporučujeme každé laboratoři, aby si stanovila vlastní rozmezí standardních hodnot.

Upozornění: Vzorky, vykazující při použití 1bodové kalibrace nebo standardní křivky koncentrace calprotectinu větší než 600 mg/kg, doporučujeme dále naředit (1 : 5 v roztoku Diluent 3) a znovu provést test a analýzu.

Upozornění: Vzorky, vykazující při kvantifikaci pomocí 1bodové kalibrace hodnoty OD vyšší než 3,0, doporučujeme dále naředit (1 : 5 v roztoku Diluent 3) a znovu provést test a analýzu.

12. Omezení metody

Test RIDASCREEN® Calprotectin detekuje epitopy lidského calprotectinu ve vzorcích stolice. Diagnóza by neměla být stanovena pouze na základě určených koncentrací calprotectinu, je třeba brát vždy v potaz lékařskou anamnézu pacienta.

13. Charakteristiky provedení

13.1. Přesnost

13.1.1 Vnitřní přesnost testu

Vnitřní přesnost testu byla testována v jednom běhu pomocí 4 referencí, z nichž každá byla ve 40 replikátech. Hodnoty OD z těchto měření byly použity k určení koncentrací calprotectinu pomocí kalibrátoru nebo standardní křivky, z nichž byla pro každý vzorek vypočítána střední hodnota (MV), směrodatné odchytky (SD) a variační koeficient (CV) měření.

Tabulka 3: Vnitřní přesnost testu RIDASCREEN® Calprotectin

	Kalibrátor			Standardní křivka		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Reference A	53,8	2,9	5,4	56,6	3,0	5,3
Reference B	96,6	5,5	5,7	102,4	6,3	6,2
Reference C	136,5	5,6	4,1	130,5	5,2	4,0
Reference D	246,7	14,1	5,7	267,6	15,0	5,6

13.1.2 Vnější přesnost analýzy

Vnější přesnost analýzy byla určena duplicitně ve 20 bězích (2 běhy za den) pomocí 4 referencí a 3 techniky v různých dnech. Hodnoty OD z těchto měření byly použity k určení koncentrací calprotectinu pomocí kalibrátoru nebo standardní křivky, z nichž byla pro každý vzorek vypočítána střední hodnota (MV), směrodatné odchytky (SD) a variační koeficient (CV) měření.

Tabulka 4: Vnější přesnost testu RIDASCREEN® Calprotectin

	Kalibrátor			Standardní křivka		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Reference A	55,7	4,3	7,7	57,5	4,1	7,1
Reference B	106,5	7,2	6,8	112,8	8,3	7,3
Reference C	129,6	7,8	6,0	138,5	7,6	5,5
Reference D	260,9	28,3	10,9	284,7	22,7	8,0

13.2. Přesnost extrakce

Přesnost extrakce byla určena duplicitně v 10 bězích (5 dní, 2 běhy za den) a 2 techniky v různých dnech, za použití 3 vzorků stolice nad hraniční hodnotou. Vzorky byly před každým během dle požadavků extrahovány a naředěny. Hodnoty OD z těchto měření byly použity k určení koncentrací calprotectinu pomocí kalibrátoru nebo standardní křivky, z nichž byla pro každý vzorek vypočítána střední hodnota (MV), směrodatné odchytky (SD) a variační koeficient (CV) měření.

Tabulka 5: Vnější přesnost extrakce testu










	Kalibrátor			Standardní křivka		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Reference A	64,0	5,0	7,9	67,4	5,0	7,5
Reference B	114,1	10,3	9,0	123,2	10,7	8,7
Reference C	264,0	33,3	12,6	284,8	22,1	7,8

14. Historie verze


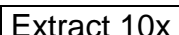
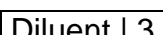
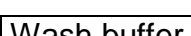
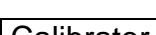
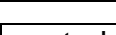
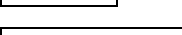
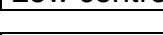
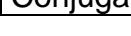

Číslo verze	Kapitola a pojmenování
2019-07-01	Obecná revize 14. Historie verze 15. Vysvětlení symbolů

15. Vysvětlení symbolů

Všeobecné symboly

	Pro in-vitro diagnostiku
	Prostudujte si návod k použití
	Číslo šarže
	Použitelný do
	Skladovací teplota
	Číslo výrobku
	Počet testů
	Datum výroby
	Výrobce

Symbole specifické pro test

	Mikrotitrační destička
	Extrakční a ředící roztok
	Roztok k ředění vzorku
	Promývací roztok 10×
	Kalibrátor
	Pozitivní kontrola
	Slabě pozitivní kontrola
	Konjugát
	Substrát
	Stop činidlo

16. Literatura

1. Arndt et al., 1993, *Crohn; Clin. Lab.* 11: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. *Post-graduiertenkurs der DGVS*
3. Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces; Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H.; *Lancet.* 1992 Oct 24; 340(8826):1037.
4. Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal alpha 1-antitrypsin clearance; Karbach U, Ewe K.; *Z Gastroenterol.* 1989 Jul; 27(7):362-5.
5. Detection of increased permeability of the intestinal mucosa in chronic inflammatory bowel diseases; Karbach U.; *Z Gastroenterol Verh.* 1989 Jul; 24:40-4.
6. Alpha 1-antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders; Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS.; *Gastroenterology.* 1990 Nov; 99(5):1380-7.
7. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells; Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J.; *Clin Exp Immunol.* 2002 May; 128(2):279-84.