

## RIDASCREEN® Calprotectin

**REF** G09036



## 1. Kullanım amacı

*In vitro* tanı amaçlı kullanım içindir. RIDASCREEN® Calprotectin, gaita örneklerinde insan calprotectin'in kantitatif olarak tespiti için kullanılan bir enzim immünolojik testidir.

## 2. Testin özeti ve açıklaması

Nötrofiller gibi hücrelerde üretilen kalsiyumu bağlayan bir protein olan Calprotectin, enflamasyon sırasında salınır.

Fekal calprotectin, sindirim sisteminde enflamasyon ve neoplazinin bir biyolojik işaretçisi görevi görür.

Calprotectin (MRP-8/14, calgranulin A/B ve S100A8/A9 olarak da bilinir), S100 protein ailesinin bir kalsiyum ve çinko bağlayıcı proteindir.

Calprotectin, kalsiyumu fizyolojik koşullar altında bağlayarak ısıya ve proteolize yüksek derecede dirençli bir stabil protein haline getirir.

Calprotectin hem nötrofiller (nötrofil granüositler) ve monositler tarafından üretilir.

Nötrofillerde, sitosoldeki calprotectin konsantrasyonu 5 ila 15 mg/l arasında değişir ve bu da, çözünür sistolik protein fraksiyonunun % 60'ını ve bu hücrelerin toplam protein fraksiyonunun % 5'ini oluşturur.

Calprotectin'in biyolojik fonksiyonu tamamen anlaşılmamıştır. Calprotectin'in hücreleri lökositik ve bakteriyel proteazlara karşı korumada bir biyolojik fonksiyon gerçekleştirildiği varsayılmaktadır. Calprotectin'in ayrıca çinko bağlama kapasitesi nedeniyle antibakteriyel özelliklere sahip olduğu da varsayılmaktadır. Bunlara ek olarak Calprotectin, enflamatuar süreçlerde hem hücre içi ve hem de hücre dışı düzenleyici fonksiyonlar sergilemektedir.

Bir enflamatuar bağırsak hastalığının varlığında, granüositler bağırsakların lümenine hareket eder ve feçesle atılan calprotectin salar. Feçesteki calprotectin konsantrasyonu, bağırsakların lümenine hareket eden ve calprotectin salan nötrofilik granüositlerin sayısı ile korelasyon halindedir. Bunun sonucunda, fekal calprotectin konsantrasyonu, bağırsak lümenindeki granüositlerin sayısının bir ölçüsü ve bağırsaklarda enflamasyonun şiddetinin bir göstergesi olarak kullanılabilir.

Fekal calprotectin'in ölçülmesinin özel bir klinik değeri vardır, çünkü bağırsak yollardaki enflamasyonun güvenli tanınmasını sağlar. Birçok vakada, kronik enflamatuar bağırsak hastalığı (CIBD), iritabl bağırsak sendromundan (IBS) ayırt edilmesi çok zor olan semptomlar üretir. Fekal calprotectin ölçümü, bağırsakta enflamasyonun varlığının güvenilir bir göstergesidir. Bu biyolojik işaretçi kullanılarak, iritabl bağırsak sendromu olan pek çok hasta, gereksiz bir kolonoskopi yaptırmaktan kurtulabilir.

Birkaç yayında, fekal calprotectin konsantrasyonlarının CIBD hastalarında hastalığın histolojik ve endoskopik parametreleriyle güçlü korelasyon halinde olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, fekal calprotectin'in ölçülmesi, kronik enflamatuar bağırsak hastalığının tedavisine yanıtı objektif olarak değerlendirmenin ve nükslerin erken

tespiti ve tedavisini sağlamak için klinik remisyon sırasında bu hastaları izlemenin bir aracını sağlamaktadır.

Fekal calprotectin'in ölçülme nedenleri:

- Kronik enflamatuar bağırsak hastalığı ve iritabl bağırsak sendromu arasında güvenilir bir ayırım yapmak
- Enflamatuar bağırsak hastalığının alevlenmelerini erkenden tespit etmek
- Tedavinin seyri sırasında yanıtı izlemek için enflamasyonun şiddetini objektif olarak dokümanete etmek
- Akut bağırsak enflamasyonunun bir işaretçisini sağlamak

### **3. Test prensibi**

RIDASCREEN® Calprotectin, spesifik antikoları sandviç tipi bir yöntemde kullanır. Mikro-titrasyon plakasının kuyucuk yüzeyi, insan calprotectin'ine karşı monoklonal antikolarla kaplıdır. Test edilecek gaita örneğinin bir süspansiyonu, mikro-titrasyon plakasının kuyucuğunun içerisine pipetlenir ve inkübe edilir. Bunun ardından bir yıkama adımı ve horseradish peroksidazla konjuge edilmiş bir monoklonal antikorla birlikte ikinci bir inkübasyon gelir. Calprotectin varsa, immobilize antikor, calprotectin ve konjuge antikor bir sandviç kompleksi oluşturur. Bağlanmamış enzim işaretli antikolar, sonraki bir yıkama adımında uzaklaştırılır. Pozitif örneklerde, bir substrat eklendikten sonra, bağlanmış enzim mikro-titrasyon plakasının kuyucuklarındaki renksiz çözeltiyi bir mavi bir çözeltiliye değiştirir. Bir durdurma çözeltilisinin eklenmesi, rengi maviden sarıya değiştirir. Ölçülen absorbans, örnekte bulunan calprotectin konsantrasyonuyla orantılıdır.

#### 4. Sağlanan reaktifler

Kitte sağlanan reaktifler 96 belirleme için yeterlidir.

Plate	96 tahlil	Mikro-titrasyon plakası; bir strip tutucuda 12 mikro-titrasyon stripi (bölünebilir); insan calprotectin'ine karşı monoklonal antikolar (fare) kaplı
Extract	2x 100 ml	Ekstraksiyon tamponu (3x kons.); Tris tampon; % 0,05 NaN <sub>3</sub> içerir
Diluent   3	100 ml	Örnek seyreltme tamponu 3 (nihai seyreltme için), protein tamponlu NaCl çözeltisi; % 0,1 NaN <sub>3</sub> içerir; kullanıma hazır, kırmızıya boyalı
Wash buffer	100 ml	Yıkama tamponu 10x (10 kat konsantre); fosfat tamponlu NaCl çözeltisi; % 0,1 timerosal içerir
Calibrator	1 ml	Kalibratör (1 noktalı kalibrasyon prosedürü); % 0,1 ml NaN <sub>3</sub> içerir; kullanıma hazır
Standard 1 ila Standard 5	1 ml	5 standart (standart eğri prosedürü); standart 1 ila 5 calprotectin konsantrasyonları: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; % 0,1 NaN <sub>3</sub> içerir; kullanıma hazır
Control   +	1 ml	Pozitif kontrol; % 0,1 NaN <sub>3</sub> içerir; kullanıma hazır
Low control   +	1 ml	Düşük pozitif kontrol; % 0,1 NaN <sub>3</sub> içerir; kullanıma hazır
Conjugat	12 ml	Stabilize protein çözeltisinde, peroksidaz konjuge, monoklonal antikor (fare); kullanıma hazır
SeroSC	12 ml	Substrat; hidrojen peroksit/TMB; kullanıma hazır
Stop	12 ml	Durdurma çözeltisi; 1 N sülfürik asit; kullanıma hazır

Tehlikeli maddeler, etiketleme yükümlülüklerine göre belirtilmiştir. Daha fazla ayrıntı için, [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com) adresindeki Güvenlik Veri Formlarına (SDS) başvurun.

## 5. Saklama talimatları

Tüm reaktifler 2 - 8 °C'de saklanmalıdır ve kendi etiketlerinde basılı son kullanma tarihine kadar kullanılabilirler. Seyreltilmiş yıkama tamponu, 2 - 8 °C'de saklanmış olması şartıyla, maksimum 4 hafta boyunca kullanılabilir. Seyreltilmiş ekstraksiyon tamponu, konsantrasyonun son kullanma tarihine kadar maksimum 6 boyunca 2 - 8 °C'de saklanabilir. Mikrobiyal kontaminasyon önlenmelidir. Son kullanma tarihinden sonra, kalite garantisi artık geçerli değildir. Mikro-titrasyon striplerini içeren alüminyum torbayı açmak için makas kullanın, ancak klip mührünü kesmemeye dikkat edin. Gerekli olmayan mikro-titrasyon stripleri hemen alüminyum torbaya geri konulmalı ve 2 - 8 °C'de saklanmalıdır. Renksiz substrat, ayrışmasını veya oto-oksidasyon nedeniyle maviye dönmesini önlemek için doğrudan ışıktan korunmalıdır. Substrat maviye döndükten sonra kullanılmamalıdır.

## 6. Gerekli olan ama sağlanmayan reaktifler

### 6.1. Reaktifler

- Distile veya deiyonize su

### 6.2. Ekipman

- Mikro-terazi veya RIDA®TUBE Calprotectin (öge no. GZ3016)
- Vorteks karıştırıcı (opsiyonel, bkz. 9.4.)
- 20 - 100 µl ve 1 ml hacimler için mikro-pipet
- Dereceli silindir (1000 ml)
- Kronometre
- Mikro-titrasyon plakaları için yıkama cihazı veya çok kanallı pipet (300 µl).
- Mikro-titrasyon plakası için fotometre (450 nm, referans filtresi 620 nm)
- Filtre kağıdı (lab bezleri)
- % 0,5 sodyum hipoklorit çözeltisi içeren atık kabı

## 7. Kullanıcılar için uyarılar

Yalnızca *in vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.

Bu test, sadece eğitimli laboratuvar personeli tarafından gerçekleştirilmelidir. Tıbbi laboratuvarlarda çalışma yönergelerine uyulmalıdır. Bu testi gerçekleştirmek için kullanıcı talimatlarına her zaman kesinlikle uyun.

Gaita örnekleri, ulusal güvenlik gerekliliklerine uygun olarak potansiyel olarak enfeksiyöz madde gibi kullanılmalıdır.

Numuneler veya reaktifler, ağızdan pipetle alınmamalıdır ve yaralı cilt veya mukoz membranlarla temas etmeleri önlenmelidir. Örneklerle çalışırken tek kullanımlık eldiven takın ve test bittiğinde ellerinizi yıkayın. Örneklerin veya test reaktiflerinin işlendiği alanlarda sigara içmeyin, bir şey yemeyin veya içmeyin.

Daha fazla ayrıntı için, [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com) adresindeki Güvenlik Veri Formlarına (SDS) başvurun.

Yıkama tamponu koruyucu olarak % 0,1 timerosal içerir. Bu maddenin, cilt veya mukoza zarlarıyla temas etmesine izin verilmemelidir.

Kalibratör, standartlar, pozitif kontrol, düşük pozitif kontrol, ekstraksiyon ve örnek seyreltme tamponu koruyucu olarak % 0,05 veya % 0,1 NaN<sub>3</sub> içerir. Ekstraksiyon tamponu ayrıca renatürasyon ve denatürasyon ajanı olarak guanidinium klorid içerir.

Bu maddenin, cilt veya mukoza zarlarıyla temas etmesine izin verilmemelidir.

Hidrojen peroksit (substrat), kimyasal yanıklara neden olabilir. Dikkatle kullanın.

Durdurma çözeltisi, 1 N sülfürik asit içerir. Ciltle veya giysilerle temasını önleyin.

Reaktif cildinizle temas ederse, cildinizi suyla yıkayın.

Potansiyel olarak bulaşıcı numunelerle temas eden tüm reaktifler ve malzemeler, uygun dezenfektanlarla işleminden geçirilmeli veya 121 °C'de en az bir saat boyunca otoklavda tutulmalıdır. DİKKAT: Zehirli gaz oluşumunu önlemek için, Durdurma çözeltisi içeren tüm sıvı atıkların, hipoklorit çözeltisine eklenmeden önce nötralize edilmeleri gerekir.

## 8. Örnekleri toplama ve saklama

Gaita örnekleri, mümkünse soğutulmuş olarak taşınmalı ve test öncesine 2 - 8 °C'de saklanmalıdır. Örnekler alındıktan sonra hemen (3 gün içinde) kullanılmayacaksa, örneklerin -20 °C veya daha düşük sıcaklıkta saklanmalarını öneriyoruz. Gaita örnekleri dondurulduğunda, nötrofilik granülositler patlayabilir ve calprotectin salabilir. Bu da, dondurulmuş örneklerdeki calprotectin konsantrasyonunu taze örneklerdekine kıyasla hafifçe artırabilir. Örneği tekrar tekrar dondurmaktan ve çözmekten kaçının. Gaita örnekleri, koruyuculu nakil ortam maddesi, hayvan serası, metal iyonları, oksitleyici ajanlar veya deterjanlar içeren nakil kaplarında toplanmamalıdır, çünkü bunlar RIDASCREEN® Calprotectin testiyle etkileşime girebilirler.

## 9. Test prosedürü

### 9.1. Genel bilgiler

Tüm reaktifler ve mikro-titrasyon plakası **Plate** kullanılmadan önce oda sıcaklığına (20 - 25 °C) getirilmelidir. Oda sıcaklığına ulaştıktan sonra mikro-titrasyon striplerini alüminyum torbadan çıkarın. Reaktifleri kullanmadan hemen önce iyice karıştırın. Kullandıktan sonra, mikro-titrasyon stripleri (mühürlü torbalara yerleştirilmiş) ve reaktifler yine 2 - 8 °C'de saklanmalıdır. Mikro-titrasyon stripleri bir kez kullanıldıktan sonra tekrar kullanılmamalıdır. Reaktifleri ve mikro-titrasyon striplerini, ambalajları hasarlıysa veya kaplar sıkıca kapatılmamışsa kullanılmayın. Çapraz kontaminasyonu önlemek için, örneklerin kit bileşenleriyle doğrudan temas etmesi önlenmelidir. Test doğrudan güneş ışığında gerçekleştirilmemelidir. Buharlaştırma kayıplarını önlemek için mikro-titrasyon plakasını örtmeyi veya plastik örtüyle mühürlemeyi öneririz.

### 9.2. Yıkama tamponunu hazırlama

1 parça konsantre yıkama tamponunu **Wash** 9 parça distile suyla (1:10 AM) karıştırın. Bu adım için, 100 ml konsantreyi 1,000 ml'lik bir ölçüm silindirine ekleyin ve 1,000 ml'ye kadar distile suyla doldurun. Konsantrede mevcut olabilecek kristaller, ısıtarak (37 °C'de su banyosunda) önceden çözülmelidir.

### 9.3. Ekstraksiyon tamponunu hazırlama

1 parça ekstraksiyon tamponunu **Extract** (100 ml) 2 parça distile suyla (200 ml) (1:3) karıştırın.

### 9.4. Örnek hazırlama

Gaita örnekleri, kullanılmadan önce mümkünse sürekli olarak 2 - 8 °C'de saklanmalıdır. Daha uzun süreli saklama (>3 gün) için, örnekleri -20 °C veya daha düşük sıcaklıkta tutun. Dondurulmuş örnekleri, oda sıcaklığına yavaş yavaş uyum sağlamalıdır.

#### 9.4.1 Tartarak örnek hazırlama ve süspansiyon etme

100 mg gaita örneğini etiketli bir test tüpünde tartın ve ardından bir pipet kullanarak 5 ml seyreltilmiş ekstraksiyon tamponunu ekleyin (1:50 seyreltme). Alternatif olarak, 80 ve 130 mg arasında gaita örneğini test tüpüne yerleştirin ve bir sabit seyreltme oranını (1:50) korumak için orantısal olarak daha küçük veya daha büyük bir seyreltilmiş ekstraksiyon tamponu hacminde süspansiyon edin (bkz. Tablo 1).

**Tablo 1:** Tartılan gaita miktarına bağılı olarak gerekli seyreltilmiş ekstraksiyon tamponu miktarına ilişkin veriler

Örnek ağırlığı [mg]	Hacim [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

5 ml'lik bir sabit ekstraksiyon tamponu hacminde yeniden süspansiyon sırasında, değışken seyreltme faktörü, hesaplamada dikkate alınmalıdır (bkz. Tablo 2).

**Tablo 2:** Tartılan gaita örneğı miktarına bağılı olarak sabit seyreltilmiş ekstraksiyon tamponu eklenmesiyle (5 ml) seyreltme faktörüne ilişkin veriler

Örnek ağırlığı [mg]	Hacim [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

Gaita süspansiyonu, gaita örneğı tartmak için kullanılan yöntem ne olursa olsun, bir vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılarak homojenize edilir. Gaita sıvı formdaysa, tam olarak 100 µl almak için bir pipet kullanın ve bunu tam olarak 5 ml seyreltilmiş ekstraksiyon tamponunda süspanse edin.

Ekstraksiyon tamponu eklendikten sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmeli ve ardından tekrar iyice vortekslenmelidir. Ardından homojenize süspansiyon, kaba gaita partiküllerinin çökeltilerek uzaklaştırılması için en az 3.000xg



kuvvetinde 10 dakika boyunca santrifüjlenmelidir. Testte hemen kullanmak üzere ekstratın üst fazını ayrıca seyreltmeyi öneriyoruz.

#### **a. Elle numune seyreltme**

20 µl berraklaştırılmış üst faz, 980 µl RIDASCREEN® örnek seyreltme tamponunda **Diluent | 3** ek olarak seyreltilir (1:50). Ardından nihai seyreltilmiş gaita örneğinden 100 µl testte kullanılır.

Alternatif olarak, örnekler RIDASCREEN®TUBE Calprotectin (öğe no. GZ3016, bkz. 9.4.2.) kullanılarak hazırlanabilir ve homojenize edilebilir.

#### **b. Bir otomatik sistemde numune seyreltme**

Tahlil, DSX otomatik ELISA sisteminde (Dynex Technologies, Inc.) çalışılacaksa, bunun için gerekli olan spesifik tahlil protokolü R-Biopharm AG'den istenmeli ve sisteme uygulanmalıdır. Ardından örnek aşağıdaki açıklandığı gibi otomatik olarak seyreltilir.

20 µl berraklaştırılmış üst faz, otomatik ELISA sistemi tarafından bir derin kuyucuk plakasına pipetlenir ve 980 µl seyreltilmiş **Diluent | 3** ile seyreltilir (1:50). Ardından iki karıştırma döngüsü gerçekleştirilir.

Gereken sayıda mikro-titrasyon stripi, RIDASCREEN® Calprotectin mikro-titrasyon plakası **Plate** için strip tutucuya yerleştirilir. Derin kuyucuk plakasında, 100 µl seyreltilmiş örnek, RIDASCREEN® calprotectin mikro-titrasyon plakasına **Plate** aktarılır (nihai seyreltme 1:2.500).

Testin diğer ELISA otomatik pipetleme sistemleriyle gerçekleştirilmesine ilişkin talimatlar için lütfen R-Biopharm AG'yi arayın.

#### **9.4.2 RIDA®TUBE Calprotectin (öğe no. GZ3016) ile örnek hazırlama ve süspansiyon etme**

RIDA®TUBE Calprotectin (öğe no. GZ3016), 9.4.1'de açıklanan hazırlama ve süspansiyon etmek için gaita örneklerini tartmanın hızlı ve temiz bir alternatifidir. Bu, RIDASCREEN® Calprotectin'in bir aksesuarı olarak sunulmaktadır ve örnek hazırlamayı önemli ölçüde basitleştirmektedir.

10 mg gaita örneği, 2,5 ml kullanıma hazır ekstraksiyon tamponuyla önceden doldurulmuş RIDA®TUBE Calprotectin'e eklenir. Gaita örneği sıvıysa, 10 µl gaita örneği, pipet kullanılarak alınabilir ve ekstraksiyon tamponuna doğrudan pipetlenebilir.

Örnek toplama ve ekstraksiyon prosedürü, RIDA®TUBE Calprotectin'e eklenmiş talimatlarda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır ve ayrıca aşağıdaki adresten indirilebilir: [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Gaita ekstratlarını testte seyreltmeden hemen sonra kullanılmasını öneriyoruz.

### a. Elle numune seyreltme

GZ3016 kullanma talimatlarının 8. ögesinde açıklandığı gibi, RIDA®TUBE Calprotectin (öge no. GZ3016) kullanılarak elde edilmiş gaita süspansiyonundan 100 µl, 900 µl RIDASCREEN® örnek seyreltme tamponu [Diluent | 3] içerisinde ayrıca seyreltilir. Ardından nihai seyreltilmiş gaita örneğinden 100 µl testte hemen kullanılır.

### b. Bir otomatik sistemde numune seyreltme

Tahlil, DSX otomatik ELISA sisteminde (Dynex Technologies, Inc.) çalışılacaksa, bunun için gerekli olan spesifik tahlil protokolü R-Biopharm AG'den istenmeli ve sisteme uygulanmalıdır.

Gereken sayıda mikro-titrasyon stripi, RIDASCREEN® Calprotectin mikro-titrasyon plakası [Plate] için strip tutucuya yerleştirilir. Gaita tüpüyle ekstrakte edilen gaita süspansiyonu, ELISA sisteminde mikro-titrasyon plakası [Plate] üzerinde 1:10 oranında otomatik olarak seyreltilir (nihai seyreltme 1:2.500). RIDA®TUBE Calprotectin'den (öge no. GZ3016) gelen gaita süspansiyonundan 10 µl, doğrudan calprotectin mikro-titrasyon plakasına pipetlenir ve 90 µl [Diluent | 3] ile ayrıca seyreltilir.

Testin diğer ELISA otomatik pipetleme sistemleriyle gerçekleştirilmesine ilişkin talimatlar için lütfen R-Biopharm AG'yi arayın.

## 9.5. İlk inkübasyon

Tutucuya yeterli sayıda kuyucuk yerleştirdikten sonra, 100 µl kalibratörü [Calibrator] (1-noktalı kalibrasyon prosedürü, çift olarak yapılması önerilir) veya 100 µl Standart 1 ila Standart 5'i [Standard 1] – [Standard 5] (standart eğri prosedürü, çift olarak yapılması önerilir) ve 100 µl RIDASCREEN® örnek seyreltme tamponunu [Diluent | 3] (=negatif kontrol), pozitif kontrolü [Control | +] ve nihai gaita örnek seyreltmesini ilgili kuyucuklara ekleyin. Bir düşük pozitif kontrol [Low control | +] kullanılıyorsa, teste ayrıca 100 µl ekleyin. Sonra plakayı oda sıcaklığında (20 - 25 °C) en az bir saat boyunca inkübe edin.

## 9.6. İlk yıkama

Doğru sonuçlara ulaşmak için dikkatli yıkama önemlidir ve bu nedenle, talimatlara kesin olarak uyularak gerçekleştirilmelidir. Kuyucuklardaki inkübe edilmiş madde, dezenfeksiyon için hipoklorit çözeltisini içeren bir atık kabına boşaltılmalıdır. Daha sonra kalan nemi uzaklaştırmak için plakayı emici kağıdın üzerine vurun. Ardından her seferinde 300 µl seyreltilmiş yıkama tamponu kullanarak plakayı 5 kez yıkayın (bkz. 9.2). Her yıkamadan sonra, absorban kağıdın halen kuru ve kullanılmamış olan bir bölümüne vurarak kuyucukların tamamen boşaldıklarından emin olun.

**Not: Bir mikro-plaka yıkayıcı kullanıyorsanız, makinenin kullanılmakta olan mikro-titrasyon plakasının tipine göre doğru ayarlandığını kontrol edin. Ayrıca ilk yıkama öncesinde partiküllerden tamamen arındırılmış olmayan bir gaita süspansiyonu, yıkama iğnelerinin tıkanmasını önlemek için santrifüjlenerek elle uzaklaştırılmalıdır.**

**Not: Ayrıca her yıkama aşaması sırasında tüm sıvının aspire edildiğinden emin olun. Son kez yıkadıktan sonra, kalan nemi uzaklaştırmak amacıyla plakayı temiz bir absorban kağıdın veya laboratuvar havlularının üzerine iyice vurun.**

## 9.7. İkinci inkübasyon

Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat **Conjugate** ekleyin. Sonra plakayı oda sıcaklığında (20 - 25 °C) en az bir saat boyunca inkübe edin.

## 9.8. İkinci yıkama

İnkübasyon döneminin ardından, kuyucuklardaki konjugatı, dezenfeksiyon için hipoklorit çözeltisini içeren bir atık kabına boşaltın. Daha sonra kalan nemi uzaklaştırmak için plakayı emici kağıdın üzerine vurun. Ardından her seferinde 300 µl yıkama tamponu kullanarak plakayı beş kez yıkayın. Her yıkamadan sonra, absorban kağıdın halen kuru ve kullanılmamış olan bir bölümüne vurarak kuyucukların tamamen boşaldıklarından emin olun.

## 9.9. Üçüncü inkübasyon

Her bir kuyucuğa 100 µl substrat **SeroSC** ekleyin. Ardından plakayı oda sıcaklığında (20 - 25 °C), karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edin. Daha sonra, her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi **Stop** ekleyerek reaksiyonu durdurun. Dikkatle karıştırdıktan (plakanın kenarına hafifçe vurarak) sonra, absorbansı 450 nm'de ve 620 nm referans dalga boyunda ölçün.

**Not: Yüksek pozitiflikteki hasta örnekleri, substratın siyah renkli çökmesine neden olabilir. Bu örnekler, 1:10 oranında seyreltilmeli ve testte tekrar kullanılmalıdır (bkz. 9.5.) (Gaita örneğinin nihai seyreltmesi: 1:25000).**

## 10. Kalite kontrol – Reaktif bozulması göstergesi

Kalite kontrol amacıyla, reaktiflerin stabilitesini ve testin doğru gerçekleştirilmesini sağlamak için kalibratör **Calibrator** (1-noktalı kalibrasyon, çift olarak yapılması önerilir) veya Standart 1 ila Standart 5 **Standard 1** – **Standard 5** (standart eğri, çift olarak yapılması önerilir), RIDASCREEN® örnek seyreltme tamponu **Diluent | 3** bir negatif kontrol olarak ve pozitif kontrol **Control | +** testin yapıldığı her durumda kullanılmalıdır. Düşük pozitif kontrol kullanımı isteğe bağlıdır. Negatif kontrolün 450 nm/620 nm'deki ekstinksiyon ortalaması (OD) 0,05'ten küçükse ve kalibratörün (1-noktalı kalibrasyon kullanılıyorsa) ortalaması alınmış ekstinksiyon ortalaması (OD) partiye özgü veri formunda belirtilen aralığın içerisindeyse, test doğru gerçekleştirilmiştir. Kalibratör ve beş standart kullanılıyorsa, pozitif kontrol, testin geçerliliğine ilişkin bilgiler sağlar. Konsantrasyon aralığı, veri formunda belirtilen partiye özgü aralığın içerisinde olmalıdır.

RIDASCREEN® Calprotectin açık, tam otomatik ELISA sistemlerinde işleniyorsa, kalibratörün **Calibrator** (1-noktalı kalibrasyon kullanılıyorsa) OD'si, sisteme bağlı olarak partiye özgü sertifikada belirtilen aralıktan sapabilir. Tam otomatik ELISA sistemlerinde bile, pozitif kontrol **Control | +** test sonuçlarının geçerliliği için kesin belirleyicidir ve bu nedenle her zaman test edilmelidir. Düşük pozitif kontrolü **Low control | +** kullanmak kesin olarak zorunlu değildir.

Gerekli değerlerden sapma, reaktif bulanıklığı veya kuyucuklara doldurulmadan önce renksiz olan substratın bulanık mavi renkli olması, reaktiflerin son kullanma tarihlerinin geçtiğini gösteriyor olabilir. Gerekli değerlere ulaşamıyorsa, test tekrarlanmadan önce aşağıdaki hususlar kontrol edilmelidir:

- Kullanılan reaktiflerin son kullanma tarihi
- Kullanılan ekipmanın fonksiyonelliği (örn. kalibrasyon)
- Doğru test prosedürü
- Kontaminasyon veya sızıntılar için kit bileşenlerinin gözle kontrolü; maviye dönen bir substrat solüsyonu kullanılmamalıdır.

Test tekrarlandıktan sonra koşullar yine karşılanmıyorsa, lütfen üreticiye veya yerel R-Biopharm distribütörünüze başvurun.

## 11. Değerlendirme ve yorumlama

Calprotectin'in mg/kg gaitadaki konsantrasyonu, RIDASCREEN® Calprotectin ELISA'yla ya 1-noktalı kalibrasyon prosedürü (bkz. 11.1.) 4 parametrelili lojistik log modeline göre (4PL) veya bir standart eğri prosedürü (bkz. 11.2.) kullanılarak belirlenir.

Sonuçları hesaplamak için RIDA®SOFT Win.NET değerlendirme yazılımı gereklidir. RIDA®SOFT Win.NET veya güncellemeleri, R-Biopharm AG veya yerel R-Biopharm distribütörünüz aranarak istek üzerine elde edilebilir.

RIDA®SOFT Win.net yerine 4 parametrelili lojistik log modeli sağlayan başka değerlendirme yazılımı da kullanılabilir.

### 11.1. 4 parametrelili lojistik log modeline göre tek noktalı nicelleştirme

Standart eğrinin 4PL hesaplaması için gereken parametreler (A - D) ve kalibratör, pozitif kontrol ve düşük pozitif kontrol için hedef değer, test kitiyle birlikte gelen partiye özgü veri sayfasında bulunmaktadır ve bunların, ölçüm öncesinde değerlendirme yazılımındaki değerlerle karşılaştırılmaları gerekir.

Nihai kalite kontrolde, R-Biopharm AG, standart eğriyi (A - D parametreleri dahil) her bir kit partisi için optimum test koşullarında hesaplar ve ayrıca kalibratör, pozitif kontrol ve düşük pozitif kontrol OD'si için bir hedef değeri ve bir izin verilebilir konsantrasyon aralığını hesaplar. Kalibratör, test dalgalanmalarını telafi etmek ve test prosedürünün kalitesini kontrol etmek için de test edilir. Pozitif kontrol, testin geçerliliğine ilişkin bilgiler sağlar.

RIDA®SOFT Win.net, kalibratör çift analizinin ortalaması ve bunun hedef değerinden düzeltme faktörü F'yi dahili olarak hesaplar. Bu düzeltme faktörü, daha sonra dışkı örnekleri için absorbanslarla karşılaştırılır. Test sonuçları, standart eğrinin sınırları içerisinde güvenle ve emin bir şekilde değerlendirilebilir.

### 11.2. Standart eğri kullanarak değerlendirme

RIDASCREEN® Calprotectin, her bir çalışmaya eklenmesi gereken bir standart eğriyle değerlendirilir. Bir standart eğri örneği, birlikte verilen lota özgü veri sayfasından alınabilir.

Nihai kalite kontrolde, R-Biopharm AG, her bir kit lotu için bir referans değeri ve pozitif kontrol ve düşük pozitif kontrol için izin verilen bir konsantrasyon aralığını optimum test koşullarında belirler. Standart eğriyle nicelleştirme için, pozitif kontrol, testin geçerliliğine ilişkin bilgiler sağlar. Pozitif kontrol, belirtilen konsantrasyon aralığına ulaşmalıdır.

### 11.3. Test sonucu

Gaita > 50 mg/kg insan calprotectin'i şeklindeki bir kesme değerinden itibaren sonuç pozitif kabul edilir. Sonuřlar kesme değerinin altında kalıyorsa, örnekler negatif kabul edilmelidir.

Yetiřkinler için önerilen 50 mg/kg kesme değeri, 4 - 17 yaşları arasındaki çocuklar için de kullanılabilir.

Her bir laboratuvarın kendi standart değer aralığını belirlemesini öneriyoruz.

**Not: 1 noktalı kalibrasyon veya standart eğri kullanıldığında 600 mg/kg'dan fazla calprotectin konsantrasyonları gösteren örneklerin daha fazla seyreltilmeleri (Diluent 3'te 1:5 oranında) testte yeniden analiz edilmeleri önerilir.**

**Not: 1 noktalı kalibrasyonla nicelleştirildiklerinde 3,0'dan yüksek OD değerleri gösteren örneklerin daha fazla seyreltilmeleri (Diluent 3'te 1:5 oranında) testte yeniden analiz edilmeleri önerilir.**

### 12. Yöntemin sınırlamaları

RIDASCREEEN® Calprotectin, gaita örneklerinde insan calprotectin epitoplarını tespit eder. Bir tanı, yalnızca belirlenen calprotectin konsantrasyonlarına dayandırılmamalı, fakat hastanın tıbbi öyküsü de her zaman dikkate alınmalıdır.

### 13. Performans özellikleri

#### 13.1. Kesinlik

##### 13.1.1 Tahlil içi kesinlik

Tahliller içi kesinlik, her biri 40 replikat halinde 4 referans kullanılarak tek bir çalışmada test edilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen OD değerleri, kalibratör veya standart eğri yoluyla, calprotectin konsantrasyonlarını belirlemekte kullanılmıştır, bunlardan da her bir örnek için ortalama değer (MV), standart sapmalar (SD'ler) ve ölçümlerin varyasyon katsayıları (CV'ler) hesaplanmıştır.

**Tablo 3:** RIDASCREEN® Calprotectin'in tahliller içi kesinliđi

	Kalibratör			Standart eğri		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
<b>Referans A</b>	53,8	2,9	<b>5,4</b>	56,6	3,0	<b>5,3</b>
<b>Referans B</b>	96,6	5,5	<b>5,7</b>	102,4	6,3	<b>6,2</b>
<b>Referans C</b>	136,5	5,6	<b>4,1</b>	130,5	5,2	<b>4,0</b>
<b>Referans D</b>	246,7	14,1	<b>5,7</b>	267,6	15,0	<b>5,6</b>

### 13.1.2 Tahliller arası kesinlik

Tahliller arası kesinlik, farklı günlerde 4 referans kullanılarak 3 teknisyen tarafından çift halinde yapılan 20 çalışmada (günde 2 çalışma) belirlenmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen OD değerleri, kalibratör veya standart eğri yoluyla, calprotectin konsantrasyonlarını belirlemekte kullanılmıştır, bunlardan da her bir örnek için ortalama değer (MV), standart sapmalar (SD'ler) ve ölçümlerin varyasyon katsayıları (CV'ler) hesaplanmıştır.

**Tablo 4:** RIDASCREEN® Calprotectin'in tahliller arası kesinliđi

	Kalibratör			Standart eğri		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
<b>Referans A</b>	55,7	4,3	<b>7,7</b>	57,5	4,1	<b>7,1</b>
<b>Referans B</b>	106,5	7,2	<b>6,8</b>	112,8	8,3	<b>7,3</b>
<b>Referans C</b>	129,6	7,8	<b>6,0</b>	138,5	7,6	<b>5,5</b>
<b>Referans D</b>	260,9	28,3	<b>10,9</b>	284,7	22,7	<b>8,0</b>

### 13.2. Ekstraksiyon kesinliđi

Ekstraksiyon kesinliği, farklı günlerde kesme değerinin üzerindeki 3 gaita örneği kullanılarak 2 teknisyen tarafından çift halinde yapılan 10 çalışmada (5 gün, günde 2 çalışma) belirlenmiştir. Örnekler her çalışma öncesinde gerektiği gibi ekstrakte edilmiş ve seyreltilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen OD değerleri, kalibratör veya standart eğri yoluyla, calprotectin konsantrasyonlarını belirlemekte kullanılmıştır, bunlardan da her bir örnek için ortalama değer (MV), standart sapmalar (SD'ler) ve ölçümlerin varyasyon katsayıları (CV'ler) hesaplanmıştır.

**Tablo 5:** Tahliller arası ekstraksiyon kesinliđi

	Kalibratör			Standart eğri		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Referans A	64,0	5,0	<b>7,9</b>	67,4	5,0	<b>7,5</b>
Referans B	114,1	10,3	<b>9,0</b>	123,2	10,7	<b>8,7</b>
Referans C	264,0	33,3	<b>12,6</b>	284,8	22,1	<b>7,8</b>










#### 14. Sürüm geçmiři

Sürüm numarası	Bölüm ve adlandırma
2019-07-01	Genel revizyon 14. Sürüm geçmişi 15. Simgelerin açıklamaları


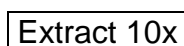
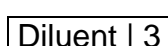
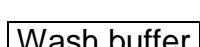
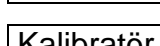
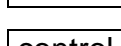
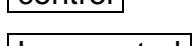
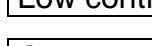
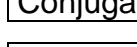



## 15. Simgelerin açıklamaları

### Genel simgeler

	İn vitro tanı amaçlı kullanım için
	Kullanma talimatlarına bakın
	Lot numarası
	Son kullanma tarihi
	Saklama koşulu
	Artikel numarası
	Test sayısı
	Üretim tarihi
	Üretici firma

### Teste özel simgeler

	Mikro-titrasyon plakası
	Ekstraksiyon ve seyreltme tamponu
	Örnek seyreltme tamponu
	Yıkama tamponu 10x
	Kalibratör
	Pozitif kontrol
	Düşük pozitif kontrol
	Conjugat
	Substrat
	Durdurma çözeltisi

## 16. Referanslar

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.