

RIDASCREEN® Calprotectin

Код: G09036



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Предназначение набора

Для диагностики *in vitro*. Набор RIDASCREEN® Calprotectin это иммуноферментный тест для количественного определения калпротектина в образцах стула человека.

2. Общая информация и пояснения к тесту

Калпротектин – это белок, связывающий кальций, вырабатывается в клетках, таких, как нейтрофилы, и выделяется при воспалительных процессах.

Фекальный калпротектин служит биологическим маркером воспалений или неоплазий желудочно-кишечного тракта.

Калпротектин, (известный так же, как MRP-8/14, калгранулин A/B и S100A8/A9) это белок, относящийся к группе белков S100, который связывает кальций и цинк.

Связывание кальция калпротектином происходит в физиологических условиях. Благодаря своему свойству связывания кальция, калпротектин является стабильным белком, который высоко устойчив к нагреванию и протеолизу.

Калпротектин вырабатывается как нейтрофилами (neutrophil granulocytes), так и моноцитами. Концентрация калпротектина в цитозоле в нейтрофилах колеблется в пределах от 5 до 15 мг/л, что составляет около 60% растворимой фракции белков цитозоля и 5% от общей белковой фракции этих клеток. Биологическая функция калпротектина выяснена не до конца. На сегодняшний день установлено, что калпротектин выполняет функцию биологической защиты клеток от лейкоцитарных и бактериальных протеаз. Так же предполагается, что благодаря своей цинк-связывающей способности, калпротектин обладает антибактериальными свойствами. Кроме того, калпротектин проявляет как внутри-, так и экстрацеллюлярную регуляторную функцию при воспалительных процессах.

При наличии воспалительных интестинальных заболеваний, нейтрофилы попадают в просвет кишечника и выделяют калпротектин, который выделяется с калом. Концентрация калпротектина в кале коррелирует с количеством нейтрофилов, которые мигрируют в просвет кишечника и выделяют там калпротектин. Таким образом, концентрация фекального калпротектина может использоваться в качестве показателя количества нейтрофилов в просвете кишечника и служить индикатором степени тяжести интестинальных воспалительных процессов.

С клинической точки зрения, особая актуальность измерения фекального калпротектина заключается в его значимости для достоверной диагностики воспалительных заболеваний кишечника. В большинстве случаев хронические воспалительные процессы в кишечнике (IBD) вызывают симптомы, которые очень трудно отличить от симптомов, сопровождающих синдром раздражённого кишечника (IBS). Определение концентрации фекального калпротектина является достоверным индикатором наличия воспалительного процесса в кишечнике. Благодаря использованию этого биомаркера, многие пациенты с синдромом раздражённого кишечника могут быть избавлены от необходимости исследования методом колоноскопии.

В многочисленных публикациях была отмечена высокая корреляция концентрации калпротектина с гистологическими и эндоскопическими параметрами активности заболевания у пациентов с хроническими воспалительными процессами в кишечнике. Таким образом, измерение фекального калпротектина позволяет

объективно оценивать ответ на лечение хронических воспалительных процессов кишечника и проводить мониторинг таких пациентов по ходу клинической ремиссии, для того, чтобы как можно раньше выявить рецидивы IBD и начать своевременное лечение.

Фекальный калпротектин необходимо определять в следующих ситуациях:

- Для достоверной дифференциации хронических воспалительных процессов кишечника и синдрома раздражённого кишечника
- Для раннего обнаружения очагов воспалительного процесса в кишечнике
- Для объективного документирования степени тяжести воспаления, для мониторинга ответа на протяжении курса лечения
- В качестве маркера острого воспалительного процесса в кишечнике

3. Принцип теста

В наборе RIDASCREEN® Calprotectin специфические антитела задействованы по принципу сэндвич-метода. Моноклональные антитела к эпитопам калпротектина человека наносятся на поверхность микролунок в плашках. Суспензию образца стула, предназначенную для тестирования, вносят в микролуночки и инкубируют. За этапом промывки следует этап второй инкубации с моноклональными антителами, которые конъюгированы с пероксидазой хрена. В присутствии калпротектина формируется сэндвич комплекс, собранный из иммобилизованных антител, калпротектина и конъюгированных антител. Неприсоединившиеся, меченые ферментом антитела, удаляются во время следующего этапа промывки. После добавления субстрата, присоединённый фермент изменяет цвет раствора, находящегося в лунках микротитровальной плашки, из прежде прозрачного в голубой, в том случае, если тест положительный. При внесении стоп реагента, цвет раствора переходит из голубого в жёлтый. Величина абсорбции пропорциональна концентрации калпротектина, присутствующего в образце.

4. Поставляемые реагенты

Состав набора реагентов, рассчитанный на 96 определений

Plate Плашка	96 определений	Микротитровальная плашка из 12 микролуночных стрипов (разборная) в стрип холдере; сорбированная моноклональными (мышинными) антителами против калпротектина человека
Extract Экстракт	2x100 мл	Буфер для экстракции и разведения (3x концентрат); Трис-буфер; содержит 0.05 % NaN ₃
Diluent 3 Дилуэнт 3	100 мл	Буфер для разведения образцов; белково-буферный раствор NaCl; содержит 0.1% NaN ₃ ; готов к работе; окрашен в красный цвет
Wash Промывочный буфер	100 мл	Буфер для промывки, (10x концентрат), фосфатно-буферный раствор NaCl; содержит 0.1 % мертиолят и 0,1% детергент
Calibrator Калибратор <i>Прозрачная крышка</i>	1 мл	Калибратор (для калибровки по одной точке); содержит 0,1% NaN ₃ , готов к работе.
Standard 1 - Standard 5 <i>Белая крышка</i>	1 мл	5 Стандартов (для построения стандартного графика); Концентрации калпротектина в стандартах от 1 до 5: 19.5 / 56 / 95 / 275 / 800 мг/кг; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к работе
Control + Положительный контроль <i>Красная крышка</i>	1 мл	Положительный контроль; содержит 0,1% NaN ₃ , готов к работе
Low control + Слабо положительный контроль <i>Зелёная крышка</i>	1 мл	Слабо положительный контроль; содержит 0,1% NaN ₃ , готов к работе
Conjugate Конъюгат	12 мл	Конъюгированные пероксидазой моноклональные антитела (мышинные) в стабилизированном белковом растворе; готовы к работе
SeroSC Субстрат	12 мл	Субстратный раствор, Перекись водорода/тетраметилбензидин (ТМБ); готов к использованию
Stop Стоп реагент	12 мл	Стоп раствор, 1 N серная кислота, готова к использованию

5. Инструкции по хранению

Все реагенты должны храниться при 2 – 8 °С и могут быть использованы после открывания до истечения срока годности, указанного на этикетке. Растворённый промывочный буфер должен быть использован в течение 4 недель, при условии, что хранится при 2 - 8°С. Растворённый буфер для экстракции может храниться до 6 месяцев при температуре 2 – 8 °С. Не допускается микробная контаминация. Гарантия качества не сохраняется после окончания срока годности. Упаковку из

фольги для микролуночных стрипов следует открывать таким образом, чтобы не повредить зажим, обеспечивающий герметичность. Невостребованные микролуночки нужно немедленно вернуть назад в упаковку и хранить при 2 - 8 °С. Бесцветный раствор субстрата следует защищать от попадания прямого солнечного света чтобы предотвратить его разложение, а так же нельзя допускать самоокисления с последующим развитием голубой окраски. Если субстрат стал голубым, его нельзя использовать.

6. Материалы необходимые, но не поставляемые

6.1. Реагенты

– дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Дополнительные материалы

- Микровесы или RIDA®TUBE Calprotectin(Код GZ3016)
- Вортекс-миксер (по усмотрению, см. Пункт 9.4.)
- Микропипетки с объёмами 20 - 100 μ л и 1 мл
- Мерный цилиндр (1000 мл)
- Лабораторный таймер
- Промыватель плашек или восьмиканальная пипетка (300 μ л)
- Микроплащечный фотометр (450 нм; референсная длина волны \geq 620 нм)
- Фильтровальная бумага (лабораторные бумажные полотенца)
- Ёмкость для отходов с 0,5% раствором гипохлорита

7. Предупреждения для пользователей

Только для диагностики *in vitro*.

Это тестирование может выполняться только специально обученным и хорошо подготовленным персоналом. Следует строго соблюдать рекомендации руководства по работе в медицинских лабораториях и строго придерживаться инструкции по выполнению теста.

Образцы стула надо рассматривать, как потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним в соответствии с национальными правилами безопасности.

Недопустимо пипетировать ртом образцы и реагенты, нельзя допускать контакта с повреждёнными кожными покровами и слизистыми. При работе с образцами, обязательно надевать перчатки и по окончании тестирования тщательно мыть руки. Нельзя курить, принимать пищу и пить в помещении, где работают с образцами или реагентами для тестирования.

В концентрате промывочного буфера в качестве консерванта содержится 0,1% мертиолят. Нельзя допускать, чтобы это вещество попадало на кожу или слизистые мембраны.

Калибратор, стандарты, высокоположительный контроль и слабоположительный контроль, буфер для экстракции и разведения образцов содержат в качестве

консерванта 0,05% и 0,1% NaN₃. Не допускайте попадания этих веществ на кожу и слизистые мембраны.

Перекись водорода (субстрат) может вызвать ожоги. Обращаться с особой осторожностью.

Стоп-реагент содержит 1N серную кислоту. Не допускайте контакта с кожей и одеждой. Если кислота попала на кожные покровы, смойте её избыточным количеством воды.

Все реагенты и материалы, находившиеся в контакте с потенциально инфекционными образцами, должны быть обработаны доступными дезинфектантами или автоклавированы при 121 °C в течение 1 часа. ВНИМАНИЕ: чтобы предотвратить образование ядовитых газов, любые остатки жидкостей, содержащих стоп-реагент, необходимо сначала нейтрализовать, и только потом сливать в раствор гипохлорита.

8. Сбор и хранение образцов

Образцы стула должны быть доставлены в лабораторию как можно скорее, и до тестирования храниться при 2 - 8 °C . Если они не будут использованы немедленно по прибытии, (в течение 3-х дней после доставки), мы рекомендуем хранить их при температуре -20 °C или ниже. При замораживании нативных образцов стула, нейтрофильные гранулоциты могут разрушиться и высвободить калпротектин. Это обычно приводит к тому, что в результате наблюдается незначительное повышение концентрации калпротектина в образцах, подвергшихся замораживанию, по сравнению со свежими образцами. Не допускается повторное замораживание и оттаивание. Не следует собирать образцы стула в контейнеры, содержащие транспортные среды с консервантами, сыворотку животных, ионы металлов, окисляющие агенты или детергенты, поскольку эти вещества могут вызвать интерференцию при тестировании на наборе RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Ход работы

9.1. Общая информация

Все реагенты и микролунки перед работой следует довести до комнатной температуры (20 – 25 °C). Микролуночные стрипы нельзя извлекать из упаковки до тех пор, пока они не достигнут комнатной температуры. Перед самым использованием, тщательно перемешайте реагенты. По окончании работы микролуночные стрипы в упаковке из фольги с герметичным зажимом и все реагенты необходимо немедленно поместить в холодильник и хранить при 2 - 8 °C. Микролуночные стрипы могут быть использованы только один раз. Нельзя использовать реагенты и стрипы, если упаковка повреждена или произошла утечка реагентов из флаконов. Чтобы не допустить перекрёстной контаминации, образцы не должны соприкасаться с компонентами набора. Тестирование может не пройти при попадании прямого солнечного света. Рекомендуется накрывать плашки во время инкубации или запечатывать клейкой плёнкой, во избежание испарения и потерь.

9.2. Подготовка промывочного буфера

Смешайте 1 часть концентрированного промывочного буфера **Wash** с 9 частями дистиллированной воды (в соотношении 1:10). Для этого внесите 100 мл концентрата в мерный цилиндр на 1000 мл и доведите дистиллированной водой объём до метки 1000 мл. Если в концентрате присутствуют кристаллы соли, их надо растворить заранее, нагревая раствор на водяной бане при 37 °С.

9.3. Подготовка буфера для экстракции

Смешайте 1 часть концентрированного буфера для экстракции **Extract** с 2 частями дистиллированной воды (в соотношении 1:3).

9.4. Подготовка образцов

До использования, образцы стула, по возможности, должны храниться при 2 - 8 °С. Если они не будут использованы немедленно по прибытии, (в течение 3-х дней после доставки), мы рекомендуем хранить их при температуре -20 °С или ниже. Замороженные образцы должны медленно достичь комнатной температуры.

9.4.1. Навеска и суспензия образца

В маркированную тестовую пробирку отвесьте ровно 100 мг образца стула, после чего, используя пипетку, добавьте ровно 5 мл разбавленного буфера для экстракции (т.о. конечное соотношение будет 1:50).

Как альтернатива, можно отвесить от 80 до 130 мг образца стула и ресуспендировать в соответственно увеличенном или уменьшенном объёме (см. Таблицу 1) разбавленного буфера для экстракции (убедитесь, что соотношение объёмов для разведения сохраняется строго 1:50).

Таблица 1. Данные по требуемым количествам разбавленного буфера для экстракции, в зависимости от навески стула

Навеска [мг]	Объём [мл]
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

Если образец стула ресуспендируется в неизменном объёме - 5 мл буфера для экстракции, при оценке следует принимать в расчёт изменяемый коэффициент разведения (см. Таблицу 2).

Таблица 2. Спецификации коэффициента разведения при добавлении неизменного объёма буфера для экстракции (5 мл) в зависимости от навески образца стула

Навеска [мг]	Фактор разведения [мл]
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

Суспензию стула тщательно гомогенизируют на вихревом вортексе-миксере, независимо от того, какая была взята навеска образца стула. Если стул – жидкой консистенции, мы рекомендуем воспользоваться пипеткой, для того чтобы отмерить точно 100 мкл и ресуспендировать их в точном объёме 5 мл разбавленного буфера для экстракции.

После чего, образец следует инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут, потом тщательно взболтать на авортексе.

Затем отцентрифугируйте гомогенизированную суспензию при 3000 g в течение 10 минут, для того чтобы осадить крупные частички стула. После чего, полученный супернатант экстракта надо разбавить и немедленно использовать для тестирования.

а. Мануальное разведение образцов

Разбавьте 20 мкл прозрачного супернатанта в 980 мкл буфера для разведения образцов Diluent | 3 (1:50). После чего, 100 мкл конечного разведения образца стула можно взять в работу.

Допускается альтернативный описанному выше, способ подготовки и гомогенизации образцов, при помощи набора RIDA®TUBE Calprotectin (Код GZ3016; см. Пункт 9.4.2.), при этом можно использовать пробирки для взятия образцов стула.

б. Автоматическое разведение образцов

Если тестирование выполняется на полностью автоматизированной системе DSX-ELISA system, поставляемой Dynex Technologies, Inc, R-Biopharm AG предоставит необходимый протокол исследования и инсталлирует его в систему. Система выполнит автоматическое разведение образцов по протоколу, приведённому ниже:

Прозрачный супернатант в объёме 20 мкл пипетируют в лунки глубоких микроплашек (deep-well plate) на автоматизированной системе ELISA и разводят в 980 мкл

разбавленного буфера для экстракции (1:50). Далее следуют два цикла перемешивания.

Микролуночные стрипы в необходимом количестве вставляют в специальную рамку микротитровальной плашки **Plate** из набора RIDASCREEN® Calprotectin.

100 µл аликвот разбавленного образца стула отбирают из глубоких лунок (deep-well plate) и переносят в микротитровальную плашку **Plate** набора RIDASCREEN® Calprotectin (конечное разведение 1:2500).

Пожалуйста, обратитесь в R-Biopharm AG, чтобы получить инструкцию о том, как проводить тестирование на других иммуноферментных (ELISA) системах с автоматическим пипетированием.

9.4.2. Подготовка образца и суспензии с применением набора RIDA®TUBE Calprotectin(Код GZ3016)

Набор RIDA®TUBE Calprotectin(Код GZ3016) может быть использован, как быстрое и чистое дополнение для подготовки образца и суспензии, альтернативное методике, описанной в пункте 9.4.1, при которой необходима точная навеска образца стула. Пробирки, поставляемые в этом наборе, в дополнение к набору RIDASCREEN® Calprotectin, значительно упрощают процедуру подготовки образца.

Каждый комплект RIDA®TUBE Calprotectinпоставляется с предварительно заполненными 2.5 мл буфера для экстракции, готового к работе и вмещает 10 мг образца стула. При обработке жидких образцов стула, 10 µл образца стула можно отмерить при помощи пипетки и внести прямо в буфер для экстракции.

Взятие образца и протокол экстракции подробно описаны в инструкции, которая прилагается в каждом наборе RIDA®TUBE Calprotectинили может быть загружена с сайта www.r-biopharm.de.

Экстракты образцов стула нельзя хранить и их следует брать в работу сразу же после разведения.

a. Мануальное разведение образцов

100 µл суспензии стула, полученной с применением набора RIDA®TUBE Calprotectin(Код GZ3016) – как описано в Разделе 8 Инструкции для продукта GZ3016 – разбавляют в 900 µл буфера для разведения RIDASCREEN® sample dilution buffer **Diluent | 3**. 100 µл этого конечного разведения образца стула непосредственно используется для исследования.

b. Автоматическое разведение образцов

Если тестирование выполняется на полностью автоматизированной системе DSX-ELISA system, поставляемой Dynex Technologies, Inc, R-Biopharm AG предоставит необходимый протокол исследования и инсталлирует его в систему.

Необходимое для тестирования количество сорбированных микролунок помещают в холдер микролунок микротитровальной плашки **Plate** набора RIDASCREEN® Calprotectin.

При использовании автоматизированной системы ELISA, суспензия стула, полученная при помощи RIDA®TUBE Calprotectin, автоматически разбавляется в соотношении 1:10 (конечное разведение: 1:2500) непосредственно в микролуночной плашке **Plate**. С этой целью, 10 µл суспензии стула напрямую пипетируют из RIDA®TUBE Calprotectin(Код GZ3016) в микролуночки плашки RIDASCREEN® Calprotectin, и разбавляют в 90 µл буфера для разведения образца **Diluent | 3**.

Пожалуйста, обратитесь в R-Biopharm AG, чтобы получить инструкцию о том, как проводить тестирование на других иммуноферментных (ELISA) системах с автоматическим пипетированием.

9.5. Первая инкубация

Отберите необходимое для анализа количество микролунок и закрепите их в холдере, добавьте согласно схеме, в соответствующие лунки по 100 мкл калибратора **Calibrator** (при калибровке по одной точке дубляж), или по 100 мкл Стандартов 1 – 5, с **Standard 1** по **Standard 5** (при построении стандартного графика – в дубляж) буфера для разведения образцов **Diluent | 3** (= вместо отрицательного контроля), положительного контроля **Control | +** и суспензии тестируемого образца стула. При необходимости, в соответствующие лунки можно так же внести по 100 мкл слабо положительного контроля **Low control | +**. После чего, инкубируйте плашку при комнатной температуре (20 - 25 °C) в течение 1 часа.

9.6. Первая промывка

Тщательная промывка очень важна для получения правильных результатов, поэтому необходимо строго соблюдать все рекомендации инструкции. Содержимое лунок следует слить в контейнер для отходов, содержащий раствор гипохлорита натрия, для обеззараживания. После чего, следует промакнуть плашку на фильтровальной бумаге для полного удаления жидкости. Затем плашку отмывают 5 раз, каждый раз заполняя лунки 300 µл разбавленного промывочного буфера (см. Пункт 9.2). Убедитесь, что лунки не содержат остатков жидкости, для этого после каждой промывки просушите их на чистой фильтровальной бумаге или лабораторном полотенце.

Если используется плашечный промыватель, выберите правильный протокол промывки в зависимости от типа используемой плашки. Кроме того, перед первой промывкой следует вручную отобрать образцы стула, содержащие плотные частицы, чтобы не допустить засорения иглок промывателя. Так же убедитесь, что вся жидкость полностью удалена во время аспирации. После финального этапа промывки, промакните плашку на фильтровальной бумаге, чтобы полностью удалить остатки влаги.

9.7. Вторая инкубация

Внесите по 100 µл конъюгата **Conjugate** в каждую лунку. После чего инкубируйте плашку при комнатной температуре (20-25 °C) в течение 1 часа.

9.8. Вторая промывка

Содержимое лунок надо слить в контейнер для отходов, содержащий раствор гипохлорита натрия, для обеззараживания. После чего, следует промакнуть плашку на фильтровальной бумаге для полного удаления жидкости. Затем плашку отмывают 5 раз, каждый раз заполняя лунки 300 μ л разбавленного промывочного буфера. Убедитесь, что лунки не содержат остатков жидкости, для этого после каждой промывки просушите их на чистой фильтровальной бумаге или лабораторном полотенце.

9.9. Третья инкубация

Внесите в каждую лунку по 100 μ л субстрата **SeroSC**. Оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 - 25 °C) в темноте, в течение 15 минут. После чего, остановите реакцию, добавляя в каждую лунку по 50 μ л стоп реагента **Stop**.

Аккуратно перемешайте (легко потряхивая плашку на ровной поверхности) и на плашечном фотометре измерьте абсорбцию при 450 нм (с референсной длиной волны \geq 620 нм).

Внимание: В высоко положительных образцах пациентов может выпадать чёрный преципитат субстрата. Такие образцы следует опять развести 1:10, (конечное разведение образца стула при этом будет 1:25000) и выполнить повторное тестирование.

10. Контроль качества – признаки нестабильности или порчи реагентов

Для контроля качества, каждый раз при выполнении тестирования надо использовать калибратор **Calibrator** (при калибровке по одной точке - в дублях), или все с первого по пятый Стандарты 1 – 5, **Standard 1** - **Standard 5** (при построении стандартного графика – в дублях), буфер для разведения образцов **Diluent | 3** в качестве отрицательного контроля и положительный контроль **Control | +**.

Тестирование считается выполненным корректно, если экстинкция (ОП) отрицательного контроля 450 нм/620 нм меньше 0.05 и, если определённые экстинкции (ОП) калибратора вписываются в лот-специфичные пределы, указанные в прилагаемом листке данных. Значение положительного контроля является решающим для валидации результатов тестирования. Как при использовании калибратора, так и при построении калибровочного графика по пяти стандартам, значение положительного контроля должно вписываться в лот-специфичные пределы концентрации, которые тоже указаны в листке данных.

Если тестирование RIDASCREEN® Calprotectin выполняется на иммуноферментных линиях (ELISA processors), измеренное значение ОП калибратора **Calibrator** (при калибровке по одной точке) может отличаться от значения, приведённого в лот-специфичном листке данных. Это зависит от используемого аппарата. Поэтому для валидации результатов, решающим оказывается положительный контроль. Он всегда должен использоваться при выполнении тестирования на иммуноферментных линиях (ELISA processors). Использование слабо положительного контроля **Low control | +** не является обязательным.

Если значения отличаются от рекомендуемых, если субстрат стал мутным, или приобрёл голубой цвет до внесения в лунки, это может означать, что реагенты стали непригодными. Если полученные значения не соответствуют предусмотренным выше величинам, то перед повторным тестированием необходимо проверить следующие моменты:

- Срок годности используемых реагентов
- Работоспособность используемого оборудования (например, калибровка)
- Правильность хода работы
- Визуальная проверка компонентов набора на отсутствие контаминации или протекания реагентов – раствор субстрата, который стал голубым, нельзя использовать для тестирования.

Если и после повторного тестирования с соблюдением всех, выше перечисленных условий, результаты не удовлетворяют требованиям, пожалуйста, свяжитесь с Вашим местным представителем R-Biopharm.

11. Оценка и интерпретация результатов

Концентрация калпротектина в мг / кг стула, определяемая на наборах RIDASCREEN® Calprotectin, рассчитывается либо методом калибровки по одной точке (см. Пункт 11.1) в соответствии с 4 параметровой логистической логарифмической моделью (4PL), либо методом построения стандартного графика (см. Пункт 11.2).

Для того, чтобы правильно рассчитать результаты, необходима их оценка при помощи специализированного программного обеспечения RIDA®SOFT Win.net. Программу RIDA®SOFT Win.net или её адаптации можно получить от R-Biopharm AG или в местном представительстве R-Biopharm.

Как альтернатива RIDA®SOFT Win.net, может использоваться любая другая программа оценки результатов, которая позволяет проводить вычисления по 4 параметровой логистической логарифмической модели.

11.1 Количественное определение методом калибровки по одной точке (4 параметровая логистическая модель)

(A - D) параметры стандартного графика, необходимые для 4PL расчётов и для того, чтобы установить значения калибратора, положительного контроля и слабо положительного контроля, приведены в лот-специфичном листке данных, который поставляется в каждом наборе. Эти данные должны сравниваться со значениями в оценке программного обеспечения и каждого измерения с использованием соответственной информации этого листка данных.

В компании R-Biopharm AG при проведении финального контроля качества, уже определили стандартный график, (включая параметры A - D), а так же установочное значение и допустимые пределы калибратора, положительного контроля и слабо положительного контроля при оптимальных для каждого набора данной серии условиях.

Калибратор проверяют в рутинных условиях, для того чтобы компенсировать отклонения в тесте и для того, чтобы проверить качество каждого тестирования.

Положительный контроль является решающим параметром для валидации результатов тестирования.

Поправочный коэффициент F рассчитывается внутри программы RIDA®SOFT Win.net по среднему значению определённых в дублях калибратора, контроля и их установочного значения, согласующегося с абсорбцией образцов стула. Безопасная и достоверная оценка результатов может быть гарантирована только в пределах стандартного графика.

11.2 Количественное определение с построением стандартного графика

Оценку результатов тестирования набором RIDASCREEN Calprotectin можно так же выполнить при помощи стандартного графика, который надо строить при каждом тестировании. Как примерная прогрессия стандартного графика, к каждому набору прилагается листок данных, на который можно ориентироваться при построении своего графика.

При выполнении финального контроля качества, в компании R-Biopharm AG уже определили целевые значения и предусмотренные пределы концентраций для положительного контроля и слабо-положительного контроля для каждого набора при оптимальных условиях тестирования. При количественном определении с построением стандартного графика, положительный контроль является решающим для валидации результатов тестирования. Поэтому надо стремиться к получению предустановленных для положительного контроля величин.

11.3. Результаты тестирования

Принятая величина cut-off > 50 мг калпротектина / кг стула, такие результаты считаются положительными. Если же результаты находятся ниже величины cut-off, образец надо считать отрицательным.

Величина cut-off, предложенная для взрослых (50 мг/кг) может быть также использована и для детей в возрасте 4 – 17 лет.

Мы рекомендуем, чтобы каждая лаборатория устанавливала свои индивидуальные величины для каждого стандарта.

Образцы, у которых концентрация Калпротектина оказалась больше 600 мг/кг, при использовании калибровки по одной точке или стандартного графика для количественного определения, рекомендуется развести (1:5 в Diluent 3) и выполнить повторное исследование.

Образцы, у которых значения ОП оказались выше 3.0 при использовании калибровки по одной точке для количественного определения, рекомендуется развести (1:5 в Diluent 3) и выполнить повторное исследование.

12. Ограничения метода

Набор RIDASCREEN® Calprotectin улавливает эпитопы калпротектина человека в образцах стула. Для установления диагноза нельзя основываться только на определении концентрации калпротектина, необходимо так же принимать во внимание историю болезни, симптомы и клиническую картину.

13. Технические характеристики

13.1. Точность

13.1.1. Внутри-лабораторная воспроизводимость

Внутри-лабораторная воспроизводимость набора была определена при разовом тестировании с использованием 4 референсных материалов в 40 повторностях. По величинам оптических плотностей (ОП) этих измерений, были определены концентрации калпротектина. Для каждого образца рассчитали среднее значение (MV), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Результаты приведены в Таблице 3.

Таблица 3: Внутри-лабораторная воспроизводимость набора RIDASCREEN® Calprotectin

	Калибратор			Стандартный график		
	MV (мк/кг)	SD(мк/кг)	CV %	MV (мк/кг)	SD (мк/кг)	CV %
Референсный материал А	53.8	2.9	5.4	56.6	3.0	5.3
Референсный материал Б	96.6	5.5	5.7	102.4	6.3	6.2
Референсный материал С	136.5	5.6	4.1	130.5	5.2	4.0
Референсный материал Д	246.7	14.1	5.7	267.6	15.0	5.6

13.1.2. Меж-лабораторная воспроизводимость

Меж-лабораторную воспроизводимость определяли в дублях при 20 тестированиях (2 тестирования в день) с использованием 4 референсных материалов, были задействованы три лаборанта. По величинам оптических плотностей (ОП) этих измерений, были определены концентрации калпротектина. Для каждого образца рассчитали среднее значение (MV), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Результаты приведены в Таблице 4.

Таблица 4: Меж-лабораторная воспроизводимость набора RIDASCREEN® Calprotectin

	Калибратор			Стандартный график		
	MV (мк/кг)	SD(мк/кг)	CV %	MV (мк/кг)	SD (мк/кг)	CV %
Референсный материал А	55.7	4.3	7.7	57.5	4.1	7.1
Референсный материал Б	106.5	7.2	6.8	112.8	8.3	7.3
Референсный материал С	129.6	7.8	6.0	138.5	7.6	5.5
Референсный материал Д	260.9	28.3	10.9	284.7	22.7	8.0

13.2. Точность экстракции

Точность выделения определяли в дублях при 10 тестированиях (в течение 5 дней по 2 тестирования в день) каждый день – двумя разными лаборантами, в трёх образцах стула (с концентрацией > 50 мг/кг). Образцы экстрагировали перед каждым тестированием и разбавляли, согласно инструкции. По величинам оптических плотностей (ОП) этих измерений, были определены концентрации калпротектина. Для каждого образца рассчитали среднее значение (MV), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Результаты приведены в Таблице 5.

Таблица 5: Точность экстракции

	Калибратор			Стандартный график		
	MV (мк/кг)	SD(мк/кг)	CV %	MV (мк/кг)	SD (мк/кг)	CV %
Образец А	64.0	5.0	7.9	67.4	5.0	7.5
Образец Б	114.1	10.3	9.0	123.2	10.7	8.7
Образец С	264.0	33.3	12.6	284.8	22.1	7.8

14. Список литературы

Johne B et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol Mol Pathol 1997; 50: 113-123.

Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. Lancet 2000; 268: 353-363.

Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000; 119: 15-22.

Tibble J et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000; 47: 506-513.

Summerton CB et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 841: 841-845.

Striz I, Trebichavski I. Calprotectin – a pleiotropic molecular in acute and chronic inflammation. Physiol Res 2004; 53: 245-253.

Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohns disease. Gut 2005; 54: 364–368.

Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 450-455.

Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in IBD. Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6): 524-534.

Schopfer AM et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. Am J Gastroenterol 2010; 105: 162–169.

Van Rhenen PF et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. BMJ 2010; 341:c3369