ORGENTEC Diagnostika GmbH
Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58
Internet: www.orgentec.com

Návod k použití
2014-06

ORG 280 Calprotectin

KRÁTKÝ POPIS

Alegria® Calprotectin je testovací systém ELISA pro kvantitativní měření kalprotektinu ve vzorcích lidské stolice k použití při hodnocení zánětlivých střevních poruch. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLI

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
REF	Katalogové číslo
Σ 24	Dostačuje pro
LOT	Kód šarže
	Spotřebujte do
2°C 8°C	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem

ALEGRIA TEST STRIPS	Alegria® Testovací stripy
WASH	Promývací pufr
SYSTEM FLUID	Systémová kapalina
EXTRACT	Extrakce média
RTU	Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Kalprotektin obsažený ve vzorcích lidské stolice je třeba separovat ze stolice pomocí extrakčního média. Poté lze extrahovaný kalprotektin analyzovat pomocí analýzy Alegria ® Calprotectin.
Test Alegria® obsahuje mikrostripy s názvem Alegria® Test Strips. Mají 8 jamek a jsou označené čárovým kódem. Každý proužek je určen pro jedno stanovení z jednoho vzorku od pacienta. Alegria® Test Strip obsahuje kompletní sadu reagencií: enzymatický konjugát, enzymatický substrát, vzorek pufru a kontrolní vzorek specifický pro daný test. Na každém proužku jsou dále dvě jamky protilátková povrchová úprava, které slouží jako reakční jamky pro jeden kontrolní vzorek a jeden vzorek od pacienta.
Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: Kalprotektin přítomný v řídícím / zkoumaném vzorku se váže na plochu reakční kavity, což vytváří komplex protilátkového antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidaný enzymatický konjugát se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolýze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Intenzita modrého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 650 nm.
Princip testu Alegria® Test Strip vychází z patentované technologie SMC® (Sensotronic Memorized Calibration): údaje o testu, analýze a hodnocení a dále datum exspirace dané šarže jsou obsaženy v čárovém kódu vytištěném na každém proužku testu Alegria® Test Strip.
Alegria® Test Strip je možné použít s diagnostickým přístrojem Alegria® – plně automatickým analyzátorem s přímým přístupem (Random Access). Pomocí technologie SMC® jsou data zakódovaná v čárovém kódu přenesena z proužku Alegria® Test Strip do přístroje, který automaticky provede test a vyhodnotí jej. Přístroj odečte datum exspirace a je-li test Alegria® Test Strip prošlý, odmítne jeho další zpracování.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Interní řízení obsahuje materiál lidského původu. Protože žádný test nemůže zajistit absenci infekčních činitelů v lidském materiálů, doporučujeme manipulovat s testovacími proužky Alegria® jako s možným infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhněte se kontaktu se substrátem TMB (3,3´,5,5´-tetrametyl benzidin).
- Systémová kapalina obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok, extrakce média a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace, kontrola a vzorkový roztok obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchnete důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně oplachujte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Půjde-li to bez obtíží, sundejte kontaktní čočky. Dýchací cesty: přemístěte osobu na čerstvý vzduch. Požití: vypláchněte ústa a tekutinu vyplivněte. Ihned vypijte 1 - 2 sklenice vody. Při nenuceném zvracení umístěte hlavu postiženého směrem k zemi při poloze těla na břiše, abyste zabránili vniknutí zvratků do dýchací trubice.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze:

Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepije, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a politý materiál řádně zlikvidujte.

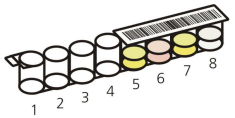
- Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové nebo z přirodního latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
- Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Proto skladujte proužky Alegria® na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.

Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami a/nebo sdruženými séry.

OBSAH SOUPRAVY

24 ORG 280 — Dostačuje pro 24

ALEGRIA TEST STRIPS



Alegria® testovací stripy: destička obsahující 12 modulů po 8 jamek.
Jamky 1 a 2: prázdné a bez činidla (jamky pro ředění vzorku)
Jamky 3 a 4: protilátková povrchová úprava (reakční jamky)
Jamky 5: **Kontrola**: žlutá; obsahuje Calprotectin, PBS, BSA, detergent; ochranný prostředek azid sodný 0.09% a ProClin 300 0.05%.
Jamky 6: **Enzymový konjugát**: světle červená; obsahující protilátky anti-Calprotectin, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek ProClin 300 0.05%.
Jamky 7: **Vzorkový pufr**: žlutá; obsahuje PBS, BSA, detergent; ochranný prostředek azid sodný 0.09% a ProClin 300 0.05%.
Jamky 8: **TMB substrátový roztok**: 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin.
Mikrojamky se povlečou protilátkami proti kalprotektinu.
Kód produktu na čárový kód: ***Calprotectin***

WASH	1x 20 ml	Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát
SYSTEM FLUID	1x 2.5 ml	Ředěná systémová kapalina; obsahuje kyselinu; 1000x koncentrát
EXTRACT	1x 20 ml	**Extrakční médium**; obsahuje TBS, stabilizační protein, extrakční reagencii, konzervant azid sodný 0,09%. Připraveno k použití.
	1	Alegria® Pokyny pro použití: Alegria® Mini-DVD
	1	Certifikát kontroly kvality

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- Vírový mixér, vibrační třepadlo, stolní odstředivka, volitelně: přesná měřidla
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 2500 ml

POMOCNÉ IVD REAGENCIE

- ORG 283 Calprotectin Stool Extraction Medium; obsahují 125 ml extrakčního tlumicího roztoku. Připraveno k použití. Složení je stejné jako extrakční médium v testovací sadě.

DALŠÍ PŘÍSLUŠENSTVÍ

- ORG 282 Stool Extraction Tubes; obsahuje 100 tub.
- SSCO Stool Sample Collector

Tyto doplňky se prodávají zvlášť.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte testovací proužky Alegria® hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené testovací je 15 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální dávku.
- Rozředěný mycí roztok a systémová kapalina jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Pro přemístění do nádoby s činidlem doporučujeme spotřebovat v tentýž den.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Testovací sada nemůže být po uplynutí data použití používána.
- Veškerý materiál musí být ponechán před použitím při pokojové teplotě (20-28 st C).
- Aby se zabránilo kontaminaci, vyměňujte špičky mikropipet mezi vzorky.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

Sběr vzorků stolice

Lze využít sběrač vzorku stolice "Stool Sample Collector" (SSCO)

- Vyhněte se kontaminaci se záchodovou vodou obsahující dezinfekci.

- Vzorky stolice neuchovávejte déle než 5 dní při 2-8 °C. Popřípadě skladujte při -20 °C.

Příprava vzorku stolice

Extrakce kalprotektinu pomocí trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Pro Alegria® Calprotectin analýzu je nutné vzorek stolice naředit **1:50** v poskytnutém extrakčním médiu.
Nehomogenní vzorky lze homogenizovat před odebíráním vzorku, například pomocí inokulační smyčky.
U tekutých vzorků stolice doporučujeme vzorek zvážit (viz metoda níže bez extrakční trubičky).

1 Příprava trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

Vzorek stolice a extrakční médium musí mít pokojovou teplotu.
Nalijte **750 µl** extrakčního média do průhledné trubičky (část 1) a uzavřete pomocí stěrky (část 2) modrým závitovým uzávěrem na trubičce.

2 Odebrání vzorku stolice

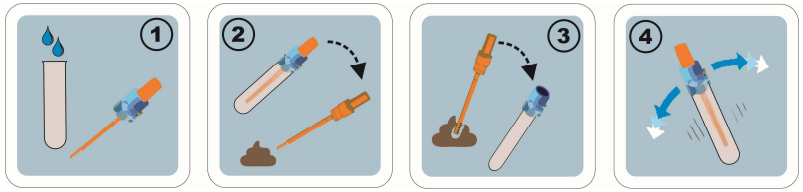
Otevřete trubičku a vytáhněte stěrku na oranžovém závitovém uzávěru.
Odeberte vorek stolice zasunutím stěrky do stolice. Drážky na stěrce je nutné plně pokrýt vzorkem stolice. Výsledkem je odebrání **15 mg** stolice.

3 Díl vzorku stolice

Zatlačte oranžovou dávkovací lopatku do modré kuželové vložky ve zkumavce. Nadbytek stolice se otře o kuželovou vložku. Výsledný roztok je **1:50**.

4 Extrakce

Viřte 30 s při 1800 ot./min. pro odstranění vzorku stolice z drážek stěrky. Homogenizujte po dobu 15 minut při nejvyšší rychlosti třepačky.



Otevřete trubičku na modré kuželové vložce a přemístěte homogenát do mikrotrubičky. Odstřeďujte 2 min. při 3000xg. Přemístěte čistou tekutinu do další trubičky a **ihned** otestujte na kalprotektin. Takový extrahovaný vzorek stolice lze skladovat při 2-8 °C až 5 dní nebo při -20 °C až 4 měsíce.

Eextrahovaný vzorek stolice není stabilní při pokojové teplotě!

Extrakce kalprotektinu bez trubičky "Stool Extraction Tube" (ORG 282)

- Vzorek stolice a extrakční médium musí mít pokojovou teplotu.
- Zvažte prázdnou trubičku. Odeberte vzorek stolice a přemístěte jej do trubičky. Zvažte jej a zjistěte čistou hmotnost vzorku.
- Nalijte extrakční médium "Calprotectin Stool Extraction Medium" (ORG 283) do trubičky: 49násobkem čisté hmotnosti vzorku získáte roztok **1:50** dilution

vzorek stolice	+	extrakční médium	vzorek stolice	+	extrakční médium
15 mg	+	0.75 ml	60 mg	+	2.9 ml
20 mg	+	1.0 ml	70 mg	+	3.4 ml
30 mg	+	1.5 ml	80 mg	+	3.9 ml
40 mg	+	2.0 ml	90 mg	+	4.4 ml
50 mg	+	2.5 ml	100 mg	+	4.9 ml

Uzavřete trubičku. Viřte 30 s při 1800 ot./min. Homogenizujte po dobu 15 minut při nejvyšší rychlosti třepačky. Otevřete trubičku. Přemístěte homogenát do mikrotrubičky. Odstřeďujte 2 min. při 3000xg. Přemístěte čistou tekutinu do další trubičky a **ihned** otestujte na kalprotektin.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

WASH

Nařeďte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l). Promývací roztok se poté přeleje do výhradně k tomu určené nádoby. Pokud je třeba provést pouze jeden cyklus Alegria v jednom dni, doporučujeme transfer pouze 500 ml zředěného Promývacího pufru.

SYSTEM FLUID

Nařeďte obsah Ředěné systémové kapaliny koncentrátu (1000x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 2500ml před použitím. Systémová kapalina se následně přelije do připravené nádoby.

ALEGRIA TEST STRIPS

Vyjměte požadovaný počet testovacích proužků Alegria® ze zásobníku a nechejte je ohřát na pokojovou teplotu (20 -28°C). Nesundávejte fóliový obal prázdných jamek, dokud nebudete připraveni začít analýzu.

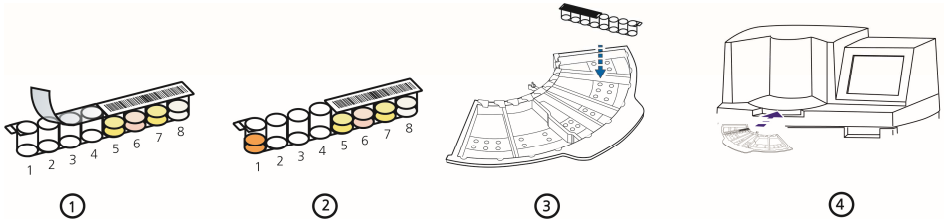
EXTRACT

Připraven k použití

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Testovací proužky Alegria® s technologií SMC® se používaní s diagnostickým zařízením Alegria®.
Podrobné informace o obsluze nástroje naleznete v návodu k obsluze pro zařízení.

(1) Sejmout fólii, která pokrývá prázdné jamky 1 až 4 z potřebného testovacího proužku
Fólie otištěná čárkovým kódem, jenž pokrývá kavitu 5 až 8, není k sejmutí.
(2) Na dno kavity 1 napipetovat jamky 10 µl nezředěného vzorku pacienta.
(3) Vložte proužek do SysTray.
(4) Umístěte obsazený SysTrays do správné polohy v nástroji Alegria® a spusťte test. Všechny další kroky se provedou automaticky. Testovací chod je dokončen, když nástroj začne tisknout výsledky.



KALIBRACE

Testovací systém je kalibrován pomocí referenčního přípravku kalprotektinu purifikovaného z lidských neutrofilů.

VÝPOČET VÝSLEDKU

Pomocí technologie SMC® (Senzotronicky zapamatovaná kalibrace) se všechna data převádí do systému pomocí individuálních čárových kódů na testovacím proužku Alegria®. Vyhodnocení a interpretace výsledků probíhá plně automaticky.

PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy Alegria® je 0 - 1000 µg/g

Předpokládané hodnoty

V běžném rozsahu studie vzorků dárců zdravé byly stanoveny následující rozsahy pomocí analýzy: hranice hodnoty 50 µg/g

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Normální rozsah	< 50 µg/g
Mírně zvýšené hodnoty	50 - 200 µg/g
Značně zvýšené hodnoty	> 200 µg/g

Úroveň kalprotektinu v normálním rozsahu: Gastrostřevní zánět téměř vyloučen; následná opatření invazivní diagnostiky nejsou obecně vyžadovány.

Úroveň kalprotektinu mírně zvýšena: Nízká úroveň zánětlivé aktivity gastrostřevním traktu (například zmírněné IBD); opakovaný test a další diagnostická opatření jsou doporučena.

Úroveň kalprotektinu značně zvýšena: aktivní organické onemocnění gastrostřevního traktu; doporučeny jsou okamžité intenzívní diagnostické testy a léčba specializovaným gastroenterologem.

Linearita

Tři vzorky pacientů obsahující vysokou úroveň určité kalprotektinu byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázku dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána pomocí SMC® technologie.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná	Očekávaná	P/O
		[µg/g]	[µg/g]	[%]
1	1:100	746.8	746.8	100
.	1:200	366.7	373.4	98
.	1:400	186.7	186.7	100
.	1:800	89.5	93.4	96
2	1:100	625.5	626.5	100
.	1:200	325.0	313.3	104
.	1:400	151.1	156.6	97
.	1:800	65.2	78.3	83
3	1:100	112.9	112.9	100
.	1:200	59.5	56.5	105
.	1:400	26.5	28.2	94
.	1:800	14.6	14.1	103

Limit detekce

Nejnižší zjistitelná koncentrace: 5.2 µg/g

Reprodukovatelnost

Intraanalyzační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezů v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.
Interanalyzační přesnost: Koeficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 nálezů při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay		
Vzorek	Průměr	% CV
	[µg/g]	[%]
1	49.5	5.5
2	218.2	6.1
3	847.9	9.9

Inter-Assay		
Vzorek	Průměr	% CV
	[µg/g]	[%]
1	47.8	8.7
2	107.1	6.5
3	335.8	7.1

Interference

netestováno

Výsledky studie

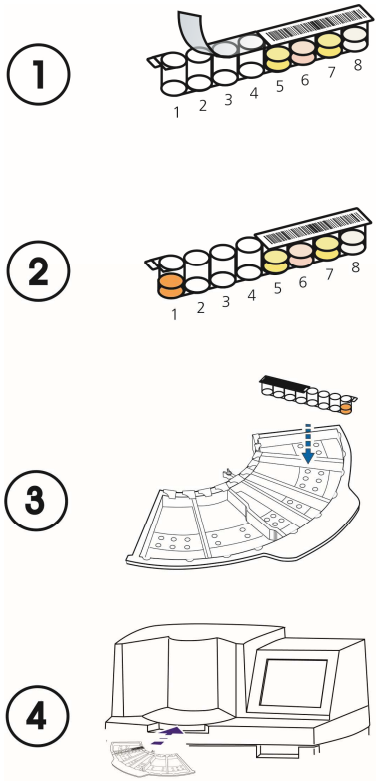
Study population	n	n pos	%
Inflammatory bowel disease	186	182	97.8
abdominal disorders	144	10	6.9
healthy donors	18	0	0.0

		Klinická diagnóza		
		Značně	Normální	
ORG 280	Značně	182	10	
	Normální	4	152	
		186	162	348

sensitivität	97.8	%
specificita	93.8	%
diagnostická efektivita	96.0	%

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka.Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být lékař po všech klinických a laboratorních nálezů byly hodnoceny o celé klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.
Výše uvedené referenční rozsahy patologických a normálních hodnot jsou uvedeny pouze jako doporučení. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí podle normy ISO 15189 nebo jiné použitelné laboratory pokyny.
Nesteroidní antiflogistika (NSAID) způsobují enteropatii až u 20-65 % pacientů, kteří jsou jimi léčeni. NSAID mohou způsobit zvýšenou koncentraci kalprotektinu ve stolici. V takových případech je nutno zvážit opakované vyšetření kalprotektinu ve stolici po ukončení léčby NSAID.

REFERENCE

1. Burri; Beglinger: “Faecal calprotectin – a useful tool in the management of inflammatory bowel disease”. Swiss Med Wkly. 2012; 142: w13557
2. Van Rheenen et al.: “Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis”. BMJ. 2010; 341: c3369
3. Johne; Fagerhol et al.: “Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin”. J Clin Pathol: Mol Pathol. 1997; 50: 113-123
4. Berni et al.: “Faecal calprotectin is a useful diagnostic tool in pediatric gastroenterology”. Ital J Pediatr. 2005; 31: 89-94
5. Canani et al.: "Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice“. Digestive and Liver Disease. 2004; 36: 467-470
6. Costa et al.: “Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation”. Digestive and Liver Disease. 2003; 35: 642-647
7. Chapaiboon et al.: "Calprotectin S100A9 calcium binding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion“. The Journal of biological Chemistry. 2009; Vol 284; No 11: 7078-7090
8. Costa et al.: “Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn´s disease”. Gut. 2005; 54: 364-368
9. Fagerberg et al.: "Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay“. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2003; 37: 468-472
10. Montalto et al.: “Fecal calprotectin in first-degree relatives of patients with ulcerative colitis“. Am J Gastroenterol. 2006; 101: 1-5
11. Roseth et al.: "Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease“. Scand J Gastroenterol. 2004; 39: 1017-1020
12. Whitehead et al.: "Between-assay variability of faecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits”. Annals of Clinical Biochemistry. 2013; 50: 53-61
13. NICE Diagnostics guidance 11, Oct. 2013, Faecal calprotectin diagnostic tests for inflammatory diseases of the bowel.
14. Layer et al.: "S3-Leitlinie Reizdarmsyndrom: Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Gemeinsame Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM)". Z. Gastroenterol. 2011; 49:237 -293
15. Carroccio et al.:"Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children." Clin. Chem. 2003; 49:6: 861-867.
16. Montalto et al.: “Role of fecal calprotectin in gastrointestinal disorder“. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013; 17: 1569-1582
17. Tibble et al.: “High prevalence of NSAID enteropathy as shown by simple faecal test”. Gut. 1999; 45: 362-366