

Набор для количественного определения кальпротектина в образцах человеческого кала с использованием экспресс-анализатора BÜHLMANN Quantum Blue®.

Кат. номер: LF-CALE25

Версия: 2015-02-03

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского оригинала. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

Назначение

Данный иммунный метод BÜHLMANN Quantum Blue® предназначен для количественного определения кальпротектина в образцах человеческого кала (1-6), с использованием экспресс-анализатора BÜHLMANN Quantum Blue®. Только для лабораторных исследований.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод разработан для специфического измерения кальпротектина «сэндвич» иммунным методом. Высокоспецифичные моноклональные «захватывающие» антитела (mAb) к кальпротектину сорбированы на тестовой мембране. Вторые моноклональные «выявляющие» антитела, конъюгированные с коллоидным золотом, депонированы в специальной области (область конъюгата), откуда они высвобождаются в реакционную систему после внесения разведенного экстракта образца кала. Кальпротектин/анти-кальпротектин конъюгат с золотом связывается с антителами к кальпротектину, сорбированными на тестовой мембране (тестовая линия, тестовый бэнд) и оставшиеся свободные антитела к кальпротектину, конъюгированные с золотом, связываются с козьими антителами к антителам мыши, сорбированными на тестовой мембране (контрольная полоса, контрольный бэнд). Интенсивность окрашивания тестовой и контрольной линий количественно измеряется с помощью BÜHLMANN экспресс-анализатора Quantum Blue®.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Реагенты	Количество	Кат. №	Комментарии
Тестовый картридж, в запечатанном под вакуумом пакете	25 шт.	B-LFCALUS-TC	Упакованы под вакуумом
Extraction Buffer	1 флакон, 125 мл	B-CAL-EX	Готов к использованию
RFID Chip Card	1 шт	B-CALE-RCC	Белая
RFID Chip Card	1 шт	B-CALE-RCC720	Зеленая

Таблица 1

Реагенты	Количество	Кат. №
Smart-Prep	50 пробирок	B-CAL-RD
Schebo	50 пробирок	B-CAL-SO50
Quick-Prep	1,3 мл, готов для использования	

Таблица 2

Таблица 3

Реагенты	Количество	Кат. №	Комментарии
Контроли низкий/высокий*	2 флакона	B-CAL-CONSET	Готов к использованию
	0,5 мл		

* концентрация зависит от лота

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

все компоненты набора стабильны при хранении при 2-8°C до истечения срока годности, указанного на этикетках

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Материалы человеческого происхождения: ни один реагент, входящий в состав данного набора, не содержит материалов человеческого происхождения.

С образцами кала пациентов необходимо обращаться как с потенциально биологически опасным материалом, соблюдая соответствующие меры предосторожности.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

- Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (18-28°C) перед началом тестирования. Экспресс-анализатор Quantum Blue® должен быть включен и запрограммирован на выполнение теста Кальпротектин перед началом тестирования (см. инструкцию к экспресс-анализатору Quantum Blue®)
- Для получения достоверных количественных результатов важно полностью гомогенизировать образцы кала в устройстве для экстракции. Не допускайте загрязнения калом верхней части пробирки.
- Для получения достоверных количественных результатов важно центрифугировать гомогенизированные экстракты. Центрифугировать можно и до, и после разведения экстракта.
- Разведенный образец должен быть протестирован в течение нескольких часов и не может храниться более долгий период.
- Очень важно центрифугировать экстракты перед хранением (5 мин при 3 000 x g). После центрифугирования супернатант необходимо перенести в новую чистую пробирку.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Вортекс, для экстракции образцов кала
- Калиброванные пипетки и одноразовые наконечники, объемом 10-200 мкл и 1 мл
- Центрифуга для пробирок типа эппендорф.
- Пробирки типа эппендорф, для разведения экстрактов образцов (1:10)
- Таймер (опционально)
- Экспресс-анализатор Quantum Blue®, доступен по заказу (кат. № BI-POCTR)
- Одноразовые лабораторные перчатки и лабораторная одежда
- Мягкая ткань или фильтровальная бумага

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для выполнения экстракции с помощью устройства для экстракции, требуется не более 1 г исходного образца кала.

Соберите образец кала в чистую пробирку, образец может храниться охлажденным при 2-8°C в течение 6 дней.

Экстракты стабильны в течение 7 дней при 2-8°C и 24 месяца при ≤-20°C.

Важно: Образец должен быть собран без добавления какого-либо химического или биологического вещества в пробирку для сбора образца.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Процедура метода состоит из трех этапов:

1. Экстракция образцов кала

Процедура экстракции описана в инструкции к устройству для экстракции.

2. Приготовление образцов

После экстракции отцентрифугируйте образцы в течение 5 минут при 3000g. Разведите полученные экстракты непосредственно перед анализом 1:10 с помощью буфера для экстракции (например, 50 мкл образца + 450 мкл буфера) и тщательно перемешайте. Дайте образцам постоять в течение 5 минут при 18-28°C.

3. Выполнение метода латеральной иммунохроматографии / считывание.

Для экспресс-анализатора Quantum Blue® существует 2 различных метода: <B-CALE-RCC> и <B-CALE-RCC720>. Выберите один из них перед началом анализа. Загрузите лот специфические параметры с чип-карты.

1. Метод <B-CALE-RCC720> со встроенным таймером.

- Загрузите тест-кассету в держатель анализатора
- Внесите 60 мкл разведенного образца кала в специальное отверстие для образца в тест-кассете.
- Закройте держатель с тест-кассетой и нажмите кнопку Старт.
- Сканирование начнется автоматически через 12 минут (720 секунд).

2. Метод <B-CALE-RCC> без таймера.

- Внесите 60 мкл разведенного образца кала в специальное отверстие для образца в тест-кассете.
- Инкубируйте 12± 1 минут.
- Закройте держатель с тест-кассетой
- Нажмите кнопку Старт.

Замечание: за более подробной информацией об основных функциях экспресс-анализатора Quantum Blue®, как выбирать методы и загружать лот специфические параметры обратитесь к инструкции.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Тестирование неправильно собранных или неправильно подготовленных образцов может привести к недостоверным результатам.
- Если воспроизводимость метода не коррелирует с установленными пределами и при повторном анализе исключены ошибки в выполнении процедуры метода, проверьте следующие параметры
- i) контроль температуры пипетирования и таймера
- ii) срок годности реагентов
- iii) условия хранения и инкубации.

ВАЛИДАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

• Если результаты теста достоверны, то контрольная линия (C) должна быть видна в любом случае (см. рис. 1A и 1B). Она используется только как функциональный контроль теста и не может быть использована для интерпретации тестовой линии (T). Если тестовая линия (T) не появляется через 12 минут периода инкубации (рис. 1A), то концентрация кальпротектина, присутствующего в образце, ниже предела чувствительности метода. Если тестовая линия (T) появляется через 12 минут периода инкубации (рис. 1B), то уровень кальпротектина,

BÜHLMANN Calprotectin

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва

E-mail: elisa@biochemmack.ru

присутствующего в образце, может быть количественно рассчитан с помощью экспресс-анализатора Quantum Blue®.

• Если появляется только тестовая полоса (T) появляется через 12 минут периода инкубации (рис. 1C), результат тестирования недостоверен и анализ должен быть повторен, с использованием другого тест-картриджа.

• Если ни одной полосы, ни контрольной (C), ни тестовой (T), не появляется через 12 минут инкубации (рис. 1D), результат тестирования недостоверен и анализ должен быть повторен, с использованием другого тест-картриджа.

• Так как экспресс-анализатор Quantum Blue® позволяет выполнять количественное определение тестовой (T) и контрольной (C) линий, в анализ включена дополнительная контрольная проверка контрольной линии (C). Если интенсивность сигнала контрольной линии (C) через 12 минут инкубации ниже лот-специфического значения, результат тестирования недостоверен и анализ должен быть повторен, с использованием другого тест-картриджа.

•

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

• Данный метод латеральной иммунохроматографии прокалиброван по методу BÜHLMANN Calprotectin ELISA (кат. № EK-CAL).

• Экспресс-анализатор BÜHLMANN Quantum Blue® использует лот-специфическую калибровочную кривую для расчета концентрации кальпротектина. Данный метод определяет концентрацию кальпротектина в диапазоне от 30 до 1000 мкг/г.

• Для выполнения количественных измерений в образце с концентрацией выше 1000 мкг/г, такой образец необходимо исследовать повторно с помощью метода *Quantum Blue® Calprotectin High Range assay* (экспресс-анализ кальпротектина в высоком диапазоне концентраций).

ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагенты, поставляемые с данным набором, разработаны и оптимизированы только для определения кальпротектина в экстрагированных образцах человеческого кала.

Данные по значениям кальпротектина в кале должны использоваться врачом как дополнительные для постановки диагноза.

Результаты, полученные методом *Quantum Blue® Calprotectin High Range assay* необходимо подтверждать тестом на другие маркеры (например, С-реактивный белок) или повторным анализом на кальпротектин (ИФА-методом (ЕК-CAL) или используя второй картридж) и сравнивать с результатами CDAI перед проведением каких-либо клинических и/или терапевтических процедур.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Оценка фекального кальпротектина является достоверным и простым методом дифференциальной диагностики органических и функциональных патологий ЖКТ.

С помощью метода BÜHLMANN Calprotectin ELISA (кат. № EK-CAL) были получены следующие данные. В клиническом исследовании были протестированы образцы кала 401 пациента, с соответствующими симптомами, направленных на колоноскопию (таблица 16). Эндоскопические исследования показали функциональные патологии у 273 пациентов, тогда как у 128 пациентов были выявлены различные органические заболевания (колит, болезнь Крона, язва, дивертикулит, полипы, аденомы, рак или инфекционные заболевания

Анализ ROC кривых (AUC 0.935) был выполнен при значении cut-off 50 мкг/г. При использовании этого уровня cut-off для дифференциальной диагностики органических и функциональных нарушений, клиническая чувствительность и специфичность составили 84,4% и 94,5%, соответственно. Предлагаемый уровень cut-off (<50 мкг/г) для взрослых может быть использован и для детей в возрасте от 4 до 17 лет, вне зависимости от пола (6). Несмотря на то, что уровни фекального кальпротектина у взрослых и детей сравнимы, концентрация у новорожденных может быть значительно повышена (5).

Образцы с нормальным значением ниже 50 мкг/г:

Значения кальпротектина <50 мкг/г говорят об отсутствии воспалений желудочно-кишечного тракта. Пациентов с низкими значениями кальпротектина не нуждаются в дальнейших инвазивных процедурах.

Значения в пределе между 50 и 200 мкг/г:

Значения кальпротектина в диапазоне 50 – 200 мкг/г может говорить об органическом заболевании, вызванном NSAIDs, дивертикулитом и IBD в фазе ремиссии. В этом случае рекомендуется провести повторные исследования.

Значения выше 200 мкг/г:

Значения кальпротектина выше 200 мкг/г свидетельствует об активно – развивающемся органическом заболевании с воспалением ЖКТ. Необходимо проводить дальнейшие исследования и лекарственное лечение, назначаемые специалистом.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Предел определения бланка (Limit of Blank (LoB)): <20 мкг/г кальпротектина.

Предел определения/чувствительность (LoD): <30 мкг/г кальпротектина.

Функциональная чувствительность; Диапазоны количественного определения (LoQ): Нижний предел количественного определения LoQ: ≤30 мкг/г кальпротектина; верхний предел количественного определения LoQ: ≥1000 мкг/г кальпротектина. 14 различных образцов были протестированы согласно процедуре метода. %CV и средние значения были рассчитаны для каждого образца. Предел количественного определения соответствует измерению концентрации кальпротектина с воспроизводимостью хуже 25% CV. Полученная кривая воспроизводимости подтверждает точные измерения в диапазоне от 30 до 1000 мкг/г.

Воспроизводимость: 20,1% CV. Воспроизводимость внутри серии метода Quantum Blue® Calprotectin рассчитана по результатам тестирования аликвот 8 экстрактов образцов кала. Значения для 3 различных лотов представлены в таблице 19. Воспроизводимость лежала в диапазоне 17,9 – 23,9% CV.

Воспроизводимость внутри лота: 20,8% Воспроизводимость внутри лота метода Quantum Blue® Calprotectin рассчитана по результатам тестирования аликвот 8 экстрактов образцов кала, с концентрацией кальпротектина в пределах от 30 до 1000 мкг/г кальпротектина. Воспроизводимость лежала в диапазоне 16,1 – 24,1% CV.

Линейность разведения: Данный метод Quantum Blue® Calprotectin линейен в диапазоне от 30 до 1000 мкг/г.

Извлечение: 90,6 – 101,8%.

Сравнение методов: R²=0.94. y = 1.05x – 3.91 мкг/г Образцы, взятые у 101 пациента, с концентрациями кальпротектина в диапазоне измеряемых концентраций, были протестированы данным методом Quantum Blue® Calprotectin assay и результаты сравнены с результатами, полученными методом BÜHLMANN Calprotectin ELISA (кат. № EK-CAL). Линейная регрессия приведена на рис. 3.