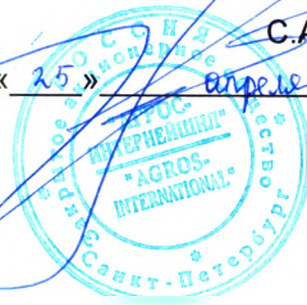


«Утверждаю»
Генеральный директор
ЗАО «АГРОС-ИНТЕРНЕЙШНЛ»

С.А. Коновалов
« 25 » апреля 2012 г.



**Инструкция по применению
изделия медицинского назначения**

Набор реагентов «тест ИФА CalproLab™ на Кальпротектин / Calprolab™ Calprotectin ELISA (ALP)» с принадлежностями для in vitro количественного определения кальпротектина в кале человека производства CALPRO AS (КАЛЬПРО АС), Норвегия

Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.gosdrazhnadzor.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для количественного определения кальпротектина в образцах кала и может использоваться как дополнительный метод при определении функциональных заболеваний тонкого кишечника, толстого кишечника или желудка, а также для определения интенсивности заболевания и мониторинга реакции на лечение больных с неспецифическим язвенным колитом или болезнью Крона.

Кальпротектин может определяться также в других жидкостях организма, секретах и экскретах, например, в сыворотке, плазме или моче. Концентрации и показатели кальпротектина варьируются и должны определяться в соответствии с опубликованными методами.

Набор предназначен для *in vitro* диагностики.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Различные виды функциональных заболеваний ЖКТ могут повредить эпителиальный слой кишечника (слизистую оболочку). Повреждения могут варьироваться от повышенной проницаемости слизистой до воспаления и язв. Бактерии и микроорганизмы, находящиеся в содержимом кишечника в большом количестве, попав в пищеварительный тракт по средствам стимулирования полиморфноядерных нейтрофильных гранулоцитов, выделяют различные вещества. Одним из таких веществ является Кальпротектин. Этот белок составляет около 60% общего числа белков цитоплазмы ПНГ и можно с уверенностью сказать, что он сохраняется в образцах кала до 7 дней при комнатной температуре.

Кальпротектин – это кальций- и цинк-связывающий белок с молекулярной массой 36 кДа, продуцируемый ПНГ, моноцитами и плоскими клетками эпителия, кроме клеток кожи. После связывания с кальцием он становится устойчивым к расщеплению лейкоцитарными и микробными ферментами. Конкурируя с различными ферментами за ограниченное количество цинка, Кальпротектин способен ингибировать многие цинко-зависимые ферменты и, таким образом, убивать микроорганизмы или клетки человека или животного в культуре. Различные виды заболеваний, например, бактериальные инфекции, ревматоидный артрит и рак приводят к активации ПНГ и повышению уровня Кальпротектина в плазме, спинномозговой жидкости, синовиальной жидкости, моче и других биологических жидкостях.

Особенно важно, что концентрация Кальпротектина в кале коррелирует с количеством ПНГ, поступающих в пищеварительный тракт, и что он, совершенно

точно, может быть обнаружен даже в небольших (<1 грамма) произвольных образцах кала. Более того, функциональные заболевания кишечника дают резкий скачок показателя Кальпротектина, т.е. повышение уровня от 5 до нескольких тысяч раз по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует о воспалении кишечника.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), например, неспецифический язвенный колит и болезнь Крона, могут появиться как в раннем детстве, так и в зрелом возрасте, а диагностика часто откладывается из-за неопределенных симптомов или нежелания делать эндоскопию или биопсию. CALPROLAB™ Кальпротектин ИФА (ALP) может способствовать ранней диагностике ВЗК, когда результаты теста положительны при ВЗК в стадии обострения.

Функциональные заболевания, такие как синдром раздраженного кишечника (СРК), не дают повышенной концентрации кальпротектина, но органические абдоминальные нарушения, такие как ВЗК, дают. У пациентов с органическими или функциональными заболеваниями органов брюшной полости могут быть похожие симптомы, и одного клинического обследования может быть недостаточно для постановки точного диагноза. Дальнейшая диагностика может быть сложной, дорогостоящей, болезненной для пациента и несет с собой другие риски. Тест на кальпротектин в кале - простой, неинвазивный, недорогой и объективный метод, способный помочь отобрать пациентов, нуждающихся в дополнительном обследовании, например, эндоскопии. Так как абдоминальные симптомы очень часто встречаются как у взрослых, так и у детей, отрицательный результат теста CALPROLAB™ Кальпротектин ИФА (ALP) может с большой вероятностью исключить невоспалительные заболевания кишечника и позволит многим избежать эндоскопии.

Концентрация Кальпротектина в кале – это неинвазивный и объективный маркер; он может использоваться для определения интенсивности заболевания и реакции организма на лечение ВЗК, а также помочь выяснить, действительно ли пациент находится в состоянии ремиссии. Многие больные ВЗК, будучи в состоянии клинической ремиссии, имея нормальные клинические показатели и нормальное содержание С-реактивного белка, имеют повышенный уровень кальпротектина в кале, что связано со слабым воспалением и свидетельствует о повышенной вероятности клинического рецидива. Также это воспаление часто вызывает стриктуру кишечника, а это может потребовать повторные резекции.

Восстановление слизистой - это оптимальный результат лечения ВЗК, и по показателям Кальпротектина можно понять, достигнут ли этот результат. Если достигнуто восстановление слизистой, то риск рецидива снижен и исчезает необходимость в абдоминальной хирургии. Нормализация уровня Кальпротектина означает, что достигнуто восстановление слизистой. Необходимо сопоставить риск

побочных эффектов лечения и риск продолжения воспаления, тяжелого клинического рецидива и осложнений.

Важность достижения восстановления слизистой была подчеркнута во многих научных обзорах и статьях.

Технология ИФА на Кальпротектин была использована для исследования образцов сыворотки и плазмы, и высокий показатель уровня Кальпротектина был выявлен у пациентов с бактериальными инфекциями и такими воспалениями, как ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ). Научные работы подтверждают, что Кальпротектин в сыворотке/плазме – это лучший маркер интенсивности заболевания при РА и СКВ, который может прогнозировать внезапное обострение. Это также хороший маркер острых коронарных артериальных приступов, приводящих к инфарктам миокарда.

2.1 СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов «тест ИФА CalproLab™ на Кальпротектин / Calprolab™ Calprotectin ELISA (ALP)» с принадлежностями для *in vitro* количественного определения кальпротектина в кале человека

Принадлежности:

Приспособления для экстракции/ Extraction devices:

- пробирки для экстракции со стальной спиралью и верхней крышкой, не более 50 шт./ 50 extraction tubes with spiral coil and top cap
- крышки нижние с мензуркой для образца и отрывной ручкой, не более 50 шт./ 50 bottom caps with sample beaker and break-off handle
- лопаточки, не более 50 шт./ 50 spatulas

Реагенты, поставляемые с набором

- **MTP** Микротитровальный планшет с покрытием: 12 полосок, 8 лунок на полоску, покрытые моноклональными антителами мыши, специфичными для Кальпротектина. Планшет хранится в запечатанной упаковке с влагопоглотителем.
- **DIL|5x** Буфер для разбавления образца (5x конц.)***: 1 x 20 мл, 5x концентрат, разбавляется дистиллированной/деионизированной водой; pH 8.0 ± 0.2, раствор желтого цвета, пузырек с голубой крышкой.
- **WASH|BUF|20x** Промывающий раствор (20x конц.): 1 x 50 мл, 20x концентрат, разбавляется дистиллированной/деионизированной водой, для промывки лунок микротитровального планшета; pH 8.0 ± 0.2, прозрачный раствор, бутылки с белыми крышками.

FEC|EXTR|BUF|2,5x Буфер для экстракции кала (2.5x конц.) **: 2 x 90 мл, 2.5x концентрат, разбавляется дистиллированной/деионизированной водой; pH 8.0 ± 0.2, прозрачный раствор, пузырьки с белой крышкой.

CAL|A-F Калибраторы Кальпротектина***: 6 пузырьков по 1,0 мл, готовых к употреблению; раствор желтого цвета, пузырьки с красной крышкой:

Калибратор А: 0 нг/мл

Калибратор В: 7,8 нг/мл

Калибратор С: 31,3 нг/мл

Калибратор D: 62,5 нг/мл

Калибратор E: 125 нг/мл

Калибратор F: 500 нг/мл

CTR|LOW CTR|HIGH Контроли Кальпротектина «Высокий» и «Низкий»***: 1,0 мл, готовый к употреблению; раствор желтого цвета, пузырьки с зеленой крышкой.

CONJ Ферментный конъюгат ****: 13 мл, поликлональные антитела кролика к Кальпротектину, очищенные иммуноаффинным методом и меченые щелочной фосфатазой, готовый к употреблению; раствор красного цвета, темный пузырек с черной крышкой.

SUB|pNPP Раствор ферментного субстрата (pNPP): 13 мл, готовый к употреблению; раствор от прозрачного до светло-желтого, темный пузырек с желтой крышкой.

* Содержит 0.1 % Катона

** Содержит <0.1% азид натрия

*** Содержит 0.1 % Катона и <0.1% азид натрия

**** Содержит 0.02% метилизотиазолон и 0.02% бромонитродиоксана

2.2 ПРИНЦИП МЕТОДА

ALPROLAB™ Кальпротектин ИФА (ALP) основан на приготовлении экстракта кала, с использованием запатентованного нами буфера для экстракции кала и удобного приспособления для экстракции. Уровень Кальпротектина определяется эстированием экстракта методом ИФА, специального для Кальпротектина.

При методе ИФА образцы и калибраторы инкубируются в отдельных лунках на микротитровальном планшете, покрытых поликлональными антителами, которые связывают Кальпротектин. После инкубации и промывания лунок связанный кальпротектин может вступать в реакцию с антителами к Кальпротектину, очищенными иммуноаффинным методом и мечеными ферментом. После реакции количество связанного фермента в лунках пропорционально количеству

Кальпротектина в образце или калибраторе, которое определяется инкубацией с субстратом для фермента, в результате чего продукт окрашивается. Интенсивность цвета определяется с помощью измерения оптической плотности на ИФА-анализаторе, и пропорциональна концентрации Кальпротектина в калибраторах и образцах. Исследование калибруется с помощью Кальпротектина, очищенного от экстракта лейкоцита.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Замечание: Все проверяющие исследования выполнялись на образцах экстрактов кала (разбавленных 1:100) или образцах ЭДТА плазмы (разбавленных (1:20)), используя процедуру ИФА, описанную в пункте 7.

Межаналитическая точность, экстракты кала

Средние результаты из трех различных лабораторий, каждое из которых тестировало две различные партии наборов: шесть образцов тестировались всего 10 раз в течение 5 дней:

Концентрация (нг/мл)	Концентрация (мг/кг)	Кoeff. вариации, %
6,4	32,1	13,0
34,1	171,0	6,0
73,7	368,0	4,8
117,0	583,0	6,1
243,0	1215,0	6,8
395,0	1977,0	7,9

Внутрианалитическая точность, экстракты кала

Средние результаты из трех различных лабораторий, каждое из которых тестировало две различные партии наборов: шесть образцов тестировались 10 раз одновременно:

Концентрация (нг/мл)	Концентрация (мг/кг)	Кoeff. вариации, %
5,7	28,7	6,7
34,5	173,0	3,6
77,1	385,0	4,1
118,0	592,0	4,0
242,0	1210,0	4,2
393,0	1966	5,0

Внутрианалитическая точность, ЭДТА плазма

Тестировалась одна партия набора; шесть образцов разбавлялись в пропорции 1:20 и тестировались 10 раз одновременно:

Концентрация (нг/мл)	Концентрация (×20)	Кoeff. вариации, %
8,3	166,0	3,8
37,0	740,0	4,7
58,0	1160,0	2,9
68,0	1360,0	3,5
149,0	2980,0	3,2
183,0	3660,0	10,0

Восстановление (*Recovery*. Измеряются образцы с заведомо известной концентрацией – образцы с калибраторами - и сравниваются ожидаемые и полученные результаты)

Кал: 85-105%; тестировалось с экстрактом кала, меченым очищенным кальпротектином на пяти различных уровнях.

Плазма: 81-105%; тестировалось с плазмой, меченой очищенным кальпротектином на пяти различных уровнях.

Нижняя граница определяемых концентраций

5 нг/мл; тестировалось с экстрактом кала, плазмой и очищенным кальпротектином. Образцы анализировались пять раз в течение пяти дней. Среднее значение коэффициента вариации для различных образцов и определений на данном уровне было 12%.

Предел определения

< 5 нг/мл; рассчитано как среднее значение (буфер для разбавления образца; n=32) + 5δ.

Согласование с тестом Кальпротектин ИФА «Кальпро» CAL0100

Достаточные корреляция и согласованность между образцами, анализируемыми на CAL0100 и CAL0170:

Экстракты кала: $R^2 = 0.792$ (48 – 1250 мг/кг, n=118)

$R^2 = 0.864$ (48 – 500 мг/кг, n=85)

Плазма: $R^2 = 0.977$ (260 – 6400 мкг/л, n=16)

Взаимодействие с веществами

Для распространенных фармацевтических препаратов, таких как преднизолон, азатиоприн, салазопирин и ципрофлоксацин, взаимодействия не отмечено.

Точность экстракции

Два образца кала экстрагировались 10 раз каждый, используя процедуру, описанную в пункте 7, и экстракты анализировались методом ИФА. Средние результаты из трех различных лабораторий и одной партии набора:

Образец	Концентрация (мг/кг)	Коэфф. вариации, %
Низкий	130,0	8,7
Высокий	1357,0	8,8

Линейность, экстракты кала

Экстракты кала (n=10) были разбавлены в пропорциях 1:100 – 1:1000 и проанализированы методом ИФА. Средние результаты:

Разбавление	% разбавления 1:100
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Заметьте, что наблюдается линейность в изменении образца.

Линейность, ЭДТА плазма

Образцы плазмы (n=5) были разбавлены в пропорциях 1:20 – 1:80 и проанализированы методом ИФА. Средние результаты:

Разбавление	% разбавления 1:100
1:20	100
1:40	107
1:80	116

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Неоднократная заморозка-разморозка образцов может повлиять на точность результатов анализа.
- Диагноз не должен основываться только на одном результате анализа. При диагностике необходимо учитывать историю болезни и симптомы.
- Процедура тестирования, информация, меры предосторожности, указанные в

инструкциях по эксплуатации, должны строго соблюдаться. Запрещается производить любые изменения в дизайне, составе и процедуре тестирования, а также использовать совместно с другими продуктами, без согласия производителя; пользователь несет ответственность за данные изменения. Производитель не несет ответственности за ошибочные результаты и проблемы, связанные с данными причинами. Производитель не несет ответственности за любые результаты, полученные с помощью визуального анализа образцов пациента.

- Только для *in vitro* использования.
- Все компоненты человеческого происхождения, использованные для производства данных реагентов, исследованы на предмет содержания в них антител к ВИЧ, к гепатиту С и антигена гепатита В (Вag) и были признаны нечувствительными. Тем не менее, следует обращаться со всеми материалами как с потенциально инфекционными.
- Не смешивайте реагенты или полоски разных партий продуктов.
- Не используйте реагенты других производителей с реагентами данного набора тестов.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке, или после 1 месяца приготовления рабочих растворов из концентрированных реагентов.
- Используйте только чистые микродозаторы, диспенсеры и лабораторное оборудование.
- Во избежание взаимного загрязнения, не путайте закручивающиеся крышки пузырьков с реагентами.
- Плотно закрывайте пузырьки с реагентами сразу после использования, во избежание испарения и микробного заражения.
- После вскрытия и дальнейшего хранения, проверяйте пузырьки с конъюгатом, калибраторами и контролями на предмет бактериального заражения перед последующим использованием.
- Во избежание взаимного заражения и ошибочно высоких результатов, отмеряйте калибраторы, контроли и образцы экстрактов кала и распределяйте конъюгат и субстрат аккуратно на дно микропланшетных лунок, не разбрызгивая.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия в количестве менее 0.1% (масса/объем) и/или 0,1% катон.
- Храните раствор субстрата в оригинальной темной упаковке; раствор должен быть прозрачного либо бледно-желтого цвета. Аккуратно встряхните пред

использованием.

- Набор предназначен для использования квалифицированным персоналом, хорошо обученным в условиях лаборатории.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Дистиллированная вода
- Пробирки для сбора кала и транспортировочный контейнер
- Приспособления для экстракции (продукт «Кальпро» № CAL0500)
- Одноразовые, хрупкие петли для посева
- Одноразовые пробирки для разбавления образцов (пробирки Эппендорфа или аналог)
- Чувствительные цифровые весы (40 – 150 мг) (для метода взвешивания, см. пункт 7)
- Вихревая мешалка.
- Одноразовые полистироловые пробирки с закручивающимися крышками, 5 мл
- Пипетки объемом 10 – 1000 мкл.
- Пипеточный Дозатор или многоканальная пипетка, 100 мкл.
- Промыватель микропланшетных лунок или многоканальная пипетка, 300 мкл.
- Встряхиватель для планшетов (500 – 700 об/мин).
- Таймер
- Микропланшетный ридер, фильтр 405 нм.
- 1 М NaOH (Стоп-реагент; дополнительно)

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Набор был разработан и утвержден для образцов кала, но также может использоваться для образцов сыворотки/плазмы.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед проведением теста необходимо довести все реагенты, образцы и контроли до комнатной температуры (18 – 25°C).

7.1.1 Полоски микротитровального планшета с покрытием

Готовые к использованию полоски планшета, покрытые моноклональными

анти-телами, специфичными для Кальпротектина, очищенными

иммуноаффинным методом. Неиспользованные полоски необходимо сразу убрать с рамки и немедленно поместить их обратно в упаковку из фольги с влагопоглотителем. Хранить при температуре 2 – 8°C до окончания срока годности.

7.1.2 Буфер для разбавления образца

Разбавьте 5х концентрированный буфер для разбавления образца дистиллированной/деионизированной водой в пропорции 1(20 мл) к 4 (80 мл) в чистой емкости для получения 100 мл раствора. Храните разбавленный буфер для разбавления образца в закрытой емкости при температуре 2 – 8°C до окончания срока годности.

7.1.3 Промывающий раствор

Разбавьте 20х концентрированный промывающий раствор дистиллированной/деионизированной водой в пропорции 1 (50 мл) к 19 (950 мл) в чистой емкости для получения 1000 мл раствора. Храните разбавленный промывающий раствор в закрытой емкости при температуре 2 – 8°C до окончания срока годности.

7.1.4 Буфер для экстракции кала

Разбавьте 2.5х концентрированный буфер для экстракции кала дистиллированной/деионизированной водой в пропорции 1 (90 мл) к 1.5 (135 мл) в чистой емкости для получения 225 мл рабочего раствора. Хорошо перемешайте. Храните разбавленный буфер в закрытой емкости при температуре 2 – 8°C время – до окончания срока годности.

7.1.5 Калибраторы и контроли

Пузырьки с пометкой Калибратор А – F, также как и Контроли, содержат по 1,0 мл готового раствора. Информация о концентрации Кальпротектина в разных пузырьках указана на этикетках.

7.1.6 Ферментный конъюгат

Пузырек содержит 13 мл антител кролика к Кальпротектину, очищенных иммуноаффинным методом и меченых щелочной фосфатазой, в буфере со стабилизаторами, консервантами и инертной красной краской. Раствор готов к употреблению.

7.1.7 Раствор ферментного субстрата (pNPP)

Пузырек содержит 13 мл раствора *p*-нитрофенилфосфата (pNPP). Раствор готов к использованию и должен храниться в оригинальном темном пузырьке.

7.2 СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор был разработан и утвержден для образцов кала, но также может использоваться для образцов сыворотки/плазмы.

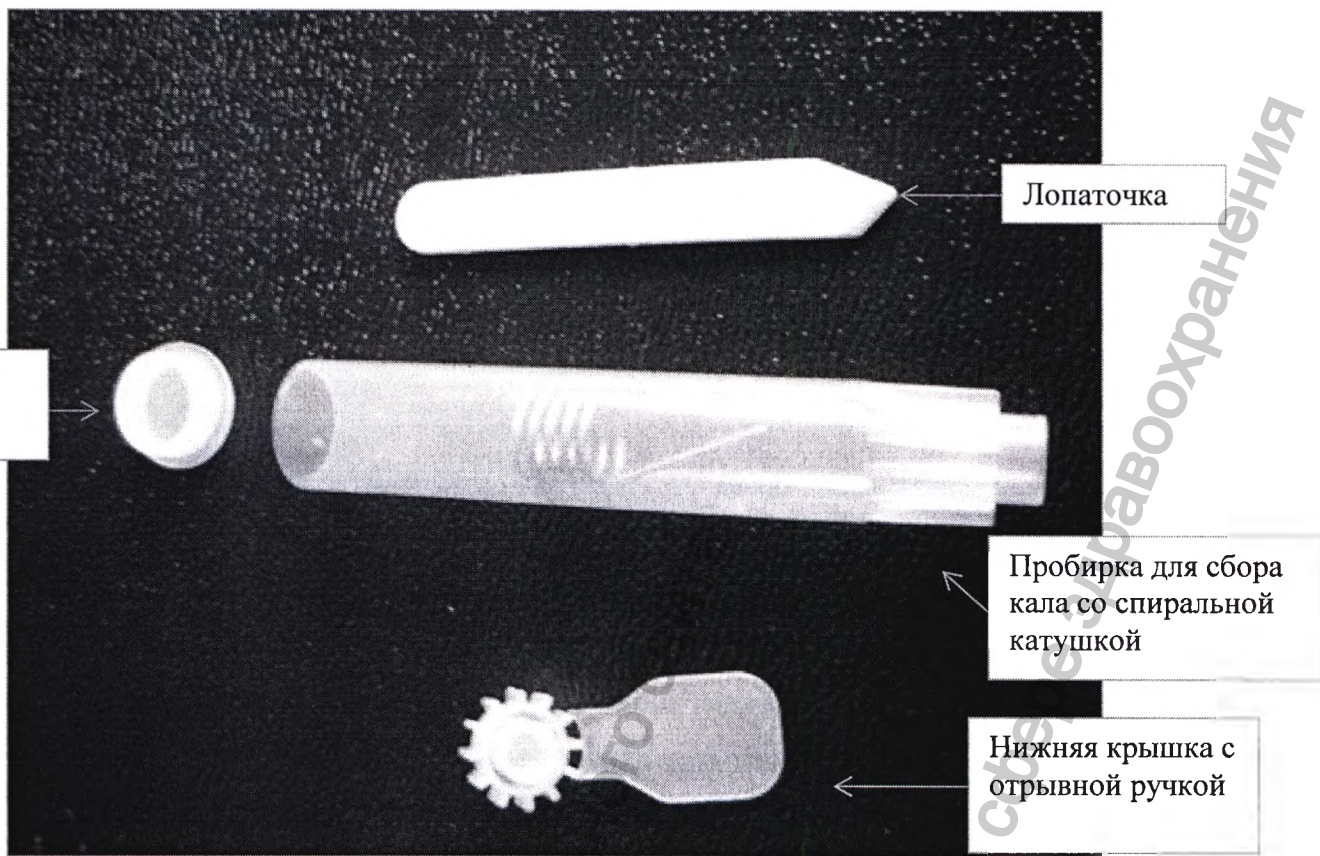
7.2.1 Образцы кала

Так как Кальпротектин очень стабилен в кале, пациенты могут собрать небольшое количество в домашних условиях. Соберите 1 – 5 г (примерно 1 чайную ложку), поместите в подходящий чистый контейнер и доставьте в лабораторию как можно скорее в течение 4 дней. Если поместить образец в специальный контейнер, утвержденный для транспортировки, можно отправить образец по обычной почте, таким образом, не будет необходимости в охлаждении. Следует избегать нагревания выше 30°C.

До отправки образцы также можно хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Перед экстракцией и тестированием замороженные образцы необходимо разморозить и довести до комнатной температуры. Не следует подвергать образцы повторной заморозке и разморозке. Обратите внимание, что тестирование замороженных образцов кала может привести к повышенным уровням кальпротектина, скорее всего из-за высвобождения из гранулоцитов.

Замечание: перед началом экстракции, образец кала необходимо хорошо гомогенизировать с помощью, например, лопаточки, перед тем, как будет взято небольшое количество для экстракции.

Экстракция с помощью специального приспособления



(Calpro AS, номер продукта CAL0500)

1. Используйте маленькую лопаточку (или в качестве альтернативы петлю для посева), чтобы наполнить мензурку нижней крышки, которая соберет примерно 100 мг образца. Следует избегать попадания зерен, гранул, а также пузырьков воздуха.
2. Удалите излишки образца, и плотно закройте крышку в нижней узкой части пробирки.
3. Наполните мензурку 4,9 мл буфера для экстракции и плотно закройте верхнюю крышку.
4. Энергично встряхивайте закрытую пробирку в течение 3 минут, чтобы разбить крупные частицы. В случае необходимости продолжайте встряхивать, чтобы остались только твердые частицы.
5. Оставьте пробирку на пару минут, чтобы частицы могли осесть. Центрифугирование не требуется, но можно выполнить короткое центрирование, если требуется полное растворение частиц.
6. Перенесите около 0,5 мл в новую пробирку для исследования или хранения. Экстракты можно хранить при температуре 2 – 8°C в течение как минимум 5 дней или в замороженном состоянии при -20 °C до 6 месяцев ¹²⁾
7. Теперь экстракт готов для разбавления согласно вкладышу в упаковке для выполнения исследования. Экстракт представляет собой 1:50 (вес:объем)

раствор образца кала.

Экстракция методом взвешивания (без использования специального приспособления)

1. Взвесьте пустую пробирку с закручивающейся крышкой и петлей для посева.
2. Извлеките около 100 мг (40 - 120 мг) кала с помощью петли и поместите его в пробирку с закручивающейся крышкой. Следует избегать попадания тяжелых, непереваренных частиц, таких как волокна и семена.
3. Взвесьте пробирку и петлю с калом, чтобы определить вес нетто кала.
4. Отломите или отрежьте верхнюю часть ручки петли, оставив нижнюю часть внутри пробирки.
5. Добавьте разбавленный буфер для экстракции кала к массе: пропорция 1:50, к примеру, 4.9 мл буфера к 100 мг кала. Закройте пробирку.
6. С помощью вихревой мешалки энергично перемешивайте в течение 30 секунд.
7. Продолжайте смешивать во встряхивателе (примерно на 1000 об/мин) в течение 30±5 минут с петлей внутри пробирки, которая играет роль лопасти.
8. Экстракт, представляющий собой раствор 1:50 исходного образца кала, готов для разбавления/тестирования. Оставьте на пару минут, дайте частицам осесть и аккуратно втяните пипеткой из верхней части пробирки. Центрифугирование не требуется, можно выполнить короткое центрирование, если требуется полное растворение частиц.
9. Для тестирования или хранения перенесите около 0.5 мл в новую пробирку. Экстракты можно хранить при температуре 2 - 8 °С как минимум 5 дней, а в замороженном состоянии (при температуре -20°С и ниже) – до 6 месяцев¹².

7.2.2 Образцы плазмы и сыворотки

Для того чтобы показатели кальпротектина в сыворотке или плазме были точными, необходимо, чтобы белок не выделялся из нейтрофильных гранулоцитов крови *in vitro*. Для плазмы рекомендуемым антикоагулянтом является ЭДТА.

Процедура приготовления образца следующая:

1. Соберите кровь с помощью пробирки Vacutainer.
2. Как можно быстрее центрифугируйте кровь при 3000 об/мин в течение 10 минут, но не позднее, чем через 3 часа после сбора образца.
3. Соберите только верхние 2/3 слоя сыворотки или плазмы, аккуратно втягивая их пипеткой таким образом, чтобы избежать попадания лейкоцитов из лейкоцитной пленки.

Для ИФА разбавьте сыворотку или плазму в пропорции 1:20 (например, 50 мкл образца + 950 мкл буфера для разбавления образца).

ПРОЦЕДУРА ИФА

Методические указания

- Подготовка: *перед* выполнением исследования внимательно ознакомьтесь с протоколом. Надежность результатов зависит от строгого следования указаниям протокола исследования. Перед тем, как начать анализ, аккуратно установите планшетную раскладку для всех образцов и контролей, используя, например, лист, поставляемый в наборе. Выберите необходимое количество микротитровальных полосок. Неиспользованные полоски должны быть помещены в упаковку из фольги и храниться в соответствии с описанием, приведенном в пункте 6.1.

- Рекомендуется разбавлять экстракты кала в пропорции 1:100. Это разбавление даст результаты от 25 мг/кг (предел определения) до 2500 мг/кг в кале. Экстракты с более высокими значениями кальпротектина могут быть разбавлены в большей пропорции (>1:100) и повторно измерены, если требуется количественное значение. Экстракты с более низкими значениями кальпротектина могут быть разбавлены в меньшей пропорции (1:50) и повторно измерены, если требуется количественное значение. Установленный фактор разбавления должен быть учтен при конвертации из нг/мл в мг/кг (см. пункт 11).

- Необходимо строго следовать процедуре исследования без значительных задержек между шагами.

- Для распределения каждого калибратора, контроля и образца следует использовать чистые одноразовые наконечники для пипеток.

- Для получения наиболее точных результатов, следует готовить калибраторы, контроли и образцы в двойном экземпляре.

- Перед тем, как начать анализ, необходимо довести все образцы и реагенты набора до комнатной температуры (18 – 25°C) как минимум в течение часа.

Процедура ИФА

1. Разбавьте экстрагированные образцы в соотношении 1:100 (например, 10 мкл образца + 990 мкл буфера для разбавления образца) и хорошо перемешайте с помощью вихревой мешалки .

2. Добавьте по 100 мкл калибратора, контроля и разбавленного образца дублирующие лунки рядами; см. рекомендации по планшетной раскладке в пункте 8.

3. Накройте планшет уплотняющей фольгой и инкубируйте при комнатной температуре на горизонтальном планшетном встряхивателе при 500 – 700 об/мин в течение 40±5 минут.

4. В конце периода инкубации удалите жидкость и промойте лунки, добавляя

по 300 мкл промывающего раствора в каждую лунку. Удалите как можно больше жидкости и повторите эту процедуру 3 раза. Если Вы используете аппарат для промывания планшетов, убедитесь в том, что заливные и откачивающие зонды не забиты, чтобы обеспечить эффективное промывание лунок. После последней промывки переверните планшет и тщательно постучите отверстиями лунок по влагопоглощающей ткани, чтобы удалить остатки промывающего раствора.

5. Аккуратно смешайте содержимое пузырька с ферментным конъюгатом перед использованием (не трясите). Добавьте по 100 мкл конъюгата в каждую лунку, желательнее при этом использовать пипеточный дозатор или многоканальную пипетку.

6. Накройте планшет уплотняющей фольгой и инкубируйте при комнатной температуре на горизонтальном планшетном встряхивателе при 500 – 700 об/мин в течение 40 ± 5 минут.

7. Повторите промывку, как указано выше, 3 раза, используя по 300 мкл промывающего раствора на лунку.

8. Добавьте по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку, рекомендуется использовать пипеточный дозатор или многоканальную пипетку.

9. Инкубируйте планшет при комнатной температуре в течение примерно 20 – 30 минут (не встряхивая), избегая попадания света.

10. Дополнительно: добавьте по 100 мкл стоп-реагента 1М NaOH в каждую лунку, если требуется фиксированное время инкубации.

11. Определите значения оптической плотности (OD) на 405 нм, используя ридер ИФА.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет концентрации кальпротектина в образцах кала пациента (значения в нг/мл):

1. Рассчитайте средние значения оптической плотности всех лунок-дубликатов (калибраторы и образцы).
2. Чтобы получить калибровочную кривую, расположите полученные значения концентраций калибраторов (нг/мл) по оси x и среднее значение оптической плотности по оси y, и постройте график. **Рекомендуется применять 4-параметрическую функцию** (см. рисунок 1). Если требуется логарифмическая ось x, для калибратора A (0 нг/мл) должно быть использовано значение 0,001 нг/мл.
3. Используйте калибровочную кривую для определения концентрации кальпротектина в разбавленных образцах, основываясь на значениях их

оптической плотности.

4. Умножьте концентрацию Кальпротектина (нг/мл) в разбавленных экстрактах кала на 5 для того, чтобы конвертировать показатели Кальпротектина в исходном образце кала в мг/кг.

Данный фактор переводит значение из нг/мл в мг/кг и корректирует значение полного разбавления в соотношении 1:5000 (раствор 1:50, полученный в течение процедуры экстракции, и раствор экстрактов 1:100).

Например, если разбавленный образец экстракта имеет значение 100 нг/мл, концентрация в исходном образце кала была $100 \times 5 = 500$ мг/кг.

Замечание: Если образцы разбавлялись больше (или меньше), чем рекомендуемое соотношение 1:100, при расчете должен учитываться этот фактор разбавления.

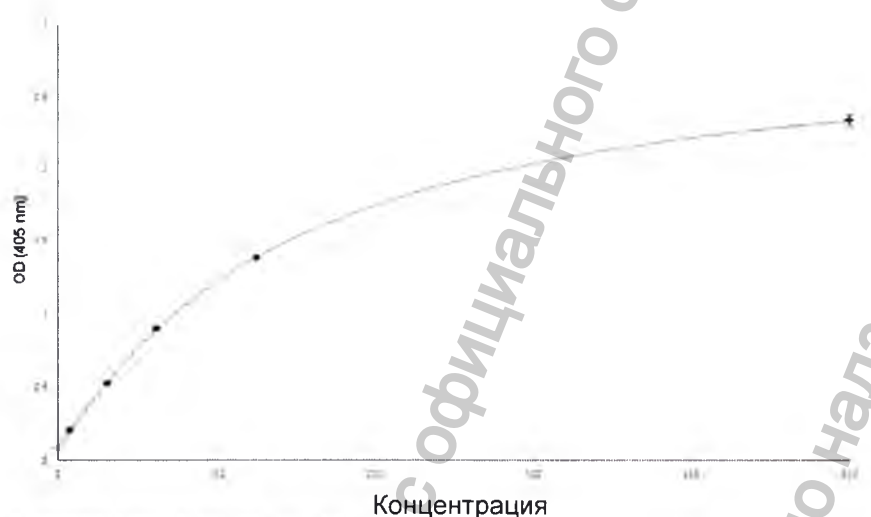


Рисунок 1: образец калибровочной кривой с использованием 4-параметрической функции

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

В литературе были описаны и опубликованы следующие значения Кальпротектина в образцах кала:

Норма	5 – 50 мг/кг
Положительно	> 50 мг/кг
Среднее значение у пациентов с симптомами колоректального рака	350 мг/кг
Симптоматическое ВЗК и в стадии обострения	200 – 40,000 мг/кг

Обратите внимание, что диагноз не должен ставиться на основе одного результата теста. При диагностике необходимо учитывать историю болезни и симптоматику.

Следующие значения кальпротектина были получены в крови 100 здоровых доноров (50 мужчин и 50 женщин):

Тип образца	Среднее значение (мкг/л)	Ст. откл.
ЭДТА плазма	627	307

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Реагенты устойчивы до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при условиях хранения закрытыми при температуре 2 – 8 °С . Открытые планшеты, реагенты и концентрированные буферы стабильны до 3 месяцев, при условии хранения при температуре 2 – 8 °С .

Рабочие растворы: промывающий раствор, буфер для разбавления образца и буфер для экстракции кала, приготовленные в чистой емкости, могут храниться при температуре 2 – 8 °С до 1 месяца.

Следует избегать высоких температур и прямого солнечного света.

11. Утилизация

Уничтожение неиспользованных изделий медицинского назначения (реактивов) в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

По вопросам, касающимся качества Набор реагентов in vitro «тест ИФА CalproLab™ на Кальпротектин / Calprolab™ Calprotectin ELISA (ALP)» с принадлежностями для количественного определения кальпротектина в кале человека просьба обращаться по адресу: ЗАО «АГРОС-ИНТЕРНЕЙШНЛ»; ИНН 7816111734; 196066, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр. 212, тел.: +7 (812) 303-82-34, тел/факс: +7 (812) 303-82-44