



# **ULOSTEEN KALPROTEKTIINIA OSOITTAVIEN VIERITESTIEN VERTAILU**

Heidi Tarvainen

Satu Tervo

Opinnäytetyö  
Huhtikuu 2013  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Tampereen ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TARVAINEN, HEIDI & TERVO, SATU:  
Ulosteen kalprotektiinia osoittavien vieritestien vertailu

Opinnäytetyö 46 sivua, josta liitteitä 10 sivua  
Huhtikuu 2013

---

Opinnäytetyössä vertailtiin kolmea ulosteen kalprotektiinia osoittavaa vieritestiä: Bühlmann Quantum Blue-, Orion Certest- sekä PreventID CalDetect- vieritestejä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorion (HUSLAB) polyklonaaliseen ELISA-referenssimenetelmään. Tutkimuksessa analysoitiin 35 ulostenäytettä. Ennen varsinaista käytännöntyön aloitusta vertailtiin Bühlmann Quantum Blue-testin kahta suspensioputkea, niiden käytettävyyttä ja analyttistä laatua. Tutkimuksessa vertailtiin eri vieritesteillä saatujen tulosten lisäksi testien käyttöominaisuuksia, tulosten tulkintaa ja läpimenoaikaa.

Ulosteen kalprotektiinia käytetään merkkiaineena tulehduksellisten suolistosairauksien aktiivisuuden osoitukseen ja sitä voidaan käyttää myös apuna IBD:n ja ärtyneen suolen oireyhtymän erotusdiagnoosissa. Kalprotektiinin osoittamiseen tarvitaan nopea ja luotettava vieritesti.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa, jonka perusteella tullaan ottamaan Keski-Suomen keskussairaalan käyttöön ulosteen kalprotektiinia osoittava vieritesti. Toimeksianto opinnäytetyölle tuli Keski-Suomen sairaanhoitopiirin laboratoriolikelaite KESLABilta. Käyttöön valittu vieritesti tullaan tekemään joko laboratorio-olosuhteissa tai polikliinisesti hoitoyksikössä.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että kaikki vieritestit ovat mahdollisia ottaa Keski-Suomen sairaanhoitopiiriin käyttöön. Bühlmann Quantum Blue- testi soveltuu tehtäväksi laboratorio-olosuhteissa sen monivaiheisuuden ja tarkkojen pipetointimäärien vuoksi. Orionin Certest ja PreventID CalDetect soveltuvat tehtäväksi hoitoyksikön toimesta, niiden nopeuden ja helppokäyttöisyyden vuoksi.

---

Asiasanat: kalprotektiini, uloste, tulehdukselliset suolistosairaudet, IBD, Vieritesti

## **ABSTRACT**

Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

TARVAINEN, HEIDI & TERVO, SATU:

Comparison of Point-of-Care tests for the determination of faecal calprotectin

Bachelor's thesis 46 pages, appendices 10 pages

April 2013

---

The purpose of this Bachelor's thesis was to compare point-of-care-tests which indicate calprotectin in human faeces. There were three tests for the determination of faecal calprotectin: the Bühlmann Quantum Blue, Orion Certest and PreventID CalDetect. The results were compared to a reference method which was the polyclonal ELISA-method and made in the laboratory of Helsinki University Central Hospital (HUSLAB). The testing was made with 35 patient samples.

Before starting the actual study we compared two suspension pipes of the Bühlmann Quantum Blue-test, their usability and analytical quality. The actual research task was to compare different kinds of point-of-care tests to detect calprotectin in faeces, the results, their usability and lead time.

Calprotectin is a faecal marker of inflammatory bowel diseases (IBD) and it is ideal for monitoring disease activity. Moreover, it can be used in the differentiation between organic intestinal diseases and functional diseases (IBS). A point-of-care test for the determination of faecal calprotectin has to be quick and reliable.

The aim of the thesis was to produce information that can be used in the selection of a test for the determination of faecal calprotectin in The Central Finland Central Hospital in Jyväskylä. This thesis was assigned by Central Finland Health Care laboratory KESLAB. The chosen point-of-care test will be used in the laboratory or in the health care district.

Based on the finding of the thesis it can be stated that all the tests are possible to use in The Central Finland Central Hospital in Jyväskylä. The Bühlmann Quantum Blue- test is best suited for laboratory conditions because of its multiple phases and accurate pipette quantities. The Orion Certest and PreventID Caldetect can be done in the health care district because they are quick and simple to perform.

---

Key words: calprotectin, faecal, inflammatory bowel disease, IBD, Point of care test, POC

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TULEHDUKSELLISET SUOLISTOSAIRAUDET .....	7
2.1	Ulseroiva eli haavainen koliitti .....	8
2.2	Crohnin tauti .....	9
3	KALPROTEKTIINI SUOLISTOTULEHDUKSEN INDIKAATTORINA.....	10
4	VERTAILTAVAT TESTIMENETELMÄT .....	14
4.1	Vieritestaus .....	14
4.2	Entsyymi-immunomenetelmä.....	15
4.3	Immunokromatografinen menetelmä.....	16
4.4	Bühlmann Quantum Blue-vieritesti .....	16
4.5	Orion Certest-vieritesti .....	18
4.6	PreventID CalDetect-vieritesti.....	19
5	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT.....	21
6	TUTKIMUSMENETELMÄ JA AINEISTONKERUU.....	22
6.1	Tutkimusmenetelmä.....	22
6.2	Aineistonkeruu.....	22
6.3	Aineiston analyysimenetelmät.....	23
7	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS .....	24
8	TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU .....	26
8.1	Bühlmann Quantum Blue .....	26
8.2	Orion Certest.....	27
8.3	PreventID CalDetect .....	28
8.4	Yhteenveto .....	30
9	EETTISYYS.....	31
10	LUOTETTAVUUS .....	32
11	POHDINTA.....	33

LÄHTEET .....	35
LIITTEET .....	37
Liite 1. Ulosteen kalprotektiinin vieritestien vertailutulokset .....	37
Liite 2 Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttöopas.....	39
Liite 3: 1(2) Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttömanuaali.....	40
Liite 3: 2(2) Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttömanuaali.....	41
Liite 4: 1(3) Orion Certestin käyttömanuaali .....	42
Liite 4: 2(3) Orion Certestin käyttömanuaali .....	43
Liite 4: 3(3) Orion Certestin käyttömanuaali .....	44
Liite 5: 1(2) PrevenID CalDetect käyttömanuaali.....	45
Liite 5: 2(2) PrevenID CalDetect käyttömanuaali.....	46

## 1 JOHDANTO

Tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD, inflammatory bowel disease) ovat lisääntyneet merkittävästi ja potilasmäärät viisinkertaistuneet viimeisen 25 vuoden aikana. Uusia tautidiagnooseja tehdään yli 2000 vuodessa ja määrä lisääntyy vuosittain 6-8 %. (Färkikilä 2013.) Tulehduksellisten suolistotautien (jatkossa IBD) diagnostiikassa käytetään usein kalprotektiinin määrittystä potilaan ulostenäytteestä. Kalprotektiini on erityisesti neutrofiilisten valkosolujen erittämä proteiini, jota erittyä ulosteeseen suolenlimakalvon tulehdustiloissa erityisesti Crohnin taudissa ja ulseroivassa (haavaisessa) koliitissa. IBD:ssä kalprotektiinipitoisuus nousee ulosteessa huomattavasti. (Sipponen & Kolho 2011, 2631.)

Ulosteen kalprotektiinia voidaan mitata nopeasti potilaan ulosteesta erilaisilla vieritestillä (Vestergaard, Nielsen, Dahlerup & Hornung 2008, 1). Vieritestillä saadaan yleiskuva tulehduksellisten suolistosairauksien aktiivisuudesta nopeasti ja siitä on apua IBD:n ja ärtyneen suolen oireyhtymän erotusdiagnoosiin (IBS, irritable bowel disease). Epäiltäessä IBD:tä, seulontatutkimuksella pystytään vähentämään kajoavia (invasiivisia) tähystystutkimuksia. Endoskooppisilla eli tähystystutkimuksilla on monia haittavaikutuksia ja ne eivät sovi toistuvaan seurantaan, kun taas ulosteen kalprotektiinitutkimus on non-invasiivinen ja halpa menetelmä IBD:n ja IBS:n erotusdiagnoosiin. (Mindemark 2010, 38–40). Ihanteellisen vieritestin tulisi olla helposti suoritettava, toistettava, kohtuuhintainen sekä herkkä ja tarkka suolistotulehduksen osoittaja (Sipponen & Kolho 2011, 2631).

Opinnäytetyössä vertaillaan kolmea ulosteen kalprotektiinipitoisuutta osoittavaa vieriestiä referenssimenetelmänä toimivaan entsyymi-immunologiseen ELISA-menetelmään, joka tehdään Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriossa (HUSLAB). Vieritestit ovat Orionin Certest, PreventID CalDetect sekä Bühlmann Quantum Blue ja näytteet ovat potilasnäytteitä. Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa, jonka perusteella tullaan ottamaan Keski-Suomen keskussairaalan käyttöön ulosteen kalprotektiinia osoittava vieriesti. Toimeksianto opinnäytetyölle tuli Keski-Suomen sairaanhoitopiirin laboratoriolikelaite KESLABilta.

## 2 TULEHDUKSELLISET SUOLISTOSAIRAUDET

Tulehduksellisilla suolistosairauksilla tarkoitetaan ulseroivaa eli haavaista koliittia, jota sairastaa kaksi kolmasosaa sekä Crohnin tautia, jota sairastaa yksi kolmasosaa sairastuneista potilaista. Näiden sairauksien syitä ei tarkasti tunneta ja aiheuttajia voi olla useampiakin. Onkin esitetty, että sairaudet liittyvät hyvään elintasoon ja kaupunkiasumiseen, eikä altistavia tekijöitä sairastumiselle tiedetä (Niemi 2007, 466–467). Kyseessä lienee kuitenkin sisäsyntyinen tulehdusreaktio suolen limakalvon rakenteissa (Puhakka 2012, 217).

Tulehdukselliset suolistosairaudet yleistyvät koko ajan ja ne ovat osoittautuneet teollistuneiden maiden sairauksiksi (Puhakka 2012, 217). Kansaneläkelaitoksen erityiskorvattavien lääketilastojen perusteella tulehduksellisten suolistosairauksien ilmaantuvuus Suomessa on noin 200/100 000 asukasta vuodessa ja ne ovat yleistynyt ilmiö (Niemi 2007, 467). Professori Färkkilä toteaa suolistotulehdusten olevan jo lähes kansantauti, koska niiden esiintyvyys lisääntyy voimakkaasti, jopa 8 % vuodessa. Potilasmäärät ovat viisinkertaistuneet viimeisen 25 vuoden aikana ja uusia tautidiagnoseja tehdään yli 2000 vuodessa. Diagnoosin saaneita on Suomessa noin 37 000. (Färkkilä 2013.)

Oireet sekä taudinkuva voivat vaihdella suuresti eri potilaiden välillä ja taudinkuvassa voi olla myös piirteitä sekä Crohnin taudista että ulseroivasta koliitista. Noin 10-20 %:ssa tapauksista ei voi tehdä diagnostista eroa ulseroivan koliitin ja Crohnin taudin välillä. (Niemi 2007, 467.) Tulehduksellinen suolistosairaus (IBD) diagnosoidaan yleensä endoskooppisella kolonoskopiatutkimuksella ja IBD:n hoitona käytetään ensisijaisesti lääkehoitoa, tarvittaessa myös kirurgiasta hoitoa. Seurannassa endoskooppisia tutkimuksia tehdään, mikäli löydöksellä katsotaan olevan merkitystä potilaan hoidon kannalta. Kliinisen aktiivisuuden seurantaan on käytetty hemoglobiini-, lasko- ja C-reaktiivisen proteiinin (CRP) -määrittämiä sekä seerumin albumiinin mittausta. (Niemi 2007, 501.) Uusi markkeri IBD:n erotusdiagnoosissa ja seurannassa on ulosteen kalprotektiinipitoisuus, jonka on todettu olevan spesifimpi markkeri osoittamaan suolistotulehdusta (Manz, Burri, Rothen, Tchangui, Niederberger, Rossi, Beglinger & Lehmann 2012, 4).

## 2.1 Ulseroiva eli haavainen koliitti

Ulseroiva koliitti (Colitis ulcerosa) eli haavainen paksusuolen tulehdus on krooninen suolistosairaus, joka esiintyy paksusuolen alueella. Haavaista paksusuolentulehdusta sairastaa 4-5 henkilöä tuhannesta ja se on nuorten aikuisten sairaus, joka alkaa usein 20–35-vuotiaana. (Mustajoki 2012.) Tyypillisiä oireita Colitis ulserosalle on ripuli, johon saattaa liittyä myös veriset ja limaiset ulosteet, sekä ajoittain esiintyvät vatsakivut. Tautiin voi kuulua myös muita yleisoireita kuten ruokahaluttomuutta, anemisoitumista, yleiskunnon laskemista sekä laihtumista. (Niemelä 2007, 469.)

Oireiden kesto, oirekuva sekä vaiheet saattavat vaihdella suuresti eri potilaiden välillä. Taudinkulkuun kuuluvat toistuvat relapsit (taudin uusiutumisvaihe), jotka voivat tulla muutamien viikkojen, kuukausien tai jopa vuosien välein ja lääkehoidolla saavutetut tai spontaanit remissiot. Noin 10–20 %:lla sairaus jatkuu aktiivisena ilman selviä remissioita jopa vuosien ajan. (Niemelä 2007, 469.)

Haavainen koliitti diagnosoidaan paksusuolen tähytystutkimuksella ja diagnoosi varmistetaan aina histologisen näytteen mikroskooppisella tutkimuksella (Mustajoki 2012). Anamneesi eli esitiedot ovat myös tärkeä osa diagnoosia. Tavanomaiset laboratoriotulokset ovat lievissä ja keskivaikeissakin tapauksissa yleensä normaaleja, mutta pitkään jatkunut verenvuoto voi aiheuttaa anemiaa. (Niemelä 2007, 471.) Diagnoosin jälkeen aloitetaan mahdollinen lääkehoito uusiutumisen estämiseen, jonka tehoa seurataan laboratoriotuloksilla ja uusintatähystyksillä (Mustajoki 2012).

Tauti rajoittuu paksusuolen eri osiin ja jaetaan esiintyvyyden perusteella kolmeen tautimuotoon: peräsuoleen rajoittuvaan krooniseen tulehdukseen (proktiitti), paksusuolen loppupään tauti (distaalinen koliitti), tai tulehdus voi esiintyä koko paksusuolen alueella (laaja-alainen koliitti). Tauti voidaan luokitella myös oireiden voimakkuuden perusteella (Puhakka 2012, 217). Taudin aaltoilevuudesta ja monimuotoisuudesta johtuen se on vaikea luokitella, mutta käytännössä yleisoireiden ja jatkuvien vatsakipujen ilmaantuminen on merkki vaikeasta koliitista (Niemelä 2007, 470).



## 2.2 Crohnin tauti

Crohnin tauti on krooninen tulehduksellinen suolistosairaus, joka voi aiheuttaa tulehdusmuutoksia kaikkialle ruuansulatuskanavaan suusta peräaukkoon, mutta tyypillisin paikka on ohutsuolen loppuosa. Crohnin tautiin sairastuu Suomessa vuosittain noin 400 henkilöä ja noin 70 %:lla on taudissaan aaltoilua aktiivisen vaiheen ja remission välillä, potilaat voivat olla pitkäänkin oireettomia ja välillä voi olla runsaasti oireita antavia jaksoja. (Puhakka 2012, 218–219; Jussila, Tarnanen & Vuorio, 2011.)

Crohnin taudin oireisiin kuuluvat kuume, laihtuminen, vatsakivut, veriulosteet sekä anaalikanavan vaivat. Yleisoireista väsymys ja kuumeilu nousevat tyypillisesti esille pitkään jatkuneiden oireiden vuoksi. Vaikeassa taudissa myös fistelit eripuolilla suolta sekä suoletta ympäröiviin elimiin ovat tyypillisiä. Crohnin taudin taudinkuva on hyvin salakavala ja vaihteleva, koska tauti voi esiintyä missä tahansa ruuansulatuskanavaa. Crohnin tautia voidaan luokitella tautikuvanperusteella strikturoivaksi, fistuloivaksi tai tulehdukselliseksi taudiksi. (Niemelä 2007, 487–488, 490–494.)

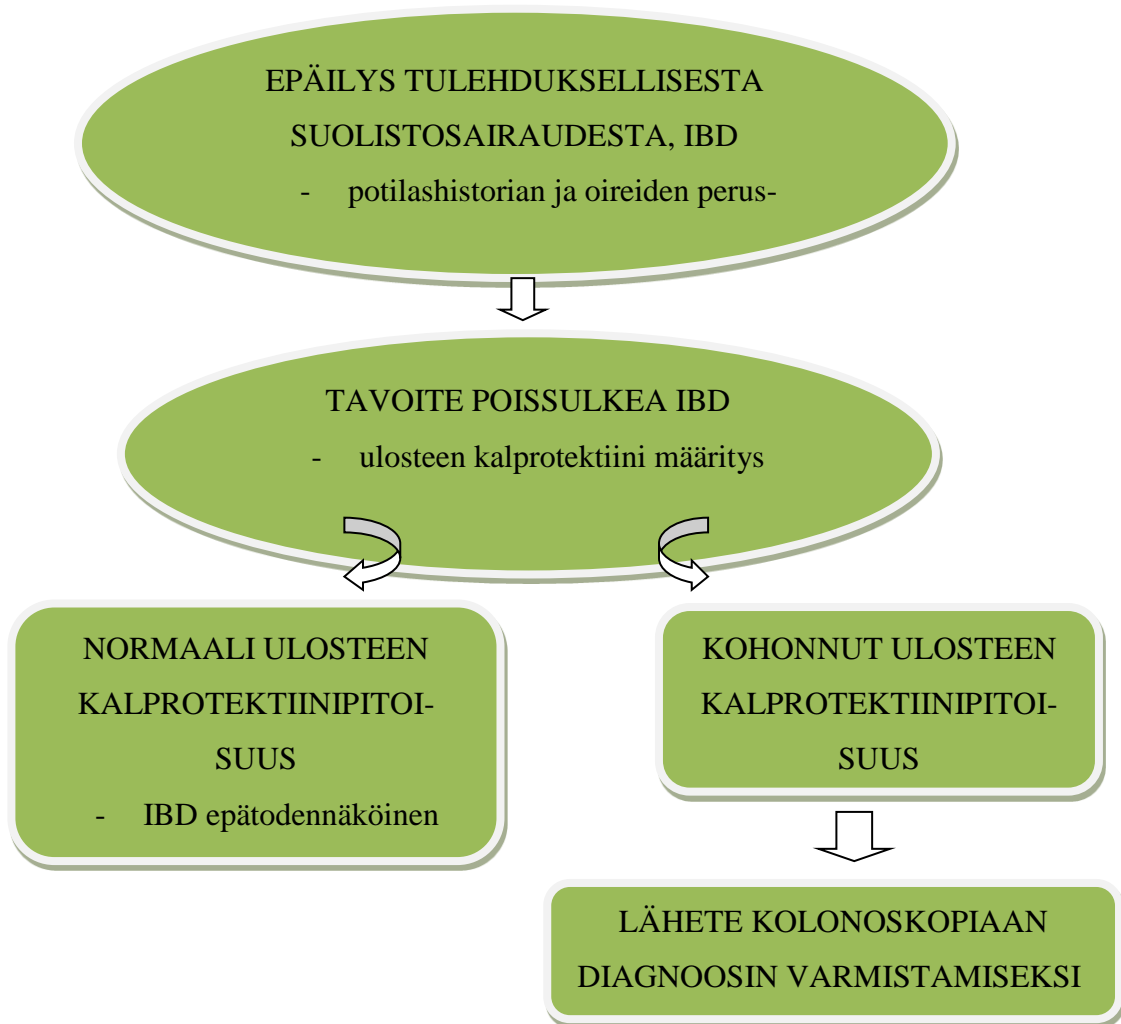
Epäiltäessä Crohnin tautia tavallisin tutkimus on paksusuolen tähystys, jonka yhteydessä tutkitaan myös ohutsuolen loppuosa sekä otetaan näytepaloja mikroskooppista tutkimusta varten. Ohutsuoli voidaan tutkia tietokonetomografialla, magneettikuvauksella tai kapselikuvauksella. (Jussila ym. 2011.) Yleensä oikeaan diagnoosiin päästään kliinisen kuvan sekä histologisen kudoksenäytteen mikroskooppitutkimuksella ja sulkemalla pois infektion aiheuttama enterokoliitti (Niemelä 2007, 489). Taudin aktiivisessa vaiheessa seuranta on tarpeen muutaman kuukauden välein, mutta tähystystutkimusten tarve harkitaan tapauskohtaisesti (Jussila ym. 2011). Tauti aiheuttaa syvän tulehduksen ja aktiivista tautia sairastavilla veren tulehdusparametrit, kuten C-reaktiivinen proteiini (CRP) ja lasko usein kohoavat. Usein myös verenkuvassa on aneemian, joka voi johtua raudan, folaatin tai B<sub>12</sub>-vitamiinin puutteesta. (Niemelä 2007, 489.)

### 3 KALPROTEKTIINI SUOLISTOTULEHDUKSEN INDIKAATTORINA

Kalprotektiini on valkuaisaine, jota vapautuu ulosteeseen IBD:ssä erityisesti veren neutrofiilistä valkosoluista, mutta myös monosyyteistä ja aktivoituneista makrofageista. Suolen limakalvon tulehtuessa kalprotektiinia alkaa erittyä ja tämän pitoisuus voidaan mitata ulosteesta. Kalprotektiini on kalsiumia ja sinkkiä sitova proteiinikompleksi, joka koostuu yhdestä kevytketjusta ja kahdesta raskaspolypeptidiketjusta. (Sipponen 2009.) Pitoisuustaso heijastaa epäsuorasti suolen limakalvon tulehduksen laajuutta ja vaikeusastetta, mutta tulehduksen mahdollisesta aiheuttajasta se ei kerro mitään vaan taso voi nousta sekä äkillisessä suolistotulehduksessa että pitkäaikaisessa sairaudessa (Kolho 2012, 43).

Kalprotektiinin pitoisuuden määrittystä ulosteesta voidaan hyödyntää tulehduksellisten suolistosairauksien diagnostiikassa, aktiivisuuden arvioinnissa, hoidon seurannassa ja pahenemisvaiheen ennustamisessa sekä suolistotulehduksen poissulkemiseksi (kuvio 1) (Manz ym. 2012, 2).

Ulosteen kalprotektiinimääritys on viimevuosina osottautunut erittäin tärkeäksi tutkimukseksi vatsavaivojen syitä selviteltäessä ja erityisesti IBD:n ja IBS:n erotusdiagnostiikassa. (Kolho 2012, 43.) Ei-tulehdukselliset vatsavaivat ovat hyvin yleisiä ja ärtyneen suolen oireyhtymä on näistä tavallisin. Se on toiminnallinen vatsavaiva, jolloin mitään fysiologista tai anatomista poikkeavuutta ei voida todeta. Arvioidaan, että jopa 10 % suomalaisista kärsii joskus näistä oireista. (Puhakka 2012, 221.)



KUVIO 1. Tulehduksellisen suolistosairauden tutkimusprosessi (muokattu Mindemark 2010, 38)

Kroonista tulehduksellista suolistosairautta potevat joutuvat käymään toistuvasti paksusuolen tähytyksissä suolen tulehduksen aktiivisuuden arvioimiseksi. Luotettavia merkkiaineita tähän tulehduksen tarkkailuun, taudin pahenemisvaiheen varhaiseen havaitsemiseen sekä lääkevasteen arvioimiseen on kaivattu pitkään. Tavalliset tulehdusmittarit kuten lasko ja CRP eli C-reaktiivinen proteiini korreloivat verraten huonosti tulehdukseen suolen limakalvolla, eikä niiden avulla voida ennustaa taudinkulkua riittävän hyvin. (Sipponen & Kolho 2011, 2631.) Tutkimuksilla on voitu osoittaa, että ulosteen kalprotektiinipitoisuutta voidaan käyttää taudinkulun seurannassa terveydenhuoltoa kuormittavien tähytystutkimusten sijasta (Färkkilä 2013).

Ihanteellisen suolistotulehduksen merkkiainetutkimuksen tulisi olla helposti suoritettava, toistettava, kohtuuhintainen sekä herkkä ja tarkka suolistotulehduksen osoittaja. Käytössä olevista laboratoriotutkimuksista ulosteesta mitattava kalprotektiini täyttää nämä vaatimukset parhaiten. Kalprotektiinia erittyy myös plasmaan, nivelnesteeseen, sylkeen, likvoriin sekä virtsaan, mutta ulosteessa sen pitoisuus on suurin. Normaalisissa tilassa ulosteen kalprotektiinipitoisuus on kuusinkertainen verrattuna plasman pitoisuuteen. (Sipponen & Kolho 2011, 2631.) Kalprotektiini on ulosteessa hyvin stabiili ja taso pysyy oleellisesti muuttumattomana useiden päivien ajan, vaikka näyte säilytettäisiin huoneenlämmössä (Kolho 2012, 43).

Epäiltäessä tulehduksellista suolistosairautta voidaan potilaan ulosteesta seulomalla kalprotektiinipitoisuutta vähentää invasiivisia tähytystutkimuksi, jolla saadaan aikaan merkittäviä kustannussäästöjä verrattuna suoraan kolonoskopiatutkimukseen (paksusuolentähytys) (Mindemark 2010, 40). Myös potilaat ovat ottaneet määrityksen positiivisesti vastaan ja nuoretkin potilaat ovat usein motivoituneita antamaan näytteen tutkittavaksi (Kolho 2012, 43). Määritys voidaan tehdä kertanäytteestä ulostetta, eikä ulosteen koostumus vaikuta merkittävästi tulokseen. Tutkittavan ei tarvitse noudattaa erityistä ruokavaliota, mutta tulehduskipulääkkeiden käyttöä tulisi välttää 1-2 viikkoa ennen näytteenantoa. (Sipponen & Kolho 2011, 2632.)

Suurentuneen ulosteen kalprotektiinipitoisuuden perusteella potilaat voidaan ohjata perusterveydenhuollosta jatkotutkimuksiin, jossa tulehduksellinen suolistosairaus voidaan diagnosoida kolonoskopian avulla. Infektion mahdollisuus tulee sulkea pois ennen tähytystoimenpidettä. (Färkkilä 2013.)

Ulosteen kalprotektiinitaso kuvastaa hyvin paksusuolen limakalvon tulehdusta, mutta peräsuolen tilaa sillä ei voida selvittää. Mikäli tulehduksellisen suolistosairauden epäily on vahva, potilas tarvitsee jatkoselvittelynä tähytystutkimuksen, eikä kalprotektiinitutkimukselle ole näin ollen aiheutta. Jos kalprotektiinitaso on jatkuvasti koholla, mutta paksusuolen tähytyksessä ei tavata mitään epänormaalia, on jatkoselvittelyt ohutsuolen osalta tarpeen. (Kolho 2012, 43.)

Kalprotektiinimäärittystä voidaan käyttää myös hoitovasteen seurannassa. Jos kalprotektiinipitoisuus pysyy muuttumattomana korkealla tasolla tai nousee, ei hoito toimi odotetusti. Olemassa ei kuitenkaan ole tutkimuksellista näyttöä siitä, mikä olisi hoitovasteen arvioinnissa se kalprotektiinitaso, joka on ns. riittävän hoitovasteen mittari tai toisaalta tasoa, jonka perusteella harkittaisiin hoidon tehostamista. Jos ulosteen kalprotektiinipitoisuus on toistuvasti hyvin korkealla tasolla vaikka potilaan vointi on hyvä, on kalprotektiinilöydös aihe tarkemmalle endoskooppiselle selvittelylle. (Manz ym. 2012, 3-4, 6.)

Normaalin ulosteen kalprotektiinipitoisuuden on ehdotettu olevan alle 50 µg/g, mutta IBD:n erotusdiagnostiikassa ja seurannassa on normaalin pitoisuuden raja-arvoksi vaikiintunut 100 µg/g. (Sipponen & Kolho 2011, 2632.) Lapsipotilailla tämän on arvioitu olevan sopiva raja kohonneille arvoille nykyisillä menetelmillä, mutta aikuispotilaiden kohdalla on mietitty tulisiko viitearvon olla korkeampi, jopa 200 µg/g. (Kolho 2012, 43.) Suoliston tulehduksellisessa tilassa kalprotektiinipitoisuus voi olla jopa kymmeniä tuhansia (Sipponen 2009, 34). Aivan pienillä lapsilla taso on viitearvoja korkeampi ja alle 1,5- vuotiaille määrittystä tulee käyttää vain tarkoin harkiten. Kalprotektiinipitoisuus ulosteessa voi kohota myös esimerkiksi tulehduskipulääkkeiden aiheuttamassa suolivauriossa, nuoruusajan suoliston polyyppien ilmaantumisessa tai aikuispotilailla karsinomaan liittyen, eikä näin ollen numeerisen arvon perusteella voi tehdä päätelmiä mahdollisesta taustasyystä. (Kolho 2012.)

## 4 VERTAILTAVAT TESTIMENETELMÄT

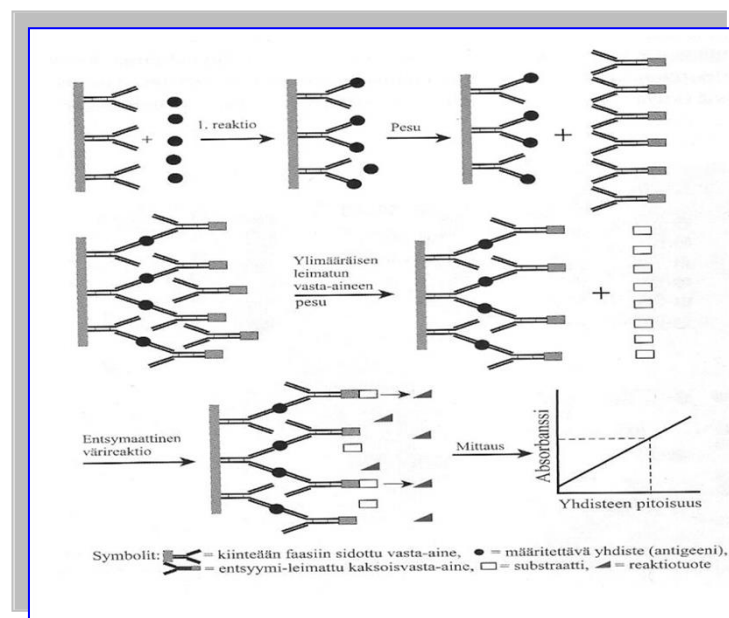
Opinnäytetyössä vertaillaan kolmea ulosteen kalprotektiinia mittaavaa vieritestä: Bühlmannin Quantum Blue:a, Orionin Certest:ä sekä PreventID CalDetect:ä referenssinämenetelmänä toimivaan Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin eli HUSLAB:n laboratorio polyklonaaliseen ELISA-menetelmään. Vieritestit perustuvat immunokromatografiseen menetelmään. Ennen varsinaista opinnäytetyön aloittamista tehtiin Bühlmannin Quantum Blue-testille kahden suspensioputken välinen käytettävyyssvertailu.

### 4.1 Vieritestaus

Arkikielen termiä pikatesti voidaan pitää väistyvänä vieritestitermin synonyyminä. Laadunvalvontapalveluja tuottavan Labquality Oy:n asiantuntijasuosituksen mukaan (2009) vieritutkimuksella tarkoitetaan yleensä sellaisia tutkimuksia, jotka suoritetaan pääasias-  
sa tavanomaisen laboratorioympäristön ulkopuolella potilaan vieressä, lähellä tai odottaessa, hoitoyksikön toimesta ja vastuulla. Vieritesteissä tulee soveltaa samoja laatuvaatimuksia kuin perinteisissä laboratoriotutkimuksissa, kuten näytteenotossa, näytteenkäsittelyssä, mittauslaitteen huollossa ja kalibroinnissa sekä tulosten sisäisessä ja ulkoisessa laadunarvioinnissa. Myös postanalyttiset tekijät tulee huomioida. (Ulkoiset laadunarviointi palvelut pika- ja vieritesteille, 2009.) Opinnäytetyössä käytetyissä vieritesteissä laadunvarmistus toteutuu vieritestien sisäisellä kontrollilla. Laadunvarmistus voidaan tehdä myös laitevalmistajan ulkoisella omalla positiivisella kontrollilla. Orionin Certest:illä sekä Bühlmannin Quantum Blue- vieritestillä oli omat laitevalmistajan positiiviset kontrolliliuokset, jotka testattiin käyttöohjeiden mukaisesti omilla testikaseteillaan.

## 4.2 Entsyymi-immunomenetelmä

Entsyymi-immunomenetelmissä (kuvio 2) (EIA, enzyme immunoassay) vasta-aineeseen tai antigeeniin on liitetty entsyymileima. Kun vasta-aineen ja antigeenin tasapaino on syntynyt ja ylimääräinen entsyymi poistettu reaktioseoksesta, lisätään siihen substraatti-  
liuosta, jonka entsyymi hajottaa fotometrisesti mitattavaksi yhdisteeksi. Detektointireak-  
tiota katalysoiva entsyymi voi olla sidottu vasta-aineeseen, jolloin puhutaan ELISA-  
tekniikasta (enzyme-linked immunosorbent assay). (Niemelä & Pulkki 2010, 84.) ELI-  
SA-  
menetelmä on heterogeeninen EIA-menetelmä, joka perustuu kaksoisvasta-aine  
tekniikkaan (Halonen 2004, 94).



KUVIO 2. Kaksoisvasta-aineeseen perustuvan ELISA-menetelmän periaate (Muokattu Halonen 2004, 95.)

HUSLAB käyttää ELISA-menetelmässään polyklonaalisia immunoglobuliineja, jotka kykenevät sitomaan erilaisia luonnossa esiintyviä ja synteettisiä yhdisteitä. Polyklonaalinen immunoglobuliini saadaan, kun vasta-aineita tuottava eläin immunisoidaan määritettävällä yhdisteellä ja se alkaa tuottaa useita erilaisia spesifisiä vasta-aineita. Näin syntyy vasta-aineseos eli polyklonaalinen vasta-aine, jossa antigeenin sitoutumispaikka poikkeaa toisistaan. (Halonen 2004, 90.)

### 4.3 Immunokromatografinen menetelmä

Immunokromatografinen menetelmä perustuu samanaikaisesti vapaan ja sitoutuneen yhdisteen erottamiseen nitroselluloosa- tai lasikuitukalvolla. Kalvossa on tyyny, johon on upotettuna värillisillä lateksi- tai kultapartikkeleilla leimattua vasta-ainetta tai antigeeniä. Näyte imeytetään kasetin tyynyyn, josta näytteen mitattava antigeeni tai vasta-aine sitoutuu konjugaattiin, muodostaen immunokompleksin, joka kulkeutuu detektioalueelle. Detektioalueella immobilisoitunut eli kiinnitetty vasta-aine tai antigeeni pysäyttää immunokompleksin kulun muodostaen positiivisen värillisen viivan detektioalueelle. (Halonen 2004, 100.)

### 4.4 Bühlmann Quantum Blue-vieritesti

Bühlmann Quantum Blue-testimenetelmä on tarkoitettu ulosteen kvantitatiiviseen kalprotektiinin määrittämiseen. Menetelmä perustuu immunokromatografiseen kaksoisvasta-ainetekniikkaan, jossa erillinen optinen lukija (kuva 1) mittaa testikasetilta testiviivan intensiteetin perusteella näytteen kalprotektiinipitoisuuden. Testin määritysraja on 100  $\mu\text{g/g}$ , jonka ylittävän tuloksen lukijalaite antaa numeerisesti 1800  $\mu\text{g/g}$  asti.



KUVA 1. Bühlmann Quantum Blue-testin optinen lukija (Kuva: Satu Tervo 2012)

Testi perustuu selektiiviseen immunologiseen kaksoisvasta-ainetekniikkaan, joka on monoklonaalinen menetelmä. Testin membraani on päällystetty kalprotektiinille spesifillä monoklonaalisilla sidotulla vasta-aineella. Toinen monoklonaalinen vasta-aine on konjugoitunut kultakolloidi, joka esiintyy vapaana kolloidina näytetyynyllä. Reaktio tapahtuu näytetyynyllä, kun siihen lisätään uutოსliuosta, johon on vapautunut näytteestä kalprotektiiniantigeeniä. Antigeeni sitoutuu kultakolloidilla päällystettyyn vasta-aineeseen. Yhdisteen kulkeutuessa membraanilla, sitoutuu antigeeni-vasta-



ainekompleksi päällystettyyn vasta-ainemembraaniin muodostaen näyateviivan, loput vapaana olevat konjugoituneet antigeenit sitoutuvat membraaniin sidottuun eläinperäiseen vasta-aineeseen muodostaen kontrolliviivan. Kontrolliviiva vahvistaa sen, että testi on toiminut ja suoritettu oikein. Testipakkauksessa tulee mukana tarvittavat reagenssit, testikasetit ja kalibrointikortti. Laitetoimittaja toimitti vortex-sekoittajan, putkitelineet ja uutosputket sekä optisen lukijan. (Bühlmann Quantum blue 2011.) Lisäksi tarvittiin eri tilavuuksisia automaattipipettejä ja näiden kärkiä. sekä sekuntikello.

Ulostesuspensio valmistetaan muoviputkessa (kuva 2), jossa on valmiina metallinen sekoitusvieteri. Putken korkissa on näytekuppi, johon annostellaan ulostetta niin, että korkin näytekupissa on piripintaan näytettä. Tässä vaiheessa tulee huomioida, että näytettä laitetaan oikealle puolelle korkkia. Näytekorkki napsautetaan putken alaosaan kiinni ja putkeen pipetoidaan 3 ml uuttoliuosta (reagenssi 1). Suspensioputken yläpää suljetaan toisella korkilla ja vortexoidaan eli sekoitetaan niin, että uloste sekoittuu uuttoliuokseen. Sekoituksen jälkeen suspension annetaan seisoa 10 minuuttia. Seisottamisen jälkeen tehdään laimennos erilliseen puhtaaseen putkeen, johon pipetoidaan 1 ml laimennosliuosta (reagenssi 2) sekä 20 µl tehtyä ulostesuspensiota. Valmista laimennosta pipetoidaan testikasetin (kuva 2) näytekuoppaan 80 µl ja tulos voidaan mitata optisella lukijalla 15 minuutin kuluttua. Kokonaisuudessa testin tekemiseen menee noin 30 minuuttia. Reagenssiliuokset ja testikasetit säilyvät 2-8 °C pakkaukseen merkittyyn säilytyspäivämäärään asti. Liuosten, testikasettien ja näytteen tulee olla huoneenlämpöisiä, kun testiä aletaan suorittaa. (Bühlmann Quantum Blue 2009.)



KUVA 2. Bühlmann Quantum Blue testikasetit ja suspensioputki (Kuva: Satu Tervo 2012)

#### 4.5 Orion Certest-vieritesti

Orionin valmistama Certest- vieritesti on tarkoitettu ulosteen kalprotektiinin määrittämiseen. Certest on immunokromatografinen vieritesti, joka on ei-invasiivinen, mutta spesifinen menetelmä ihmisperäisen kalprotektiinin seulontaan. Certest on yhdistelmäkasettitesti, jolla saadaan tulos raja-arvoilla negatiivinen, positiivinen yli 50 µg/g ja positiivinen yli 200 µg/g. Testi luetaan visuaalisesti. (Orion Diagnostica Oy 2011.)

Testikasetin membraanin testiviivat on esipäällystetty vasta-aineella ja testityynyyn on esikuivattu ihmisperäistä kalprotektiinia sekä värillistä konjugaattia. Testin aikana tyynylle imeytetty näytesuspensio reagoi konjugaatin kanssa ja tämä seos siirtyy membraania pitkin kapillaarivirtauksen avulla näytealueelle. Positiivinen tulos näyttäytyy punaisena viivana, kun spesifinen vasta-aine membraanissa vangitsee värillisen konjugaatin. Näytteen jatkaessa matkaa immobilisoitunut vasta-aine kiinnittyy kontrolliviivaan muodostaen vihreän värillisen viivan. Kontrolliviivan muodostuminen vahvistaa sen, että testi on toiminut ja suoritettu oikein. (Certest Biotec 2011.)

Testipakkauksessa tulee mukana Certest:n omat ulostesuspension valmistusputket (kuva 3), joissa on valmiina uuttoliuos. Putken näytteenottotikku kierretään putkesta irti ja upotetaan ulosteeseen niin, että tikussa olevat hahlot täyttyvät ulostenäytteestä. Näytetikkua kierretään takaisin kiinni uuttoputkeen ja ravistellaan voimakkaasti, jotta uloste sekoittuu nesteeseen. (Orion Diagnostica Oy 2011.)



KUVA 3. Orion Certest testikasetti sekä suspensioputki (Kuva: Satu Tervo 2012)

Orionin Certest:n kasettitestissä (kuva 3) on kaksi erillistä testi-ikkunaa näytekaivoineen. Kumpaankin näytekaivoon pipetoidaan puristamalla suoraan ulostesuspensioputkesta 4 tippaa suspensiota (100 µl) ja tulos on luettavissa 10 minuutin kuluttua. Tulos on negatiivinen sen ollessa alle 50 µg/g ja testiviivaa ei muodostu detektioalueelle. Testikasetti antaa positiiviselle tulokset yli 50µg/g (alle 200 µg/g) tai yli 200 µg kalprotektiinia grammassa ulostetta. Avaamaton testikasettipussi sekä ulostesuspensioputki säilyvät 2-30 °C:ssa pakkauksessa määritettyyn säilyvyyspäivämäärään asti. (Orion Diagnostica Oy 2011.)

#### **4.6 PreventID CalDetect-vieritesti**

PreventID CalDetect-testi on ulosteen kalprotektiinin määrittämiseen tarkoitettu semi-kvantitatiivinen vieritesti, joka perustuu immunokromatografiseen menetelmään. CalDetect-testin määrittämissrajat ovat negatiiviselle näytteelle 0 tai alle 15 µg/g, hieman kohonnut 15-60 µg/g sekä selkeästi positiivinen tulos, kun pitoisuus on yli 60 µg/g. Testi luetaan visuaalisesti. (Preventis GmbH 2009.)

Testikasetti pitää sisällään kolme testiviivaa ja yhden kontrolliviivan. Kalprotektiinin mittaaminen perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan, jossa käytetään monoklonalisia vasta-aineita. Vasta-aineet on yhdessä kiinnitetty testikasetissa olevaan nitroselluloosakalvoon kolmen testiviivan kohdalle, jotka ovat määrättyä etäisyydellä toisistaan. Vastakkainen vasta-aine on kolloidinen kultakonjugaatti, joka liukenee uutostuotteen ja reagoi läsnä olevan kalprotektiinin kanssa. Yhdessä ne muodostavat kompleksin, joka liikkuu kapillaari-ilmiön avulla nitroselluloosakalvolla. Testialueella kalprotektiini-anti-kalporotektiini-konjugaatti reagoi anti-kalprotektiini-vasta-aineseokseen. Testialueelle muodostuu näkyvät viivat, riippuen kalprotektiinin pitoisuudesta. Tästä syystä kalprotektiinin pitoisuuden arvioiminen on semi-kvantitatiivinen tutkimus. Nitroselluloosakalvoon on lisätty myös päällystettyä spesifistä anti-immunoglobuliini vasta-ainetta, joka näyttääyntyä kontrollialueella testiviivana, osoittaen testin toimivuuden ja että testi on suoritettu oikein. ( Preventis test principle 2013.)

Testipakkauksessa tulee mukana CalDetect:n omat ulostesususpension valmistusputket (kuva 4), joissa on valmiina uuttoliuos. Putken näytteenottotikku kierretään putkesta irti ja upotetaan ulosteeseen niin, että tikussa olevat hahlot täyttyvät ulosteesta. Näytetikku kierretään takaisin kiinni putkeen ja ravistellaan voimakkaasti, jotta uloste sekoittuu nesteeseen. (Preventis GmbH 2009.)

Testi on yksinkertainen kasettitesti (kuva 4), jossa ulostesuspensiota puristetaan putkesta 3 tippaa kasetin näytekaivoon ja tulos on luettavissa 10 minuutin kuluttua. Tulos on negatiivinen (alle 15 µg/g) ja positiivinen mikäli tulos on 15-60 µg/g tai yli 60 µg kalprotektiinia grammassa ulostetta. Testissä on myös sisäinen kontrolli, joka osoittaa testin toimivuuden. Avaamaton testikasettipussi sekä ulostesuspensioputki säilyvät 4-30 °C:ssa pakkauksessa määritettyyn säilyvyys päivämäärään asti. (Preventis GmbH 2009.)



KUVA 4. PreventID CalDetect testikasetti sekä suspensioputki (Kuva: Satu Tervo 2012)

## 5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla Bühlmann Quantum Blue-, Orion Certest- sekä PreventID CalDetect- vieritesteistä saatuja tuloksia ja tulosten yhteneväisyyttä HUSLABin polyklonaaliseen ELISA- referenssimenetelmään. Ennen varsinaista käytännöntyön aloitusta vertailtiin Bühlmann Quantum Blue-testin kahta suspensioputkea, niiden käytettävyyttä ja analyyttistä laatua.

Tutkimuksen tavoitteena on tuottaa tietoa, jota voidaan hyödyntää vieritestimenetelmän valinnassa. Tutkimuksessa vertaillaan eri menetelmillä saatuja tuloksia, käyttöominaisuuksia, tulosten tulkintaa ja läpimenoaikaa. Vieritesteistä tullaan valitsemaan Keski-Suomen sairaanhoitopiirin käyttöön ominaisuuksiltaan paras testi, jolla toivotaan saavan nopeasti luotettavia tuloksia ulosteen kalprotektiinipitoisuuksista vaadittavalla määritysalueella.

Tutkimuskysymykset:

Määritysmenetelmän arviointi:

- Kuinka testi soveltuu käyttötarkoitukseen?
- Millainen vieritestin mittausalueen luettavuus on?
- Onko vieritestien tulostasoa yhteneväinen referenssimenetelmään?

Tekninen suoritus:

- Minkälainen vieritesti on suorittaa?
- Kuinka kauan vieritestin suorittaminen vie aikaa?
- Minkälainen on näytteiden ja reagenssien esikäsitely sekä kuinka ne säilytetään?

## 6 TUTKIMUSMENETELMÄ JA AINEISTONKERUU

### 6.1 Tutkimusmenetelmä

Vieritestien vertailussa käytetään kvantitatiivista tutkimusotetta. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa asioita kuvataan numeeristen suureiden avulla ja tuloksia voidaan havainnollistaa taulukoilla ja kuvioilla. Usein tutkitaan myös eri asioiden välisiä riippuvaisuuksia tai tutkittavassa ilmiössä tapahtuneita muutoksia. Otoksoon pitää olla riittävän suuri ja edustava, jotta sen perusteella voidaan tehdä yleistyksiä tutkittavasta ilmiöstä. (Heikkilä 2008, 16.) Hirsjärven, Remeksen ja Sajavaaran (2009) määritelmän mukaan perussääntönä on, että mitä tarkemmin otoksen avulla saatujen tulosten halutaan vastaavan perusjoukon lukuja, sitä suurempi otos on oltava. Opinnäytetyössämme aineiston tulokset kuvattiin korrelaatiokuvaajien ja frekvenssitaulukoiden avulla.

### 6.2 Aineistonkeruu

Aineisto koostui potilailta saaduista ulostenäytteistä, jotka testattiin kolmella vieritestillä: Orionin Certest:llä, PreventID CalDetect:llä ja Bühlmann Quantum Blue:lla sekä lähetettiin analysoitavaksi HUSLABin laboratorioon, jossa on käytössä ELISA-menetelmä. Otos koostui 35 ulostenäytteestä, jotka tulivat kalprotektiinipyynnöllä (F-Calpro) sekä sairaalan sisältä että maakunnista Keski-Suomen sairaanhoitopiirin laboratorioliikelaitoksen (KESLAB) laboratorioon. Ulostenäytteet jaettiin kahteen osaan, joista alkuperäisillä F-Calpro pyynnöllä oleva näyte lähetettiin HUSLABin normaalin käytännön mukaisesti ja toinen osa ulostenäytteestä varattiin omiin vieritesteihin.

Näytteiden lukumäärä määräytyi käytettävissä olevien testipakkausten mukaan, joita oli käytössä jokaisella testimenetelmällä 40 kappaletta. Tuloksia saatiin yhteensä 35 kustaakin testimenetelmästä. Muutama testi käytettiin kontrolleihin sekä harjoituskappaleina.

Näytteenantajat olivat saaneet ohjeistuksen ja välineet näytteenantoon tutkimuksen pyytävästä yksiköstä. KESLABin potilasohjeen (2012) mukaisesti ulostetta otettiin kaarimaljaan tai vastaavaan astiaan (näytteeksi ei sovi WC-altaasta otettu näyte), josta siirret-

tiin peukalonpään kokoinen nokare ulostetta näytepurkkiin. Näytepurkki suljettiin huolellisesti ja purkkiin merkittiin henkilötiedot sekä näytteenottopäivämäärä. Tutkittavan ei tarvinnut noudattaa erityistä ruokavaliota. Näyte pyydettiin toimittamaan samana tai viimeistään seuraavana päivänä laboratorioon. (Keski-Suomen sairaanhoitopiiri 2012.)

Teoriaosuuteen aineistoa kerättiin tutkimalla erilaisia tietokantoja internetissä, kirjoja, lehtiartikkeleita, tutkimuksia sekä laitevalmistajien tuottamia materiaaleja. Teoriatiedon keruussa hyödynnettiin monipuolisia lähteitä, joista valittiin sopivat materiaalit varsinaiseen opinnäytetyöhön.

### 6.3 Aineiston analyysimenetelmät

Tutkimustulokset analysoitiin käyttämällä Microsoft Excel-tilastointiohjelmaa. Tulosten vertailemisessa käytettiin korrelaatio- ja regressioanalyysia, jotka kytkeytyvät toisiinsa. Regressioanalyysi on korrelaatioanalyysia tarkempi, mutta molemmat menetelmät edellyttävät muuttujilta jatkuvuutta ja muuttujien on oltava vähintään välimatkaasteikolla. (Kananen 2011, 108.) Tulos ilmaistaan Pearsonin korrelaatiokertoimen neliönä ( $r^2$ ) (KvantimoTv 2004). Korrelaatiokerroin muodostuu vähintään kahden muuttujan välisestä riippuvuudesta toisiinsa nähden. Korrelaatiokerroin merkitään  $r$ :llä tulos- taulukkoon. Mitä lähempänä kertoimen  $r$  arvo on arvoa +1 tai -1 sitä voimakkaampaa riippuvuus on muuttujien välillä. Lähellä nollaa oleva  $r$ :n arvo kertoo, ettei tilastollista riippuvuutta esiinny muuttujien välillä. (Opetushallitus, 2012.) Regressioanalyysi edellyttää muuttujilta samat lähtöedellytykset kuin korrelaatioanalyysi, joten regressioanalyysia voidaan pitää korrelaatioanalyysin jatkoanalyysinä. Korkea  $r$ :n arvo kuvaa voimakasta riippuvuutta ja regressioanalyysi selvittää riippuvuuden tarkempaa matemaattista muotoa. Regressiosuoraa merkitään  $r^2$ -arvolla. Jos  $r^2$ -arvo on 1, suora kulkee havaintoaineiston jokaisen  $xy$ -pisteen kautta eli suoran selitysaste on tällöin 100 %. Selitysaste on hyvä  $r^2$ -arvon ollessa 0,5-1,00. Merkintä  $r^2=0,65$  tarkoittaa, että regressiosuora pystyy selittämään 65 % residuaalista eli jäännösarvosta. (Kananen 2011, 112.) Opinnäytetyössä hyödynnettiin Microsoft Excel-tilastointiohjelman automaattista korrelaatiokertoimen laskentakaavaa. Tutkimustuloksia havainnollistettiin kuvaajien ja frekvenssitaulukoiden avulla sekä hyödynnettiin Pearsonin korrelaatiokertoimen neliötä.. Kunkin vieritestin tulostasoa verrattiin HUSLABin tuloksiin.

## 7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyön käytännönoisuus suoritettiin 25.4–10.7.2012 välisenä aikana. Vieritesteihin käytettiin tuoretta ulostetta. Testien vertailu suoritettiin samana päivänä, kun näyte saapui laboratorioon sekä tutkittavat ulostenäytteet lähetettiin saman päivän aikana HUSLABin laboratorioon, jossa näytteet analysoitiin heidän oman käytännön mukaisesti.

Ennen varsinaista vieritestien vertailua vertailtiin Bühlmann Quantum Blue-testin kahden suspensioputken käyttöominaisuuksia, tuloksia, sekä testin läpimenoaikaa. Valitsemamme suspensioputki oli käyttöominaisuuksiltaan hieman monimutkaisempi, mutta putkien välisten testien suorittamiseen kuluneen ajan välillä ei ollut eroa. Valitun suspensioputken tulokset korreloivat paremmin referenssimenetelmänä toimivan Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorion tuloksiin verrattuna, jonka perusteella valittiin testissä käytettävä suspensioputki.

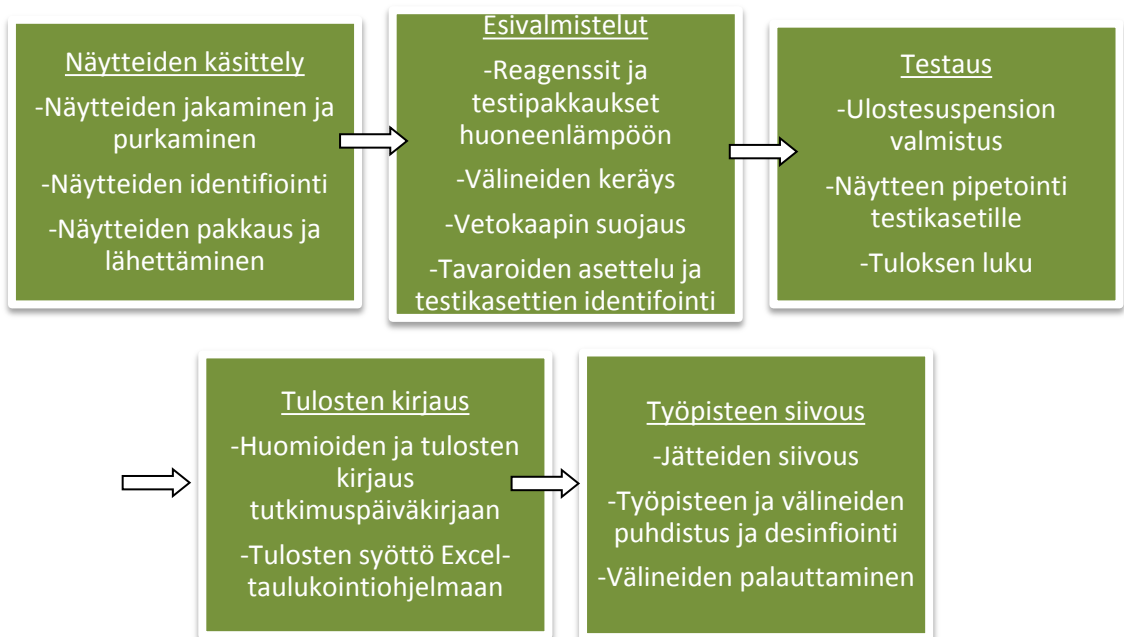
Aluksi vertailut suoritettiin siten, että toinen tutkijoista teki kaikki vaiheet ja toinen kirjoitti huomioita muistiinpanoihin sekä otti aikaa. Testisarjan alku tehtiin vieritesti kerrallaan, jotta saatiin jokaiselle testille oma läpimeno aikansa. Tämän jälkeen aikaa säästääksemme teimme testejä limittäin. Molemmat tekivät kaikkia testejä, jotta saatiin käyttökokemuksia kahdelta eri käyttäjältä. Vertailuja tehtiin iltapäivisin laboratorion vetokaapissa ulosteen kalprotektiini näytteiden saavuttua laboratorioon. Testaukset ajoitettiin harjoittelujaksolle sekä kesätyön ajalle KESLABssa.

Ennen jokaista määrittystä otettiin hyvissä ajoin tarvittavat reagenssit ja vieritestit huoneenlämpöön. Niiden lämmitessä kerättiin vetokaappiin tarvittavat välineet sekä jaettiin ja identifioitiin näytteet. Tiedossa oli alkuperäisen näytteenantajan henkilötiedot, jotta HUSLABin tulokset voitiin yhdistää omassa järjestelmässä käytössä olevaan juoksevaan numerointiin. Juoksevaa numerointia käytettiin, jotta potilaan henkilöllisyys ei paljastuisi tuloksia käsiteltäessä. Vieritestien vertailun yhteydessä ulostenäytteiden esikäsittely suoritettiin valmistajien ohjeiden mukaisesti, jonka jälkeen testaukset tehtiin vieritestien työohjeiden mukaisesti.



Ulostenäytteiden käsittely ja vieritestien vertailu tapahtui vetokaapissa. Bühlmann Quantum Blue-testin tulokset luettiin viereisellä pöydällä testinlukulaitteen koon vuoksi. Työskennellessä käytettiin kertakäyttökäsineitä sekä vetokaappi suojattiin suoja-liinoin, lopuksi mahdolliset roiskeet pyyhittiin vetokaapista sekä käytössä olleista välineistä. Kaikki pinnat ja välineet desinfiointiin lopuksi. Koko tutkimuksen ajan huomioitiin näytteiden laatu sekä aseptinen työote.

Vieritestien tulokset kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan, josta tulokset siirrettiin ATK-lle Microsoft Excel-taulukointiohjelmaan (Liite 1.) . Microsoft Exceliin kootuista kalprotektiinipitoisuuksista tehtiin korrelaatiokuvaajat ja frekvenssikuvaajat, joita hyödynnettiin tulosten tulkinnessa. (kuvio 3.) Lisäksi koko tutkimuksen ajan kirjattiin ylös tutkimuspäiväkirjaan vieritestien käyttöominaisuuksia ja muita huomioita.



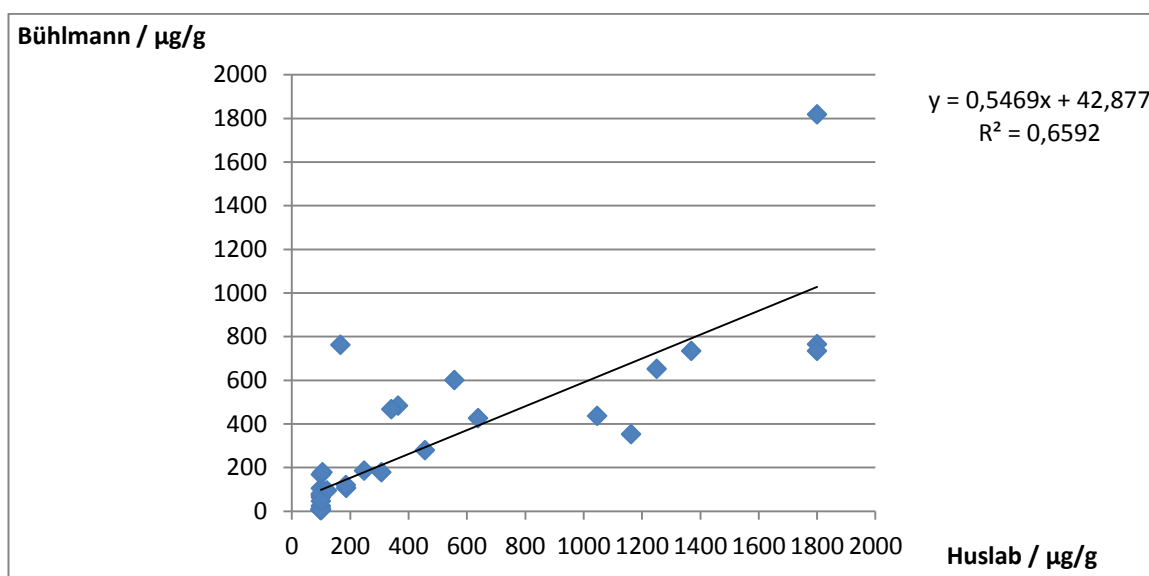
KUVIO 3. Testausprosessin kulkukaavio

## 8 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Opinnäytetyössä verrattiin jokaista vieritestimenetelmää referenssimenetelmänä toimivaan HUSLABin polyklonaaliseen ELISA-menetelmään. Tuloksia tarkasteltiin korrelaatiokuvaajien sekä frekvenssitaulukoin, joiden avulla vertailtiin saatuja tuloksia ja tulosten yhtenevääisyyttä toisiinsa.

### 8.1 Bühlmann Quantum Blue

Bühlmann Quantum Blue-testi korreloi pienillä, alle 200 µg pitoisuuksilla ELISA menetelmällä saatujen tulosten kanssa. Suuremmilla pitoisuuksilla alkoi esiintyä sirontaa frekvenssisuoran ympärille. Bühlmann Quantum Blue-testin ja ELISA-menetelmällä saatujen tulosten Pearsonin korrelaatiokertoimen neliö oli  $r^2 = 0,6592$ . Tämä tulos kertoo, kuinka paljon hajontaa esiintyy vertailtavien tulosten välillä, tässä tapauksessa Bühlmann Quantum Blue-testin tulokset selittävät noin 66 % tulosten hajonnasta (kuvio 4). Esimerkiksi jos  $r^2 = 0,54$  sanotaan, että selittävä muuttuja selittää 54 % selitettävän muuttujan hajonnasta (KvantimoTv 2004). Selitysaste on hyvä  $r^2$ -arvon ollessa 0,5-1,00 (Kananen 2011, 112) eli Bühlmann Quantum Blue-testi korreloi hyvin referenssimenetelmän kanssa.



KUVIO 4. Bühlmann Quantum Blue tulosten vertaaminen ELISA-menetelmään

Bühlmann Quantum Blue-testissä alamääritysrajana on 100 µg/g ja se voi mitata pitoisuuden 1800 µg/g asti. Tulos tulee numeerisesti lukijalaitteelle, joka mittaa tuloksen optisesti testikasetilta. Tutkimuksen suoritus oli hyvin monivaiheinen ja haastava. Bühlmann Quantum Blue-testiin tarvittiin testipakkauksen sisältämien testikasettien ja reagenssien lisäksi useita eri tilavuuksia sisältäviä pipettejä, niiden kärkiä, laimennosputkia, vortex-sekoitin, putkitelineitä sekä mittauslaite. Tämä testi vei aikaa noin puoli tuntia, kaikkine työvaiheineen ja sitoo yhden työntekijän lähes koko testin suoritus ajaksi. Bühlmann Quantum Blue-testin monivaiheisuuden sekä välineistön määrän vuoksi, koimme että tämän kaltaista testausta ei todennäköisesti ole mahdollista suorittaa osasto-olosuhteissa. Luotettavuuden saavuttamiseksi pipettien kalibrointi ja huolto täytyisi huolehtia ja testin suorittajan tulee suorittaa testi työohjeiden mukaisesti. Tämä voi osoittautua haastavaksi Bühlmann Quantum Blue-testissä, koska tekijän pitää muistaa sekä osata luotettavasti pipetoida eri tilavuuksia reagensseja valmistaessaan eri uuttoliuoksia näyteputkiin oman työnsä ohella, myös tarkka ajan seuranta voi koitua haasteeksi. Laboratorio-olosuhteissa voidaan Bühlmann Quantum Blue- vieritestillä tehdä näytesarjoja, jos näytteitä on kerralla useampia. Mittauslaitteessa on ominaisuus, jolla tämä onnistuu kätevästi ja tutkimuksen suorittamiseen käytettävää kokonaisaikaa saadaan pienennettyä. Bühlmann Quantum Blue-vieritestin lukija on myös mahdollista liittää ATK:lle.

## 8.2 Orion Certest

Orion Certest:n tulokset vastaavat hyvin ELISA-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Muutamia virheellisiä tuloksia tuli Orionin Certest:llä yli 50 µg/g. Kuviossa harmaalla alueella olevat tulokset ovat vertailukelpoisia tuloksia, jotka vastaavat korrelaatio-suoraa esimerkiksi Certest:llä on saatu yli 50 µg/g omaavia tuloksia seitsemän (7) kappaletta, myös ELISA-menetelmä antoi vastaavan tuloksen. Testissä on kolme tasoa: negatiivinen, yli 50 µg/g sekä yli 200 µg/g (kuvio 5).

Certest/ $\mu\text{g/g}$		HUSLAB/ $\mu\text{g/g}$		
	neg	yli 50	yli 200	
yli 200	0	3	10	
yli 50	1	7	3	
neg	10	1	0	

KUVIO 5. Orion Certest tulosten vertaaminen ELISA-menetelmään

Orionin Certest:n uutesusension näytteenottotikku oli pidempi ja siinä olevat hahlot syvempiä, joka helpotti näytteen saamista näytteenottotikkuun, myös ulosteen koostumus vaikutti näytteen saantiin. Uutossuspensioputken pipettipään katkaiseminen oli helppo suorittaa, vaikka alussa ulostesusensiota saattoi roiskua vetokaappiin sekä käsillemme. Certest:n muoviputkesta oli helppo puristaa näytettä testikasetille, eikä tarvinnut voimaa juurikaan. Testikasetin mittausalue oli helppo lukuinen ja tulos luetaan visuaalisesti. Certest:llä pystytään seulomaan positiiviset potilastulokset, jos positiivisen määritysraja on yli 200  $\mu\text{g/g}$ . Testi antaa tuloksen yli 50  $\mu\text{g/g}$ , mutta onko tämä tulos kliinikolle merkitsevä, koska normaaliksi pitoisuusarvoksi on vakiintunut tällä hetkellä 100  $\mu\text{g/g}$ . Aikuisten kohdalla on mietitty pitäisikö raja-arvon olla 200  $\mu\text{g/g}$ . (Kolho 2012, 43.) Vieritesti oli yksinkertainen suorittaa ja mittausalue oli helppolukuinen. Tarvittavat välineet tuli testipakkauksen mukana, lukuun ottamatta sekuntikelloa. Testi sopii hyvin suoritettavaksi hoitoyksikön toimesta, välittömästi potilaan läsnä ollessa.

### 8.3 PreventID CalDetect

PreventID CalDetect-testi vastasi hyvin ELISA-menetelmän tuloksia. Vain muutama tulos ei ollut vertailukelpoinen ELISA-menetelmällä saatuun tulokseen. Kuviossa harmaalla alueella olevat tulokset ovat vertailukelpoisia tuloksia, jotka vastaavat korrelaatiosuoraa. Esimerkiksi CalDetect:llä saatiin kaksi (2) alle 15  $\mu\text{g/g}$  tulosta, samoin ELISA-menetelmällä. CalDetect- testissä on kaksi negatiivisen tuloksen aluetta (negatiivinen ja alle 15  $\mu\text{g/g}$ ) sekä kaksi positiivisen tuloksen aluetta (15-60  $\mu\text{g/g}$  ja yli 60  $\mu\text{g/g}$ ) (kuvio 6).

CalDetect / $\mu\text{g/g}$ 

yli 60	0	0	0	24
15-60	0	0	1	0
alle 15	0	2	0	0
neg	4	3	1	0

neg (alle 5)    alle 15    15-60    yli 60    HUSLAB /  $\mu\text{g/g}$

KUVIO 6. PreventID CalDetect tulosten vertaaminen ELISA-menetelmään

PreventID CalDetect:ssä oleva näytteenottotikku oli lyhyehkö ja siinä olevat hahlot olivat suhteellisen pinnallisia, joka vaikeutti ulosteen saamista näytteenottotikkuun, myös ulosteen koostumus vaikutti näytteen saantiin. Uutossuspensioputken pipettipään katkaiseminen oli myös työlästä ja vaati voimaa. Aluksi katkaisun yhteydessä ulostesuspensiota roiskui vetokaappiin sekä käsille, ennenkuin oikea katkaisutekniikka oli hallussa. CalDetect-vieritestin muoviputken materiaali oli jäykempää puristaessa näytettä testikasetille. Testikasetin mittausalue oli suhteellisen helppo lukea, josta tulos luetaan visuaalisesti. Onnistuneesti suoritettuun testiin kehittyi mittausalueelle yhdestä neljään viivaa, joten tulkinnassa pitää tietää mitä nämä viivat merkitsevät. PreventID CalDetect:n kohdalla täytyy miettiä onko positiivisen määrittäjäraja liian matala. Normaaliksi pitoisuusarvoksi on vakiintunut  $100 \mu\text{g/g}$ , mutta aikuisten kohdalla on mietitty pitäisikö raja-arvon olla  $200 \mu\text{g/g}$  (Kolho 2012, 43). Näillä raja-arvoilla CalDetect:n positiivisen tuloksen raja-arvot ovat  $15\text{--}60 \mu\text{g/g}$  ja yli  $60 \mu\text{g/g}$ , jotka ovat siis liian matalat. Tämän seurauksena saataisiin vääriä positiivisia tuloksia. Vieritesti oli yksinkertainen suorittaa ja melko helppolukuinen. Tarvittavat välineet tulivat testipakkauksen mukana, lukuun ottamatta sekuntikelloa. Testi sopii hyvin suoritettavaksi hoitoyksikön toimesta, välittömästi potilaan läsnä ollessa.

## 8.4 Yhteenveto

Käyttöominaisuuksiltaan Orionin Certest:n ja PreventID CalDetect:n välillä ei juurikaan ollut eroa. Molemmat olivat yksinkertaisia suorittaa ja tulokset luetaan visuaalisesti mitausalueelta. Certest oli hieman helpompi tulkita, mutta molemmat olivat helppolukuisia. Suorittamiseen käytettävä aika oli molemmissa noin 12 minuuttia (riippuen ulosteen liukenemisestä uutოსliuokseen), jossa 10 minuuttia odotusaikaa tulosviivan kehittymiseksi. Molemmat vieritestit soveltuvat suoritettavaksi hoitoyksikössä ja testikasetit voidaan säilyttää huoneenlämmössä

Bühlmann Quantum Blue- vieritesti sisälsi useita tarkkuutta vaativia työvaiheita. Aikaa testin suorittamiseen kului noin 30 minuuttia, joka sitoo työntekijän lähes koko testin suorittamisen ajaksi, jonka vuoksi testi soveltuisi suoritettavaksi laboratorioolosuhteissa. Lisäksi tuloksen lukuun tarvitaan oma laite, joka lukee tuloksen testikasetilta optisesti. Testissä tarvittavat reagenssit ja kasetit tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa.

Certest:n määrittäysrajat negatiivinen, yli 50 µg/g tai yli 200 µg/g ovat käyttökelpoisemmat verrattuna PreventID CalDetect:n määrittäysrajoihin negatiivinen, alle 15 µg/g, 15–60 µg/g tai yli 60 µg/g, koska normaaliksi pitoisuusarvoksi on vakiintunut 100 µg/g (Kolho 2012, 43). Näillä raja-arvoilla CalDetect:n määrittäysrajat ovat siis liian matalat, jonka seurauksena saataisiin väärää positiivisia tuloksia. Bühlmann Quantum Blue-testissä määrittäysrajana 100 µg/g ja se voi mitata pitoisuuden 1800 µg/g asti. Tällä testillä saadaan tarkkoja numeerisia arvoja, joiden perusteella potilaan tilaa on helpompi tulkita.

## 9 EETTISYYS

Etiikalla tarkoitetaan moraalikäsitteiden tarkastelua ja joskus ne voidaan sekoittaa toisiinsa. Tutkimustyössä eettisyydellä tarkoitetaan oikean tai väärän, hyväksyttävän tai tuomitun, hyvän tai pahan tarkastelua moraalista näkökulmasta. Tutkijan ammattietiikka käsittääkin erilaisten ohjeiden laatimista ja niiden periaatteiden noudattamista. (Pietarinen & Launis 2002, 42–43, 49.) Opinnäytetyössä noudatettiin Suomen Bioanalytikkoliiton määrittelemää eettistä ohjeistusta, jossa potilaan/asiakkaan hyvinvointi ja hänen oikeuksiensa kunnioittaminen ovat ensisijaisena tavoitteena bioanalytiikan toiminnassa laboratoriotutkimuksen kaikissa vaiheissa. Bioanalytikko sitoutuu noudattamaan salassapitovelvollisuutta ja näytteenotto sekä laboratoriotutkimusta varten hankitaan vain niiden suorittamisen kannalta olennainen tieto. Bioanalytikko käyttää hyväksytyjä menettelytapoja ja vastaa laboratoriotutkimuksen luotettavuudesta sekä laadusta tutkimuksen kaikissa vaiheissa näytteen luovuttajan oikeuksia ja yksityisyyttä kunnioittaen. (Bioanalytiikan, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet, 2006). Opinnäytetyössä huolehdittiin näytteiden luovuttajien yksityisyydestä ja potilassuojasta käsittelemällä näytteet anonyymisti ja identifioimalla ne juoksevilla numerojärjestyksellä, jolloin työn tuloksista ei voi päätellä kenenkään henkilöllisyyttä.

Tutkimuksen suorittamiseen tarvittiin tutkimuslupa, joka saatiin Keski-Suomen sairaanhoitopiirin tieteellisen tutkimustoiminnan yksiköstä. Sairaanhoitopiirin eettiseltä toimikunnalta ei tarvittu erillistä lupaa tutkimukseen, koska opinnäytetyössämme tuloksia käsitellään anonyymisti.

## 10 LUOTETTAVUUS

Opinnäytetyöprosessin luotettavuus taattiin hyvällä suunnittelulla ja toimimalla kaikissa vaiheissa työohjeiden mukaisesti. Etukäteen tehtiin tutkimussuunnitelma, johon oli alustavasti määritelty prosessin vaiheet sekä tutkimuskysymykset ja tavoitteet. Ennen käytännöntyön aloittamista kävimme ohjauksissa sekä saimme opinnäytetyön tilaajalta perehdytyksen tiloihin, välineisiin, määritettäviin pikatesteihin ja työskentelytapoihin. Bühlmann Quantum Blue- vieritettiin saimme käyttöopastuksen laitevalmistajan puolesta.

Työn alussa suunniteltiin valmiiksi taulukko ja identifiointijärjestelmä lähetettävälle näytteille, jotta tulokset pystyttiin kirjaamaan luotettavasti. Laadimme itsellemme työohjeet testivalmistajien ohjeiden pohjalta, näin saatiin selkeät ja yksityiskohtaiset ohjeet työskentelyyn. Englanninkielellä olevat työohjeet käännettiin Suomeksi helpottamaan työskentelyä. Työohjeet käytiin läpi vielä ennen testien suorittamista työelämän ohjaajan kanssa, jotta kaikki kohdat oli ymmärretty oikein. Kaikki vertailtavat vieritestit suoritettiin myös ohjaajan kanssa ennen varsinaisen näytesarjan testauksen aloittamista, näin pystyttiin vielä täsmentämään mahdollisia aukkokohtia työohjeissa. Aina testauksia suoritettaessa paikalla oli nimetty vastuuhenkilö, joka auttoi mahdollisissa ongelmatilanteissa.

Testit tehtiin aina työohjeen mukaisesti huoneenlämpöisillä välineillä, reagensseilla ja testikaseteilla. Testikasettien ja reagenssien käyttöaika oli tiedossa ja erämuutokset huomioitiin. Testauksissa testattavana oli tuore, pakastamaton näyte. Pipetit oli kalibroitu asianmukaisesti ja Bühlmann Quantum Blue- laitteella oli oma eränumeron mukainen kalibroitikortti, jolla kalibrointi suoritettiin aina ennen mittausarjan aloittamista. Tällä testillä oli myös olemassa omat kontrollinäytteet, jotka mitattiin eräkohtaisesti testikaseteilla ja -reagensseillä. Vieritestikaseteissa oli oma sisäinen kontrolli sekä Orionin Certestissä oli lisäksi oma positiivinen kontrolliliuos. Kaikki työvaiheet tehtiin huolellisesti työohjeiden mukaisesti koko testisarjan ajan sekä työskentelyssä huolehdittiin aseptiikasta.



## 11 POHDINTA

Kroonisten tulehduksellisten suolistosairauksien seurantaan tarvitaan nopea ja luotettava vieritestit kliinikon avuksi. Mittaamalla ulosteen kalprotektiinipitoisuutta voidaan selvittää helposti suoliston tulehdustilaa. Ulosteen kalprotektiini merkkiaineena soveltuu tulehduksellisen suolistosairauden ja toiminnallisen oireen erotusdiagnostiikkaan avohoidossa, kun normaali arvo poissulkee aktiivin inflammaation. Kvantitatiiviset vieritestit voisivat toimia IBD:ssä nopeana relapsin osoittajana, koska ELISA-testin tuloksissa on pitkä vastausviive. (Sipponen 2012.)

Tässä työssä verrattiin kolmea eri vieritestiä referenssimenetelmään, joka oli Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin polyklonaalinen ELISA-menetelmä. Tiedossa oli, että käyttöön halutaan ulosteen kalprotektiinia osoittava vieritesti, jolla saadaan luotettava tulos nopeasti. Hoitava lääkäri voi tämän vieritestituloksen perusteella tehdä alustavan hoitosuunnitelman ja potilas saa nopeampaa hoitoa.

Opinnäytetyön aikana tiedossa ei ollut tullaanko ulosteen kalprotektiinimääritys tekemään hoitavassa yksikössä vai laboratorion toimesta. Tämä näkökulma on otettu huomioon tuloksia tarkasteltaessa, koska olosuhteet vieritestin tekemiseen on hyvin erilaiset yksiköiden välillä. Tiedossa ei myöskään ollut, että mikä olisi riittävä tulostaso toimeksiantajalle, riittääkö semikvantitatiivinen tulos vai halutaanko saada tarkka numeerinen arvo. Vertailun perusteella voidaan todeta, että vieritestit korreloivat melko hyvin referenssimenetelmän kanssa negatiivisten poissulkemiseksi.

Vieritesteistä Bühlmann Quantum Blue oli haastavin tehdä, koska testi sisälsi useita pipetointeja ja uuttoja. Orionin Certest ja PreventID CalDeDetect olivat varsin yksinkertaisia kasettitestejä, jossa suurin haaste oli saada näytettä ulostesuspensioputkeen. Orionin Certestin uutesuspension näytteenottotikku oli mielestämme parempi kuin PreventisID CalDeDetect:ssä, koska se oli hieman pidempi ja siinä olevat hahlot olivat syvempiä. Pidemmällä tikulla ulostenäytettä on helpompi saada ulostenäytepurkista ja syvempien hahlojen ansiosta näyte tarttuu tikkuun paremmin. Uuttovaiheen jälkeen uutesuspension pipettipään korkki pitää katkaista, joka onnistui helpommin Certestin putkessa. CalDeDetectin uutesuspensioputken materiaalimuovi on kovempaa ja vaati suuremman voiman,

että sen sai katkaistua. Alkuvaiheen testeissä ulostesuspensioputken kärjen katkaisuvaiheessa tuli myös ulosteroiskeita vetokaappiin ja käsiin, mutta useampia testejä tehdessä opimme katkaisemaan korkin varovaisemmin. Näissä testeissä koimme myös ulosteen koostumuksen vaikuttavan näytemäärään ja kuinka sitä tarttuu tikkuun.

Olimme erittäin tyytyväisiä saamaamme opinnäytetyöaiheeseen. Koimme mielekkään aiheen ensimmäisenä motivoijana opinnäytetyötä tehdessä. Meille myös korostettiin tämän opinnäytetyön tärkeyttä sekä ajankohtaisuutta, joka lisäsi myös intoa työhön. Pääsimme tekemään konkreettista työtä opinnäytetyön eteen. Aihe tuntui hyvin rajatulta kokonaisuudelta, jonka vuoksi opinnäytetyötä oli helppo tehdä. Käytännöntyöosuus oli mielekästä ja vieritestien vertailu suoritettiin tasapuolisesti. Opinnäytetyön tekemistä hankaloitti näytteiden hidaskertyminen sekä näytteiden niukkuus. Näytteet oli useimmiten annettu potilasohjeistuksen mukaisesti, jossa 1 gramma näytettä riittää, mutta tämä määrä oli liian vähäinen jaettavaksi useampaan osaan. Ulostemäärän niukkuudesta johtuen myös näytteen saaminen ulostesuspensioputkeen oli hankalampaa kuin, jos näytettä olisi ollut enemmän. Mielestämme potilasohjeisiin tulee tehdä korjauksia, jos tällainen testi otetaan käyttöön, jotta näytetikku voitaisiin helpommin kastaa ulosteeseen. Opinnäytetyöprosessi opetti kuitenkin pitkäjänteisyyttä ja yhteistyötaitoja. Lisäksi opimme paljon tulehduksellista suolistosairauksista ja niiden tutkimisesta.

Kaikki vieritestit todettiin mahdollisiksi ottaa käyttöön. Valinta riippuu siitä, minkälainen tulos toimeksiantajalle on merkitsevä ja missä testi tullaan tekemään. Orionin Certest ja PreventID CalDetect vieritestit sopivat paremmin hoitoyksikön tehtäväksi, puolestaan Bühlmann Quantum Blue- vieritesti sopii hyvin tehtäväksi laboratorion puolesta. Kaikki testit vaativat perehdytyksen tekijälle. Bühlmann Quantum Blue-testin tekeminen vaatii erityistä ammattiosaamista.

Opinnäytetyön tekemisen aikana markkinoille on tullut uusia vieritestejä ulosteen kalprotektiinimääritykseen, joten jatkotutkimusaiheeksi ehdottaisimme näiden testien vertailua oman työmme tapaan. Vastaavaan vertailututkimukseen ehdotamme parempaa suunnittelua näytteiden keräämistavasta, jotta ulostemäärä olisi riittävä jaettavaksi useampaan testaukseen.

## LÄHTEET

Bühlmann Quantum Blue. 2011. Calprotectin High Range. Käyttömanuaali. Sveitsi.

Bühlmann Quantum Blue. 2009. Työohje.

Certest Biotect. 2011. Certest calprotectin 50+200. Käyttömanuaali.

Crohn ja Colitis Ry. 2012. Verkkosivut. Luettu 14.10.2012  
<http://www.crohnjacolitis.fi/cms/Taudin-kuvaus.24.0.html>

Färkkilä, M. professori. 2013. Haastattelu 28.1.2013. Haastattelija Haapoja, P. Studio55.fi.

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa: Penttilä, I. Kliiniset Laboratoriotutkimukset. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Hirsjärvi, S. Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy.

Jussila, A. Tarnanen, K. & Vuorio, A. 2011. Crohnin tauti. Luettu 8.10.2012.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=khp00101](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00101)

Kananen, J. 2011. Kvantti - Kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisusarja. Tampereen Yliopistopaino Oy-Juventus Print.

Keski-Suomen sairaanhoitopiiri. 2012. KESLAB. Potilasohje. Kalprotektiini.

Kolho, K-L. 2012. Ulosteen kalprotektiinimäärityksen käyttö kliinisessä työssä. Luento. Laboratoriolääketiedepäivät 2012. Helsinki.

KvantimoTv. 2004. Korrelaatio ja riippuvuusluvut. Luettu 15.4.2013.  
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>

Labquality. Ulkoista laadunarviointia pika- ja vieritesteille. 2008–2009. Labquality Oy. Esite.

Manz, M. Burri, E. Rothen, C. Tchanguizi, N. Niederberger, C. Rossi, L. Beglinger, C. & Lehmann F. 2012. BMC Gastroenterology. Biomed Central.

Mindemark, M. 2010. The use of laboratory analyses in Sweden. Uppsala Universitet.

Mustajoki, P. 2012. Haavainen paksusuolentulehdus (colitis ulcerosa). Luettu 8.10.2012. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00088](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00088)

Niemelä, O. & Pulkki, K. toim. 2010. Laboratoriolääketiede, kliininen kemia ja hematologia. Keuruu: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Niemelä, S. 2007. Tulehdukselliset suolistosairaudet. Teoksessa Höckerstedt, K., Färkkilä, M., Kivilaakso, E. & Pikkarainen, P. (toim.) Gastroenterologia ja hepatologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim

Opetushallitus. Tilastollisia menetelmiä. Riippuvuus. Luettu 17.12.2012. [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/tilastomatikka/korr\\_1.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/tilastomatikka/korr_1.html)

Orion Diagnostica Oy. 2011. Certest calprotectin- antigeenitesti kalprotektiinin osoittamiseen ulostenäytteestä. Luettu 6.3.2012. Tuoteseloste.

Pietarinen, J. & Launis, V. 2002. Etiikan luonne ja alueet. Teoksessa Karjalainen, S. Launis, S. Pelkonen, R. & Pietarinen, J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. Tampere: Tammer-Paino.

Preventis GmbH 2009. PreventID®CalDetect®. Tuoteseloste.

Preventis. Test principle PreveventID CalDetect. Käyttömanuaali. Luettu 18.2.2013.

Puhakka, M. 2012. Haavainen paksusuolen tulehdus (colitis ulcerosa) ja crohnin tauti. Teosessa Vauhkonen & Holmström. Sisätaudit.Helsinki:Sanoma Pro Oy.

Ruopuro, M-L. 2009. Menetelmävalidointi/laitevalidointi. Menettelytapaohje. KES-LAB. KSSHP. Laboratorioliikelaitos.

Sipponen, T. 2009. Noninvasive monitoring of activity on crohn`s disease. Department of Medicine Helsinki University Central Hospital Helsinki. Division of Gastroenterology. Väitöskirja.

Sipponen T. 2012. Ulosteen kalprotektiinimääritys-kliinikon näkemys. Luento. SKKYn ja Sairaalakemistit ry:n koulutuspäivät. 16.11.2012.

Sipponen, T. & Kolho, K-L. 2011. Ulosteen kalprotektiinipitoisuus tulehduksellisissa suolistosairauksissa. Katsaus. Duodecim 24/2011.

Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. 2006. Suomen Bioanalytikkoliitto Ry.

Ulosteen kalprotektiinipitoisuuden normaalistuminen ennustaa hyvää hoitovastetta tulehduksellisissa suolistosairauksissa. 2012. Kliininen tutkimus.

Vestergaar, T. A. Nielsen, S. L. Dahlerup, J. F. & Hornung, N. 2008. Fecal calprotectin: assessment of a rapid test. The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. Informa healthcare.

Vieritestaus terveydenhuollossa, Labqualityn asiantuntijasuositus. 2009, Moodi 2009 (6)

Vauhkonen, I. & Holmström, P. 2012. Sisätaudit. Helsinki:Sanoma Pro Oy.

**LIITTEET**

## Liite 1. Ulosteen kalprotektiinin vieritestien vertailutulokset

<b><u>F-calpro pikatestien vertailututkimus referenssimenetelmiin</u></b>					
<b>näytenro</b>	<b>Pvä</b>	<b>Bühlmann/ µg/g</b>	<b>Certest/ µg/g</b>	<b>CalDetect/ µg/g</b>	<b>HUSLAB/ µg/g</b>
1)	25.4.2012	Alle 100	neg.	neg.	Alle 5
2)	3.5.2012	Alle 100	Yli 50	Yli 60	63
3)	4.5.2012	457	Yli 200	Yli 60	279
4)	4.5.2012	Yli 1800	Yli 200	Yli 60	765
5)	7.5.2012	364	Yli 200	Yli 60	483
6)	8.5.2012	Alle 100	neg.	neg.	10
7)	8.5.2012	Alle 100	Yli 50	15-60	24
8)	8.5.2012	248	Yli 200	Yli 60	185
9)	8.5.2012	1251	Yli 200	Yli 60	651
10)	9.5.2012	Alle 100	Yli 50	Yli 60	104
11)	9.5.2012	Alle 100	neg.	neg.	Alle 5
12)	10.5.2012	Alle 100	neg.	neg.	Alle 5
13)	10.5.2012	Alle 100	neg.	neg.	8
14)	11.5.2012	1163	Yli 200	Yli 60	352
15)	11.5.2012	639	Yli 200	Yli 60	426

16)	14.5.2012	1047	Yli 200	Yli 60	436
17)	14.5.2012	187	Yli 200 / 50	Yli 60	105
18)	16.5.2012	Alle 100	Yli 50	Yli 60	72
19)	21.5.2012	186	Yli 200	Yi 60	119
20)	22.5.2012	557	Yli 200	Yli 60	600
21)	23.5.2012	1369	Yli 50	Yli 60	733
22)	23.5.2012	Alle 100	neg.	neg.	7
<del>23)</del>	<del>23.5.2012</del>	<del>400 µg/g</del>	<del>Yli 200 µg/g</del>	<del>Yli 60 µg/g</del>	
24)	23.5.2012	Yli 1800	Yli 200	Yli 60	734
25)	23.5.2012	Alle 100	neg.	Yli 60	167
26)	4.6.2012	Alle 100	Yli 50	Yli 60	79
27)	20.6.2012	Alle 100	neg.	neg.	9
28)	27.6.2012	Alle 100	neg.	alle 15	10
29)	28.6.2012	Alle 100	neg.	neg.	Alle 5
30)	2.7.2012	341	Yli 50	Yli 60	467
31)	2.7.2012	Yli 1800	Yli 200	Yli 60	1818
32)	4.7.2012	307	Yli 200	Yli 60	178
33)	5.7.2012	121	Yli 50	Yli 60	94
34)	10.7.2012	Alle 100	neg.	neg.	46
35)	10.7.2012	105	Yli 50	Yli 60	177
36)	20.7.2012	167	Yli 50	Yli 60	762

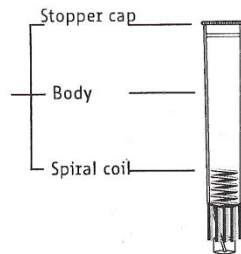
(Tarvainen & Tervo 2012)

## Liite 2 Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttöopas

### Contents

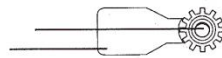
50 Tubes

Tube



50 Base caps

Sample chamber  
Tag

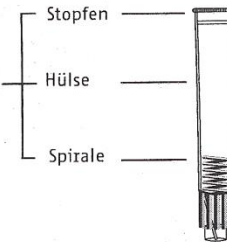


10 x 5 Spatulas

### Inhalt

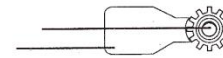
50 Gefässe

Gefäß



50 Böden

Dosierkammer  
Lasche

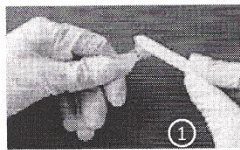


10 x 5 Spatel

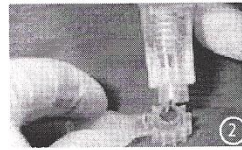
Also required: extraction buffer - B-CAL-EX, included in the respective Calprotectin kit

Zusätzlich erforderlich: Extraktionspuffer - B-CAL-EX, im entsprechenden Calprotectin Kit enthalten

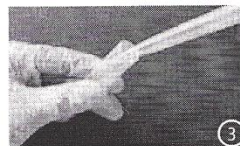
### Preparation of sample



Carefully press the faeces sample into the hollow cavity in the base cap and level off the surface.



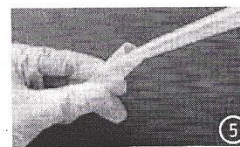
Firmly press the tube onto the base cap and detach the tag.



Remove the stopper cap and add 4 ml of extraction buffer (B-CAL-EX).



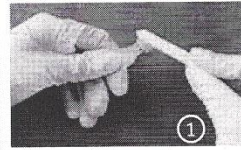
Carefully re-cap the tube and homogenize the sample for 1 min using a vibration mixer (e.g. Vortex mixer) until no large particles can be seen.



For further sample processing and dilution refer to the instruction for use of the respective Calprotectin kit.

**Please note:** Faeces samples hard in consistency should be allowed to stand with the buffer for some time before homogenization. 10-15 minutes is usually sufficient.

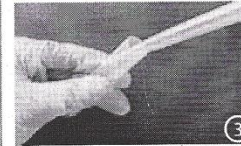
### Probenvorbereitung



Stuhlprobe vorsichtig in die Dosierkammer des Bodens eindrücken; glattstreichen.



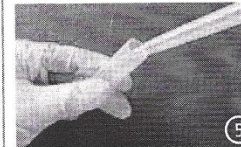
Hülse fest auf den Boden aufdrücken, Lasche abreißen



Den Stopfen entfernen und 4 ml Extraktionspuffer (B-CAL-EX) dazu pipettieren.



Gefäß mit Stopfen wieder gut verschliessen und mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z.B. Vortex) den Stuhl homogenisieren bis keine größeren Partikel mehr erkennbar sind (ca. 1 Min).



Für die weitere Probenvorbereitung konsultieren Sie die Arbeitsanleitung des entsprechenden Calprotectin Kits.

**Hinweis:** Harte Stuhlproben vor dem Homogenisieren einige Zeit mit dem Puffer stehen lassen. 10 bis 15 Minuten sind dafür in der Regel ausreichend.

(Bühlmann Smart-Prep. Faecal sample preparation kit 2010.)

## Liite 3: 1(2) Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttömanuaali

**ENGLISH**

**INTENDED USE**

BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range is an immunoassay designed for the quantitative determination of elevated Calprotectin concentrations in human stool samples (1-5) in combination with the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. For laboratory use only.

**PRINCIPLE OF THE ASSAY**

The test is designed for the selective measurement of Calprotectin antigen by sandwich immunoassay. A monoclonal capture antibody (mAb) being highly specific for Calprotectin is coated onto the test membrane. A second monoclonal detection antibody conjugated to gold colloids is deposited onto the conjugate release pad and released into the reaction system after addition of the extracted and diluted stool sample. The Calprotectin/anti-Calprotectin gold conjugate binds to the anti-Calprotectin antibody coated on the test membrane (test line, test band) and the remaining free anti-Calprotectin gold conjugate binds to the goat anti-mouse antibody coated on the test membrane (control line, control band). The signal intensities of the test line and the control line are measured quantitatively by the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cartridge	25	B-FCR-1C	
Reagent-sealed in a foil bag			
Extraction Buffer	1 bottle	B-CAL-EX	Ready to use
Chase Buffer	1 bottle	B-CHR-CB	Dilution buffer, ready to use
RPD Chip Card	1	B-CHR-RCC	

**REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY**

Faecal Extraction Devices described below are not delivered with the kit and either of them has to be ordered with the kit.

Smart-Prep	50 devices	B-CAL-RD
Schubo®	50 tubes	B-CAL-SOFI
Quick-Prep™	Filled with 1.3 ml Extraction Buffer	

Controls can be ordered separately.

Controls Low / High*	2 wats, 0.5 ml	B-CHR-CONSET	Ready to use
----------------------	----------------	--------------	--------------

\* Lot specific concentration of Calprotectin

**STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS**

All kit components are stable at 2-8°C until the expiration date printed on the labels.

**WARNINGS AND PRECAUTIONS**

**Human Source Material:** None of the reagents provided with this kit is of human origin. Patient specimens should be handled as potentially biohazardous, taking appropriate precautions.

Revision date: 2011-09-15

2/28

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-100 µl and 3 ml
- Centrifuge
- 5 ml polypropylene or polystyrene tubes for dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-FOCTR-ABS)
- Gloves and Lab coat
- Soft tissues or blotting paper

**SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

Using the Extraction Devices which can be supplied upon request, less than 1 g of native stool is required. Collect stool samples into clean tubes and store refrigerated at 2-8°C for up to 6 days. Freezing of the sample may result in slightly increased Calprotectin values due to release from neutrophils present in the sample. Therefore, it is of advantage for longer storage, to keep the extracts at -20°C. The extracts are stable for at least 4 months. Important: The sample must be collected without any chemical or biological additives in the collection device.

**ASSAY PROCEDURE**

The Assay Procedure consists of three steps:

- Extraction of stool samples:** The extraction is described in the instruction for use delivered with the respective extraction devices.
- Sample processing:**
  - Dilute the extracts of the stool samples prior to using them for analysis: 1:50 with Chase Buffer (eg. 20 µl sample and 3000 µl buffer).
  - Vortex.
  - Centrifuge the diluted extract for 5 min at 3'000 x g and continue with the lateral flow assay procedure. Alternatively, the stool extract can be settled for 10 minutes.
  - The supernatant has to be used for the lateral flow assay (refer to pages 17ff).
- Lateral Flow Assay Procedure** The assay procedure is described and illustrated in details below on pages 17ff.

**PROCEDURAL NOTES**

- All reagents and test samples must be equilibrated at room temperature (18-28°C) before starting the assay. The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for Calprotectin High Range (CHR.0 and CHR.900, respectively) before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device. Avoid contamination with stool at the top of the tube.
- Diluted samples (stored at 2-8 °C) should be used within 24 hours and cannot be stored for a longer time period.
- Undiluted extracts can be stored at -20 °C for at least 4 months. It is important to centrifuge the extracts before storage (5 min at 3'000 x g). After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube.

**QUALITY CONTROL**

- A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by following this instruction for use accurately.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices, ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.

**VALIDATION OF RESULTS**

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see Figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and can not be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1A), the concentration of Calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1B), the Calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the Calprotectin High Range assay has to be repeated using another test cartridge.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the Calprotectin High Range assay has to be repeated using another test cartridge.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the Test (T) and Control (C) Lines, an additional validity check of the Control Line (C) is undertaken. If the signal intensity of the Control Line (C) is below a threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Calprotectin High Range assay has to be repeated using another test cartridge.

**STANDARDIZATION AND INTERPRETATION OF RESULTS**

- The Lateral Flow Assay is calibrated with the BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL).
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the Calprotectin concentration. This lot-specific standard curve is generated with the median values (n≥10 measurements each) from at least 10 Calibration points obtained from different stool samples with known Calprotectin concentrations. The assay range is between 100 and 1800 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 1800 µg/g should be further diluted (e.g. 1:5) with Chase Buffer and assayed again according to the procedure. The resulting dilution factor must be multiplied by the measured concentration to obtain the final results.
- For quantitative measurements, unknown samples reading 100 µg/g should be re-tested in the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin assay (order code: LF-CAL20).

**LIMITATIONS**

- The reagents supplied with this kit are optimised to measure human Calprotectin in extracted stool samples.
- Faecal Calprotectin values should be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- A Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® High Range Calprotectin rapid assay should be confirmed by measuring other biomarkers (such as C-Reactive Protein) or by repeating the Calprotectin test (with ELISA, order code: EK-CAL, or using a second test cartridge) and comparing to the CD4I score and the clinical status of the patient, before any clinical and/or therapeutic decision is made.
- During therapy follow-up, a Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range rapid assay should be interpreted by comparing the result with previous ones and in the context of the patient's clinical picture.

**EXPECTED VALUES**

Estimation of faecal Calprotectin is a reliable and easy way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases. Interpretation of results:

- Values below 100 µg/g:**
- Calprotectin values <100 µg/g are indicative of either non-inflammatory situation or mild inflammation in the gut. Further investigations and retesting the sample with EK-CAL or LF-CAL should be taken into consideration.
- Elevated values above 200 µg/g:**
- Calprotectin values > 200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative and curative procedures by specialists are suggested.

Revision date: 2011-09-15

3/28

BÜHLMANN LF-CHR20



## Liite 3: 2(2) Bühlmann Quantum Blue- vieritestin käyttömanuaali

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Limit of Blank (LoB): <50 µg/g calprotectin.** The LoB has been established in two independent runs using two different lots of Test Cartridges with a total of 60 blank values each using Chase Buffer as sample. The LoB has been calculated as the average of the two runs in accordance with CLSI protocol EP17-A.

**Limit of Detection (LoD): 95 µg/g calprotectin.** The LoD has been established with two stool extracts with concentrations of 62 and 128 µg/g. The samples were measured with three different lots of Test Cartridges in 2 runs per day over 10-20 days. The SD values were determined and therefrom the LoD has been calculated in accordance with CLSI protocol EP17-A. The data presented are the average of three different lots of Test Cartridges.

**Limit of Quantification (LoQ):**

**Lower LoQ: <100 µg/g calprotectin.**

**Upper LoQ: >1800 µg/g calprotectin.**

The LoQ has been established with 11 stool extracts at concentrations between 24 and 2682 µg/g. Samples were measured with three different lots of Test Cartridges in 2 runs per day over 10-20 days. The Total Precision CV was determined, averaged for each sample and limit of 30% CV was applied.

**Linearity:** Serial dilution of four independent samples showed linearity between measured value and dilution factor within the indicated measuring range of 100-1800 µg/g ( $R=0.985-0.999$ ). As an example, the medians of 4 replicates for each dilution of sample 1 are shown in Figure 2. The average difference between measured and expected concentrations was 3% (recovery 103 %).

**Recovery: 105 %.** Four stool extracts containing low calprotectin concentrations were spiked with different amounts from a highly concentrated calprotectin stock solution. Each sample was measured before and after spiking on three test cartridges according to the assay procedure. The three replicates were averaged and the mean values are presented in Table 16. The recovery varied from 84-125 %.

**Repeatability: 21% CV.** The repeatability of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated from 4 extracted stool samples containing between 128 and 917 µg/g calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in one run of 20 replicates set up within 10 minutes. The mean values of 4 different lots of Test Cartridges are presented in: The repeatability varied from 16.5-24.1 % CV.

**Between-day Precision: <10% CV.** The between-day precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated according to CLSI protocol EP5-A2 from six stool extracts between 128 and 1324 µg/g calprotectin tested as two replicates per day over 10-20 days. The mean values of three different lots of Test Cartridges are presented in Table 17. The between-day precision varied from 0.9-4% CV.

**Total Precision: 25% CV.** The total precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated according to CLSI protocol EP5-A2 from six stool extracts between 129 and 1324 µg/g calprotectin

Revision date: 2011-09-15

4/28

tested in two runs per day (1 in the morning, 1 in the afternoon) over 10-20 days. The mean values of three different lots of Test Cartridges are presented in Table 17. The total precision varied between 22.4-26.9 % CV.

**Inter-lot Precision: 21.1% CV.** The inter-lot precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated from 4 extracted stool samples containing between 128 and 917 µg/g calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in three runs of 20 replicates each set up within 10 minutes using three different lots of Test Cartridges (n=60 replicates each). The inter-lot data of the 4 samples varied from 17.0 to 22.9% CV.

**Method Comparison:  $R^2 = 0.98-0.93$ ;  $y = 0.91x+70.2$  µg/g** 54 stool extracts from patients with suspected IBD exhibiting calprotectin concentrations within the indicated linear range of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay were analyzed according to the assay procedure using two different lots of Test Cartridges (Lot A and Lot B) in two runs each and compared with the values obtained by the BÜHLMANN Calprotectin ELISA, extended range (order code EK-CAL). The correlations are presented in Table 18 and one example is illustrated in Figure 3.

BÜHLMANN LF-CHR20

(Bühlmann Quantum Blue 2011)

## Liite 4: 1(3) Orion Certestin käyttömanuaali



CERTEST Calprotectin 50+200  
One Step Calprotectin 50+200 combo card test / Prueba combo de un solo paso para Calprotectin 50+200 en cassette

### ENGLISH

#### INTENDED USE

The CerTest Calprotectin 50+200 one step combo card is a coloured chromatographic immunoassay for the semi-quantitative detection of human fecal calprotectin (hFCP) in stool samples, to the following cut-off values: A: 50µg/g feces and B: 200µg/g feces.

#### INTRODUCTION

Calprotectin is a neutrophil cytosolic protein with antimicrobial properties, which is present at increased concentration in stool samples during bowel inflammation (intestinal inflammation). The stability of the protein to degradation keeps it stable in feces for up to 7 days at room temperature, making it an ideal analyte.

Calprotectin is released by activation of leukocytes, giving increased levels in plasma, cerebral spinal fluid, synovial fluid, urine or stools as a consequence of disease in the relevant organ(s).

Calprotectin inhibits zinc-dependent enzyme systems, as a result kills microbes and induces apoptosis in normal and cancer cells. In the presence of calcium, calprotectin is a remarkably resistant to proteolytic degradation.

This is a non-invasive marker of intestinal inflammation (for example in Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD)).

CerTest Calprotectin 50+200 combo card offers a highly sensitive, simple and non-invasive assay to estimate inflammatory disease, to monitor treatment response in these patients, to predict risk of relapse and to monitor small bowel transplantation or graft rejection.

#### PRINCIPLE OF THE TEST

The CerTest Calprotectin 50+200 combo card is based on the principle of a semi-quantitative immunochromatographic assay for the determination of human calprotectin in stool samples. Each strip consists of: a membrane pre-coated with antibodies on the test line (result region), against human calprotectin and colored conjugate (anti-human calprotectin antibodies-red microspheres) pad pre-dried on the end of the membrane. During testing, the sample reacts with the conjugate and then the mixture moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the colored particles migrate. In the case of a positive result the specific antibodies present on the membrane will capture the colored conjugate. A colored band will be visible, in A and/or B depends on the calprotectin content of the sample. These bands are used to interpret the result. The mixture continues to move across the membrane to the immobilized antibody placed in the control band region; this green colored band always appears. The presence of this green band serves as 1) verification that adequate volume is added, 2) proper flow obtained and 3) an internal control for the reagents.

#### STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until through the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

#### PRECAUTIONS

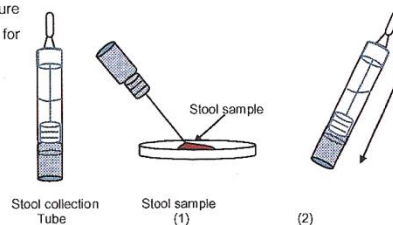
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.

#### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored at room temperature or in the refrigerator (2-8°C) for 7 days prior to testing. For longer storage, maximum 6 months, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing.

##### Specimen preparation (see illustration):

- (1) Unscrew the cap and use the stick by introducing four times into the fecal specimen to pick up the sample and add the stick with the sample into the stool collection tube.
- (2) Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion. The stool collection vial with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



1 | IU-CC8F rev 00

**CerTest** C/María de Luna 11, nave 16  
BIOTEC S.L. E-50018 Zaragoza (SPAIN)  
www.certest.es



February 2011 Revision 00.

(Certest Biotect 2011.)

(Jatkuu)

Liite 4: 2(3) Orion Certestin käyttömanuaali

**CERTEST Calprotectin 50+200**  
One Step Calprotectin 50+200 combo card test / Próbki combo de un solo paso para Calprotectin 50+200 en cassette

	A (50µg/g)	B (200µg/g)	Interpretation of the results
1.	-	-	Calprotectin marker is not present in patient sample (<50µg/g), which might mean neither active gastrointestinal inflammation, nor risk of relapse (CD or UC relapse), nor graft or transplantation rejection.
2.	+	+	High quantity of calprotectin marker (>200µg/g) is present in patient sample, which might mean active gastrointestinal inflammation, risk of relapse in clinical remission, graft rejection or transplantation rejection.
3.	+	-	Calprotectin marker is present in patient sample (>10µg/g and <200µg/g), which might mean active gastrointestinal inflammation.
4.	-	+	Invalid result. If B is positive, A has to be also positive.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result: Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another combo device.

**VALID RESULTS**

- Strip A and Strip B: NEGATIVE.** Two GREEN bands appear across both control windows (A and B) in the site marked with the letter C (control line). That might mean neither active gastrointestinal inflammation is present in the patient, nor relapse risk is present in patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in clinical remission, nor graft or transplantation rejection.
- Strip A: Calprotectin 50 POSITIVE.** Besides the GREEN control band, a second RED one (calprotectin 50 test line) appears in the site marked with the letter T (result region). Strip B: Calprotectin 200 POSITIVE. Besides the GREEN control band, a second RED one (calprotectin 200 test line) appears in the site marked with the letter T (result region). That might mean either active gastrointestinal inflammatory pathology, risk of relapse in patient during monitor treatment response (patients in clinical remission of GI inflammatory pathology, for example: Crohn's Disease or Ulcerative Colitis) or rejection in patient after small bowel transplantation or graft.
- Strip A: Calprotectin 50 POSITIVE.** Besides the GREEN control band, a RED band (calprotectin 50 test line) also appears in the site marked with the letter T (result region). Strip B: Calprotectin 200 NEGATIVE. A GREEN control band appears across the control window in the site marked with the letter C (control line). That might mean an active gastrointestinal inflammation in patient.

**INVALID RESULTS**

- Strip A: Calprotectin 50 NEGATIVE.** A GREEN control band appears across the control window in the site marked with the letter C (control line). Strip B: Calprotectin 200 POSITIVE. Besides the GREEN control band, a second RED one (calprotectin 200 test line) appears in the site marked with the letter T (result region).
- Any other result is considered to be invalid. A total absence of the control coloured band (GREEN) regardless the appearance or not of the result line (RED) -> Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are likely the reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the assay using a new combo card test. If the problem still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

**NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS**  
The intensity of the red coloured band in the result line region (T) will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value, nor the rate of increase in antigen can be determined by this qualitative test.

**QUALITY CONTROL**  
Internal procedural controls are included in the test. A GREEN line appearing in the control region (C) is an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

**LIMITATIONS**

- The test must be carried out within 2 hours since the opening of the sealed bag.
- Stool from patients with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) treatment might show positive result.
- Neonatal fecal calprotectin levels have been reported higher than those in normal children with a mean of 167 µg/g.
- An excess of stool sample could result in wrong results (brown bands appear or absence of the control colored band).
- Patients' stool suffering from active inflammatory bowel disease, usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, would be positive for fecal calprotectin. CerTest Calprotectin 50+200 combo card could be sensitive for this diagnosis in patients with chronic diarrhea.

**CERTEST Calprotectin 50+200**  
One Step Calprotectin 50+200 combo card test / Próbki combo de un solo paso para Calprotectin 50+200 en cassette

**MATERIALS PROVIDED**

- CerTest Calprotectin 50+200 combo card
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

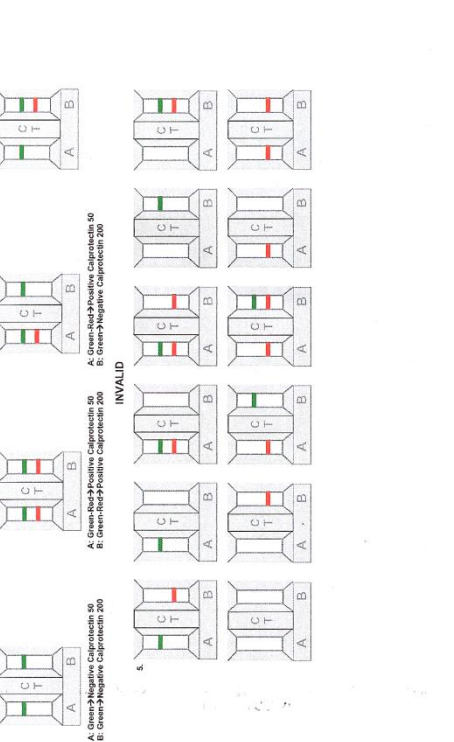
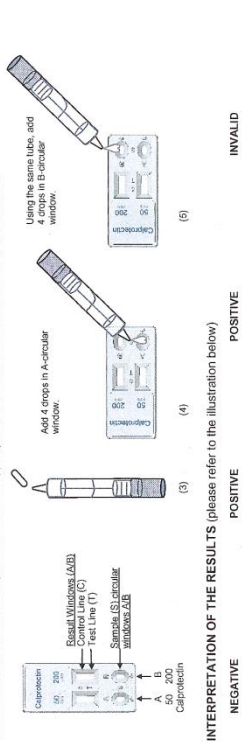
**MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED**

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

**TEST PROCEDURE**

Allow the test, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performing of the assay.

- Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion. Cut the end of the cap (3).
- Remove the CerTest Calprotectin 50+200 combo card device from its sealed bag just before using.
- Use a separate stool collection tube and device for each sample or control. Dispense 4 drops or 100µL in the circular window marked with the letter A (4) and 4 drops or 100µL, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (5).
- Read the result at 10 minutes (the coloured bands appear). Do not read the test result after more than 10 minutes.



(Certest Biotect 2011.)

(Jatkuu)

Liite 4: 3(3) Orion Certestin käyttömanuaali

**CERTEST Calprotectin 50+200**  
One Strip Calprotectin 50+200 combo card test. Phytolab combo de un solo tira para Calprotectin 50+200 en cassette

**6. Positive results confirm the presence of human calprotectin in fecal samples.** Nevertheless, it can also be due to several causes such as Inflammatory Bowel Disease, colorectal cancer and some other enteropathies. A positive result should be followed up with additional diagnostic invasive procedures, colonoscopy and biopsy in order to confirm the diagnosis and establish the inflammation extent.

**7. Negative results do not exclude inflammation.** Some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps may mainly involve mononuclear inflammation.

**EXPECTED VALUES**

Some studies established equal or higher 50µg hFCP/g feces as cut-off value to detect adult patients with gastrointestinal inflammatory pathology, requiring additional invasive procedures to diagnosis.

The clinical course of inflammatory bowel disease is characterized by a succession of relapses and remissions. Some studies established equal or higher 200µg hFCP/g feces as cut-off value to allow predict clinical relapse of disease activity in patients with Ulcerative Colitis and in Crohn's Disease and detect some neonatal patients (higher levels than normal children) with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

Fecal calprotectin level evolution in individuals showed that fecal calprotectin level can predict rejection days before histopathological diagnosis.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Analytical sensitivity** A sample containing calprotectin at concentration equal to or higher than 200µg/g feces produces positive results in two strip-test (A and B) when using CerTest Calprotectin 50+200 combo card. A sample containing calprotectin at concentration equal or higher than 50µg/g feces produces positive result when using strip A (calprotectin 50) of CerTest Calprotectin 50+200 combo card.

Different calprotectin dilutions were tested directly in the extraction buffer or spiked in a negative stool sample in accordance with the kit instructions to determine the detection limit of the test.

**Analytical specificity (Cross reaction):** The CerTest Calprotectin 50+200 combo card test is specific for human calprotectin, showing no cross-reaction with other fecal markers: hemoglobin and transferrin.

**Clinical sensitivity and specificity**

64 stool patients' specimens were collected from two different hospitals and evaluated using CerTest Calprotectin 50+200 combo card. The detection of human calprotectin under CerTest Calprotectin 50+200 combo card showed >94% sensitivity correlation compared to another commercial immunoassay (Calprest® Eurospital).

The detection of human calprotectin using CerTest Calprotectin 50+200 combo card showed 93% specificity correlation compared to another commercial immunoassay (Calprest® Eurospital).

**CERTEST Calprotectin 50+200**  
One Strip Calprotectin 50+200 combo card test. Phytolab combo de un solo tira para Calprotectin 50+200 en cassette

**ESPAÑOL**

**USO PREVISTO**

CerTest Calprotectin 50+200 combo card es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección semi-cuantitativa de calprotectina fecal humana (hFCP) en muestras de heces, presentando una ventana de cut-off para A: 50µg/g heces y para B: 200µg/g heces.

**INTRODUCCIÓN**

La calprotectina es una proteína del citosol de los neutrófilos con propiedades antimicrobianas, que se encuentra presente en las heces en una concentración muy elevada durante la inflamación intestinal. La proteína una vez formada hasta su degradación se mantiene estable a temperatura ambiente durante 7 días en las heces, siendo por ello un analito ideal.

La calprotectina se libera por activación de los leucocitos, lo que conlleva un aumento de su nivel en plasma, en líquido cefalorraquídeo, en líquido sinovial, en orina y heces como consecuencia de una enfermedad asociada al órgano u órganos correspondientes.

Esta proteína inhibe el sistema enzimático dependiente del zinc, ocasionando con ello la muerte de ciertos microbios e induciendo la apoptosis de células sanas y concrogénicas. La calprotectina en presencia de calcio es extremadamente resistente a la degradación proteolítica (proteólisis), y por ello es tan estable en las heces almacenadas a temperatura ambiente durante 7 días.

Este es un marcador no invasivo de la inflamación intestinal (por ejemplo, en la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn).

CerTest Calprotectin 50+200 combo card se presenta como una prueba muy sencilla, simple y no invasiva para determinar la presencia de actividad inflamatoria, como control de la respuesta a un tratamiento, para detectar posibles recaídas y como control de posibles rechazos tras injertos o trasplantes del mismo órgano doloado.

**FUNDAMENTO DEL TEST**

CerTest Calprotectin 50+200 combo card es una prueba semi-cuantitativa inmunocromatográfica para la determinación de calprotectina humana en muestras de heces. Cada tira consiste en: una membrana a la que previamente se han fijado unos anticuerpos en la línea del test (zona de resultados), frente a calprotectina humana y un absorbente al final de la membrana donde se ha soñado un conjugado colorado de partículas-microesferas rojas-calprotectina humana.

Durante la prueba, la muestra reacciona con el conjugado y esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana del test. Estas partículas siguen migrando con el flujo de la muestra a través de la membrana. Para dar el resultado como positivo, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturan el conjugado colorado correspondiente. Una banda colorada será visible en A o en B, dependiendo del contenido de calprotectina en la muestra. Estas líneas o bandas se utilizarán para interpretar el resultado del test.

La mezcla de conjugado va avanzando por la membrana hasta la zona de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color verde (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente y 2) que el flujo ha sido el apropiado; y 3) como control interno de los reactivos.

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30° C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

**PRECAUCIONES**

- Sólo para uso profesional in vitro.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

**RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN**

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio y la prueba debe realizarse lo más pronto posible después de la recogida. Las muestras se deben conservar a temperatura ambiente o en frío (2-8° C) máximo 7 días hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -20° C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarse en la prueba.

4 | IHCOSP rev 00

February 2011 Edition 00

CerTest  
E-00119 Zaragoza (Spain)  
www.certest.es

5 | IHCOSP rev 00

February 2011 Revision 00

CerTest  
E-00119 Zaragoza (Spain)  
www.certest.es

(Certest Biotect 2011.)

## Liite 5: 1(2) PrevenID CalDetect käyttömanuaali

# PrevenID® CalDetect®

Gastroenterology

Preventis GmbH · Bensheim · Germany

**PrevenID® CalDetect® (KST11005)**

**The PrevenID® CalDetect® is a semiquantitative immunochromatographic rapid test for the detection of calprotectin in faeces. The detection of calprotectin in faeces allows a differentiation between organic intestinal diseases (e.g. chronic inflammatory diseases, infectious diseases, polyps, colon cancer) and functional intestinal diseases (e.g. irritable bowel syndrome). The determination of calprotectin is also ideal for monitoring disease activity (e.g. of M. Crohn or after polyp resection), early detection of relapse and for therapy monitoring. Using three test lines allows the physician to distinguish between varying degrees of calprotectin positivity. Calprotectin (MRP 8/14) is a heteromer of two calcium-binding proteins (MRP8 and MRP 14) present in the cytoplasm of neutrophils and expressed by the membranes of monocytes. It constitutes nearly 60% of the soluble cytosol proteins in neutrophils and plays a central role in neutrophil defense. Upon neutrophil activation or endothelial adhesion of monocytes, calprotectin is released and may be detected in serum, body fluids or stool as a potentially useful clinical inflammatory marker. The acute phase protein shows a high stability in faeces (stable for one week at room temperature) and has been established as a faecal marker of inflammatory bowel diseases (IBD). It allows a reliable differentiation between organic intestinal diseases (e.g. chronic inflammatory diseases, infectious diseases, polyps, colon cancer) and functional intestinal diseases (e.g. irritable bowel syndrome). Calprotectin is ideal for monitoring disease activity (e.g. of M. Crohn or after polyp resection) and early detection of relapse. Calprotectin further was qualified for discriminating between an organic diarrhoea and a functional diarrhoea.**

**Principle**  
The test device is composed of a sample well and a result window. In the result window one, two or three colored lines can be seen after the test has been performed.

**Materials Provided**  
One **PrevenID® CalDetect®** test kit contains the following items to perform the test:

1. **PrevenID® CalDetect®** test device (with drying agent, not required for test)
2. Stool sample collection device with extraction buffer solution and sample collection stick
3. Paper faecal sample collection strip
4. Instruction sheet for sample collection

**Materials required but not provided**  
Timer or stop watch

**Reagent Storage**  
Store all reagents at 4 - 30°C. Beware: The interpretation time is based on reading the test results at room temperature (15-30°C). If the test device or the extraction buffer were stored at lower temperatures make sure they are at room temperature before starting the test. All reagents are provided ready to use.

**Precautions**

1. For *in vitro* diagnostic use only.
2. Do not use beyond the expiration date.
3. Do not open the aluminium-laminated wrapper until you are ready to perform the test.
4. Do not use test device if the aluminium pouch is torn or if the membrane of the rapid test device is visibly damaged.
5. Used test devices, sample diluent, and sample collection device should be disposed of according to appropriate guidelines of biohazardous waste.
6. If you have questions please contact the manufacturer.

**Specimen collection**

1. The faecal sample is directly collected in flat-pan toilets or in the case of funnelled toilets according to the printed instructions on the paper sample collection strips.
2. Unscrew the cap of the sample collection device and stick the attached collection stick into the faeces at **three different sites**.
3. Then retract the sample collection stick with the adhering faecal sample and insert it into the collection device containing an extraction buffer solution. Screw cap on firmly and shake well. Do not overfill the collection device with faeces, the buffer solution has to remain liquid at all time.
4. If **PrevenID® CalDetect®** rapid test is not run within one day of sample collection, the sample collection device should be stored at 2 - 8°C, but for not more than 7 days.

**Test procedure**

1. Remove the test device from the pouch and place it on a flat dry surface. The round sample opening at the one end of the test device should be at the right side (Fig. 1). Label the device with patient name or identification number. Use test device immediately.
2. If necessary bring collection device to room temperature after sample collection and shake again.
3. After the sample collection procedure has been completed, break off the tip of the sample collection device carefully (avoid dripping). Squeeze **3 drops** of the extracted sample into the sample opening on the right side of the test device (by gently pressing the sample tube of the middle).
4. In a properly working test, a violet band will pass through the square result window in the middle of the test device.
5. The result should be interpreted **10 minutes** after the last drop has been placed.

**Fig. 1: PrevenID® CalDetect® Test Device**

## Liite 5: 2(2) PrevenID CalDetect käyttömanuaali



### Interpretation of the test result

A solitary control line (C) in the results window indicates that the test has run correctly. Depending on the concentration of Calprotectin in the sample, test bands (T1, T2, T3) will appear to the right of C. Upon running the test and depending on the visible bands, the following conclusions can be made.

#### Negative:

Either the control band (C) only or together with the first testband (T1) indicates that there is no bowel inflammation and that the test has run correctly.

#### Positive:

**Calprotectin concentration 15 - 60 µg/g:** The presence of 3 color bands (C, T1, T2) within the result window indicates a calprotectin concentration between 15 µg/g and 60 µg/g. An inflammatory process is going on in the mucosa.

**Calprotectin concentration > 60 µg/g:** The presence of 4 color bands (C, T1, T2, T3) within the result window indicates a calprotectin concentration higher than 60 µg/g. A high-grade inflammatory process is going on in the mucosa.

#### Invalid:

If, after conducting the test, neither of the colour bands are visible or only a test band (T) is visible, the test is invalid.

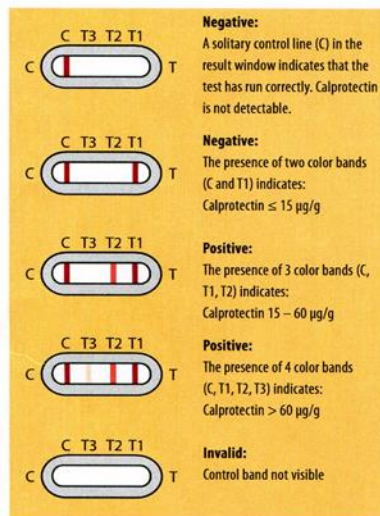


Fig. 2: PrevenID® CalDetect® Test results

### Limitations of the Test

Although the **PrevenID® CalDetect®** is very accurate in detecting calprotectin a low incidence of false results can occur. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained.

As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

### Short Instruction for the handling of the PrevenID® CalDetect®

1. Collect the faecal samples with the aid of the sample collection device and the sample collection stick as described in the instruction.
2. Shake the solution in the sample collection device very thoroughly. Unpack the test unit.
3. Break off the tip of the sample collection device carefully.
4. Squeeze **3 drops** of the extracted sample into the round sample opening.
5. Read the findings of the test **after 10 minutes**.

As of June 2009 / A

### References:

- Bergis D et al. (2005) Verdacht auf infektiöse Diarrhoe - Stuhlkultur ja oder nein? Evaluierung eines Stuhl-Calprotectinschnelltestes als positiver prädiktiver Marker für invasive Erreger. *Z Gastroenterol* 43: 948 (P512)
- Schirmacher S et al. (2004) Fäkales Calprotectin - ein Screeningmarker für infektiöse Diarrhoen? Erste Ergebnisse einer monozentrischen prospektiven Studie. *Z Gastroenterol* 42: 785-944 (P013)
- Schröder O et al. (2007) Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Oct 1;26(7):1035-42
- Shastri Y et al. (2006) Comparative study of new rapid bedside fecal calprotectin test with an established ELISA to assess intestinal inflammation in a prospective study. *Gastroenterology* 130 (4): AGA Abstracts: A-200

PrevenID® and CalDetect® are trademarks of Immundiagnostik AG, Bensheim

CE

Preventis GmbH  
Bensheim, Germany

	Storage temperature		Manufacturer
	In vitro diagnostic device		Lot number
	Catalogue number		Expiry date
	Read instruction before use		Do not reuse
	Contains sufficient for <-> tests		