# BÜHLMANN fCAL® ELISA

## Calprotectin ELISA assay

For *In Vitro* Diagnostic Use.

| | |
|---|---|
| EK-CAL | 96 tests |
| EK-CAL2 | 192 tests |

Release Date: 2019-12-20
Version A1

**BÜHLMANN Laboratories AG**
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch


| | | |
|---|---|---|
| English | Page | 2 |
| Deutsch | Seite | 10 |
| Français | Page | 19 |
| Italiano | Pagina | 28 |
| Español | Página | 37 |
| Português | Página | 46 |

# ENGLISH

## INTENDED USE

The BÜHLMANN fCAL® ELISA is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid to the assessment of intestinal mucosal inflammation. The assay results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, specifically Crohn's disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-7), in patients with chronic abdominal pain and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 7-18).

For laboratory use only.

## PRINCIPLE OF THE ASSAY

The BÜHLMANN fCAL® ELISA allows the selective measurement of calprotectin in fecal extracts by sandwich ELISA. The microtiter plate of the BÜHLMANN fCAL® ELISA is coated with a monoclonal capture antibody (mAb) highly specific to the calprotectin heterodimeric and polymeric complexes. Patient fecal sample extracts, controls for determination of ELISA run acceptability, and calibrators are loaded onto wells of the microtiter plate. After a 30 minute incubation at room temperature and washing steps, a detection antibody (Ab) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) detects the calprotectin molecules bound to the capture antibody on the plate. After incubation and further washing steps, the chromogenic HRP substrate, tetramethylbenzidine (TMB) is added (blue color formation) followed by a stopping reaction (change to yellow color). The absorption is measured at 450 nm. The final calprotectin concentration in µg/g stool in the patient samples is determined using the calibration curve generated from the measured calibrator values.

## REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

| Reagents | Quantity | | Code | Reconsti-tution |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Extraction Buffer** | 3 bottles x 125 mL | 6 bottles x 125 mL | B-CAL-EX | Ready to use |
| **Microtiter Plate** precoated with anti-calprotectin mAb | 12 x 8 well strips with frame | 2 x 12 x 8 well strips with frame | B-CAL-MP | Ready to use |
| **Plate Sealer** | 3 pieces | 6 pieces | - | Ready to use |
| **Wash Buffer concentrate (10x)** with preservatives | 1 bottle x 100 mL | 2 bottles x 100 mL | B-CAL-WB | Dilute each with 900 mL of deionized $H_2O$ |
| **Incubation Buffer** with preservatives | 2 bottles x 125 mL | 3 bottles x 125 mL | B-CAL-IB | Ready to use |
| **Calibrators A to E**[1) 2)] Serum-derived calprotectin in a buffer matrix with preservatives | 5 vials x 1 mL | 5 vials x 1 mL | B-CAL-CASET | Ready to use |
| **Control Low / High**[3)] Serum-derived calprotectin in a buffer matrix with preservatives | 2 vials x 1 mL | 2 vials x 1 mL | B-CAL-CONSET | Ready to use |
| **Enzyme Label** Anti-calprotectin Ab conjugated to HRP | 1 vial x 12 mL | 2 vials x 12 mL | B-CAL-EL | Ready to use |
| **TMB Substrate** TMB in citrate buffer | 1 vial x 12 mL | 2 vials x 12 mL | B-TMB12 | Ready to use |
| **Stop Solution** 0.25 M sulfuric acid | 1 vial x 12 mL | 2 vials x 12 mL | B-STS12 | Ready to use **Corrosive agent** |

Table 1

[1)] The actual calprotectin concentration of the calibrators A to E are 4, 12, 40, 120 and 240 ng/mL, respectively. For the lower range ELISA procedure the calibrator values have to be set as: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g calprotectin. This assignement corresponds to the final 1:2500 sample dilution in the lower range ELISA procedure.

[2)] If you choose the extended range ELISA procedure the nominal calibrator values have to be set as: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g calprotectin. This assignement corresponds to the final 1:7500 sample dilution in the extended range ELISA procedure.

[3)] The controls contain lot specific amounts of native human calprotectin. Refer to the additional QC data sheet for actual concentrations.

## STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS AND WORKING SOLUTIONS

| **Sealed / unopened reagents** | |
|---|---|
| Store at 2-8 °C. Do not use the reagents beyond the expiration date printed on the labels. | |
| **Opened / reconstituted reagents** | |
| Extraction Buffer | Store for up to 6 months at 2-8 °C. |
| Microtiter Plate | Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 6 months at 2-8 °C. |
| Diluted Wash Buffer | Store for up to 6 months at 2-8 °C. |
| Incubation Buffer | |
| Calibrators | |
| Controls | |
| Enzyme Label | |
| TMB Substrate | |
| Stop Solution | |

Table 2

## REAGENTS AND MATERIALS SUPPLIED SUPPLEMENTARY

### Fecal extraction devices

Fecal extraction devices described in table 3 are not delivered with the kit. The selected extraction devices must be ordered separately.

| Extraction Device Kits | Quantity | Code |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Packages of 50, 200 or 500 tubes available, each filled with 5 mL extraction buffer<br>Ready to use | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 tubes, spatulas, and base caps | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip, each filled with 1.3 mL extraction buffer<br>Ready to use | B-CAL-SO50 |

Table 3

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

### Extraction procedure

- 100 µL and 1000 µL precision pipettes with disposable tips
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for transfer of extracts (optional)
- Laminar flow work station
- Multi tube vortex mixer / Vortex mixer
- Micro centrifuge (≥3000 x g)
- Centrifuge (≥500 x g)
- Extraction devices (see table 3 above) or for the manual extraction procedure:
  - 10 µL disposable inoculation loops
  - 15 mL polypropylene tubes with screw caps required
  - Precision balance (10-200 mg)

### ELISA procedure

- 10 µL, 100 µL and 1000 µL precision pipettes with disposable tips
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions
- 1000 mL cylinder for the dilution of the wash buffer
- Microtiter plate washer (see technical precautions) or squeeze bottle for wash buffer
- Microtiter plate shaker (see technical precautions)
- Blotting paper
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### Safety precautions

- The calibrators and controls of this test contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practices (GLP) using appropriate precautions.
- The stop solution contains sulfuric acid (0.25 M). The reagent is an irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- Avoid contact of reagents with the skin, eyes or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation / burns can occur.
- Reagents and chemicals have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.

### Technical precautions

#### Kit components

- Residues in the microtiter plate wells result from the production process. They are removed in the washing step (assay procedure step 3) and do not affect the results.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Allow the reagents to equilibrate to room temperature. Mix (vortex) the reagents well before use.
- Microwells cannot be re-used.

#### Manual extraction procedure

- To achieve quantitative results, it is important to completely homogenize the added stool sample in the extraction buffer. Contaminations at the top of the extraction tube should be avoided. There may be a small amount of insoluble particles remaining after mixing.

#### ELISA procedure

- In the ELISA procedure the washing steps are essential to guarantee reproducible results. Allow the wash buffer to incubate in the wells for a minimum of 20 seconds before removing.
- If an automated washer is used, “plate mode” is strongly recommended, i.e. each process step (dispense / aspiration) is carried out on all of the strips, sequentially, before the instrument continues with the next washing cycle. Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The indicated number of washing cycles is mandatory to ensure reproducible results.
- The plate shaker must be adjusted to approximately 450 rpm (7.5 Hz). Higher rotation frequency may cause poor dilution linearity at values between 300/900 and 600/1800 µg/g. A rotational movement should be used instead of a horizontal movement.
- To ensure the antigen/antibody reaction is complete, the incubation time in step 5 must be at least 30 minutes. Moderately longer incubation time (up to 5 minutes ) has no influence on the final outcome.
- The enzyme label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore only deionized high quality water must be used.

- A new standard curve must be generated each time the assay is performed (each plate or partial plate).
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the concentration of the highest calibrator, calibrator E, the sample may be further diluted with incubation buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting total dilution factor must be taken into account for the calculation of results.

## SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

For the extraction procedure, less than 1 g of native stool specimen is required. Collect stool specimen into plain tubes.

Important: The specimen must be collected without any chemical or biological additives.

**Specimen transport**
Stool specimens should be received for processing by the laboratory within 3 days of collection. The specimens may be transported at room temperature or refrigerated.

**Specimen storage**
Stool specimens should be refrigerated at 2-8 °C and extracted within 3 days of receipt at the laboratory. Do not store samples at elevated temperatures.

## STOOL SAMPLE EXTRACTION AND EXTRACT STORAGE

### 1. CALEX® Cap

#### 1.1 Extraction procedure

Follow the instruction for use provided with the CALEX® Cap device (Code B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

CALEX® Cap device: Liquid stool samples can be pipetted directly into the CALEX® Cap device. Unscrew the blue cap and pipet 10 µL of stool sample into the device. Recap the CALEX® Cap device and proceed with vortexing step according to the extraction procedure described and illustrated in the instruction for use delivered with the CALEX® Cap device.

Important: After extraction, centrifuge the CALEX® Cap device for 5 minutes at 500-3000 x g and continue with the assay procedure.

#### 1.2 Extract storage

Fecal calprotectin extracts obtained with the CALEX® Cap device are stable at room temperature for 3 days and at 2-8°C for up to 6 days. For longer storage, freeze extracts at -20°C. Frozen extracts are stable for a period of up to 23 months.
CALEX® Cap extracts can be frozen directly and stored within the CALEX® Cap device. Extracts can be subject to four freeze-thaw cycles. Prior to measurement, allow frozen extracts to equilibrate to room temperature, vortex thoroughly for 10 seconds and centrifuge for 5 minutes at 500-3000 x g.

### 2. Other extraction devices

#### 2.1 Extraction procedures

Follow the instruction for use delivered with the respective extraction device:

- Fecal extraction device Roche (Code 10745804322) or BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).
- ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50).

Important: After extraction with BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. Alternatively, transfer the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge it in a microcentrifuge for 5 minutes at 3000 x g. Decant the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the assay procedure.

#### 2.2 Extract storage

Fecal calprotectin extracts obtained with Smart-Prep or ScheBo® Quick-Prep™ are stable at 2-8 °C for ≤7 days or at -20 °C for 36 months.

### 3. Manual extraction

#### 3.1 Extraction procedure

1. Label and weigh the empty polypropylene tube including the inoculation loop. Note the weight (tare).
2. Take out 50 to 100 mg of the stool sample by means of the inoculation loop and place it into the pre-weighted tube and weigh it again (gross weight). Avoid taking up dietary fibers present in the sample during the sampling process.
3. Calculate the net amount of sample, by subtracting tare from the gross weight, break the inoculation loop away, and leave the lower part of the loop in the tube.
4. Add extraction buffer according to the formula
   x mg stool x 49 = y µL extraction buffer (e.g. 50 mg stool + 2450 µL buffer) to the tube and close the tube.
5. Extract the samples by
   - Vigorously vortex the extraction tube containing buffer and stool sample on a (multitube) vortexer (at highest speed) for 30 seconds.
   - Next, incubate the extraction tube for 25 +/- 5 minutes on a plate shaker at ca. 400 rpm. The inoculation loop inside the tube serves to enhance agitation.
   - Again, vigorously vortex the extraction tube for 30 seconds.
6. Transfer 1.5 mL of the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge in a microcentrifuge for 5 minutes at 3000 x g.
7. Decant the supernatant into a fresh labeled tube and continue with the assay procedure or store extracts (refer to extract storage).

#### 3.2 Extract storage

Fecal calprotectin extracts obtained by manual extraction, can be stored at 2-8 °C for ≤7 days or at -20 °C for 36 months.

## WORKING RANGE

The assay can be performed according to the following procedures: lower or extended range ELISA procedure. The appropriate procedure should be selected depending on the expected calprotectin concentration:

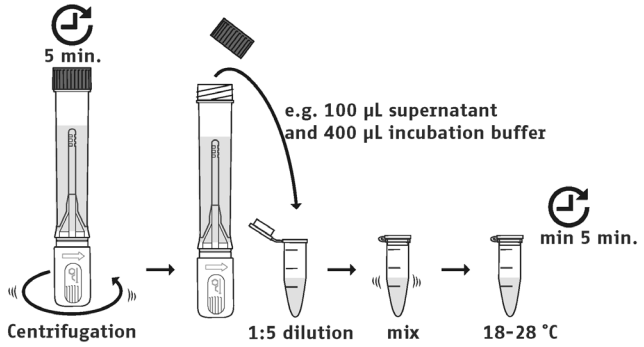
- For samples up to 600 µg/g calprotectin select lower range procedure (working range 10-600 µg/g).
- If the samples tend to exceed 600 µg/g select the extended range procedure (working range 30-1800 µg/g).

## ASSAY PROCEDURE

Important: Allow all reagents to equilibrate for at least 30 minutes to 18-28 °C prior to use. Only dilute stool extracts. Calibrators and controls are ready to use.

**1. Sample dilution option 1:**
**Working range 10-600 µg/g**

1.1. CALEX® Cap device: Dilute the stool extracts 1:5 with incubation buffer (e.g. 100 µL extract and 400 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

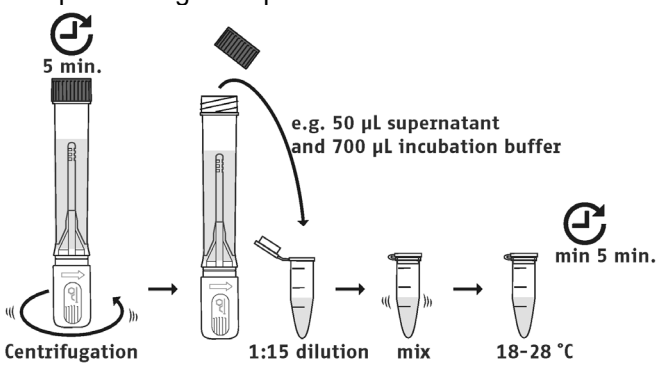



1.2 Manual extraction, Smart-Prep, or ScheBo® Quick-Prep™: Dilute the stool extracts 1:50 with incubation buffer (e.g. 20 µL extract and 980 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

**1.` Sample dilution option 2:**
**Working range 30-1800 µg/g**

The working range can be extended by a factor of 3, if you dilute the samples 1:7500 instead of 1:2500. This procedure is recommended, if high calprotectin concentrations are to be expected.

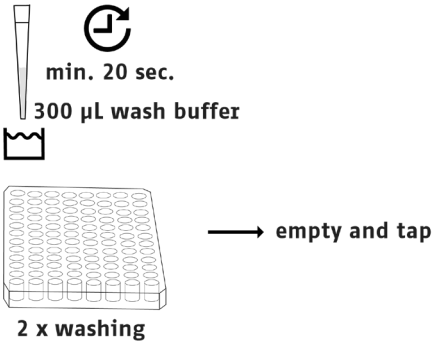
1.1` CALEX® Cap device: Dilute the stool extracts 1:15 with incubation buffer (e.g. 50 µL extract and 700 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.




1.2` Manual extraction, Smart-Prep, or ScheBo® Quick Prep™: Dilute the stool extracts 1:150 with incubation buffer (e.g. 20 µL extract and 2980 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to step 4c.

2. Prepare a plate frame with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and diluted samples. Remove excess strips from the frame and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs without delay. Store refrigerated.
3. Wash the coated wells twice using at least 300 µL of wash buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow wash buffer to remain in the wells for a minimum of 20 seconds during each wash step.

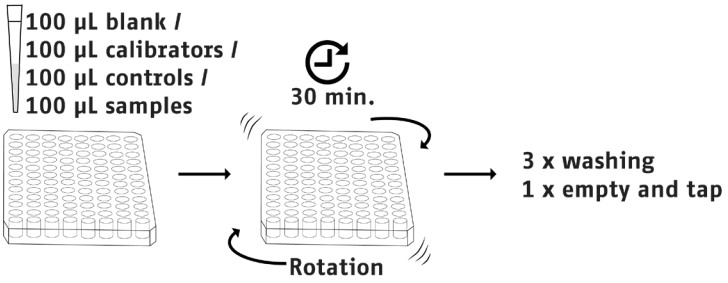



4a. Pipet 100 µL of incubation buffer (blank) and
Pipet 100 µL of calibrator A-E into the respective wells.

4b. Pipet 100 µL of the controls low and high into the respective wells.

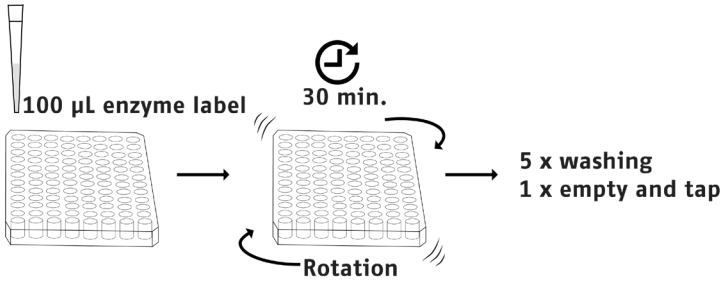
4c. Pipet 100 µL of each diluted sample into the subsequent wells.

5. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 + max. 5 min on a plate shaker set to ~450 rpm at 18-28 °C (see technical precautions – ELISA procedure).
6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µL of wash buffer per well (see technical precautions – ELISA procedure). Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.



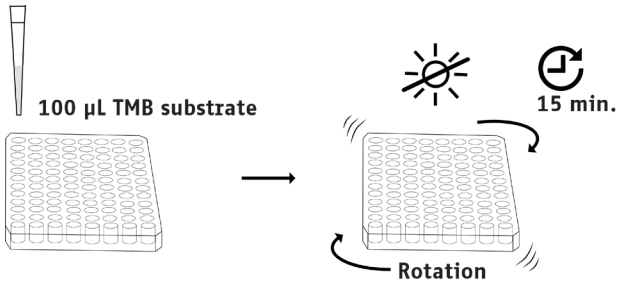

7. Pipet 100 µL of enzyme label to all wells.
8. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 ±5 min on a plate shaker set to ~450 rpm at 18-28 °C.
9. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash five times using at least 300 µL of wash

buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

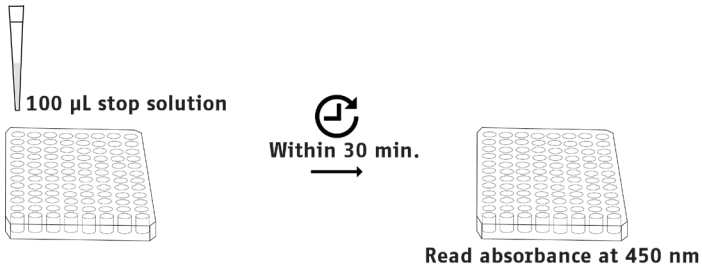



Important: Allow the TMB substrate solution to equilibrate to 18-28 °C.

10. Pipet 100 µL of the TMB substrate solution to all wells.
11. Cover the plate with a plate sealer, protect the plate from direct light and incubate for 15 ±2 min on a plate shaker set to ~450 rpm at 18-28 °C.




12. Pipet 100 µL of stop solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 min.
13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.




## QUALITY CONTROL

Thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by precise laboratory techniques and accurately following this instruction for use.

The BÜHLMANN fCAL® ELISA kit comes with two controls: controls low and high. The corresponding reference values of the controls are stated in the QC data sheet provided with each kit. The values and ranges stated on the QC data sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. Should the results for the controls low and/or high be out of the range stated in the QC data sheet, it is recommended to consider the whole run as invalid.

It is recommended to use internal control samples, in addition to kit controls, according to local and national regulations. The use of internal control samples is advised to assure the day to day validity of results. Since there is no control for fecal calprotectin commercially available, we recommend using a pool of stool extracts with normal and pathological levels for internal quality control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. If the performance of the assay does not meet the established limits and repetition has excluded errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices; ii) ELISA reader settings; iii) expiration dates of reagents; iv) storage and incubation conditions; v) TMB substrate solution should be colorless; vi) purity of water; vii) aspiration and washing methods.

## STANDARDIZATION

The BÜHLMANN fCAL® ELISA calibrator values are assigned in multiple measurement runs using internal reference material based on human serum and the BÜHLMANN fCAL® ELISA measurement procedure. The calprotectin concentration of the internal reference material was established using purified MRP8/14 from human granulocytes as primary reference material.

## CALCULATION OF TEST RESULTS

### Standard curve

It is recommended to use a software program capable of the following calculations; subtract the blank OD value from each calibrator well to calculate the calibrator value. Establish a standard curve using a 4 parameter logistic (4 PL) fit.

### Controls and Samples

It is recommended to use a software program capable of the following calculations; subtract the blank OD value from each control/ sample well. Calculate the calprotectin concentration of the control/ sample in each well, in µg/g, using the established standard curve.

### Working range 10-600 µg/g

If you select the lower range ELISA procedure, the calibrator concentrations have to be set as: 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g calprotectin. Additional dilution factors (if using a different final dilution than 1:2500) have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to table 12 and figure 1 for typical data (results and standard curve). These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

### Working range 30-1800 µg/g

If you select the extended range ELISA procedure, the following nominal calibrator values have to be set as: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g calprotectin. Additional dilution factors (if using a different final dilution than 1:7500) have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to table 15 and figure 4 for typical data (results and standard curve). These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

## LIMITATIONS

- Reagents delivered with the BÜHLMANN fCAL® ELISA kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
- For IBD disease monitoring, multiple fecal calprotectin measurements performed at up to 4 weeks intervals have been suggested to have best diagnostic accuracy in predicting clinical relapse in patients (ref. 19-20).
- Some patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) will have elevations in their fecal calprotectin levels.
- Results may not be clinically applicable to children less than 4 years of age who have mildly increased fecal calprotectin levels (ref. 21-24).

## INTERPRETATION OF RESULTS

### I. Distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

The result categories are based on data from clinical studies performed by BÜHLMANN and are BÜHLMANN's recommendations. All test results should be interpreted in conjunction with information available from the patient's clinical symptoms, medical history, and other clinical and laboratory findings.

**Clinical thresholds**

Results from 58 clinical samples from patients diagnosed with IBS and 131 clinical samples from patients diagnosed with IBD, from an international clinical study, were analyzed to obtain the values described in table 4.

| Calprotectin concentration | Interpretation | Follow-up |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normal | None |
| 80 – 160 µg/g | Gray-zone/Borderline | Follow-up within 4 – 6 weeks |
| > 160 µg/g | Elevated | Repeat as needed |

Table 4

**Calprotectin values below 80 µg/g**

Fecal calprotectin values <80 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patients with low calprotectin levels are not likely to be in need of invasive procedures to determine the inflammation cause.

**Calprotectin values between and equal to 80 and 160 µg/g**

Mid-fecal calprotectin levels between and equal to 80 and 160 µg/g, also called gray-zone levels, are not directly indicative of an active inflammation requiring immediate follow-up with invasive testing. However, the presence of inflammation cannot be excluded. Re-evaluation of fecal calprotectin levels after 4 to 6 weeks is recommended to determine the inflammatory status.

**Calprotectin values above 160 µg/g**

Fecal calprotectin values >160 µg/g are indicative of neutrophil infiltrate in the gastrointestinal tract; therefore, this may signal the presence of active inflammatory disease. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested to achieve an overall clinical diagnosis.

**Clinical evaluation**

The ability of the BÜHLMANN fCAL® ELISA to discriminate between patients with IBD and other non-inflammatory GI disorders, including IBS, was tested in a clinical study with a total of 337 adult and pediatric patients. One hundred and thirty five (135) patients had a final diagnosis of IBD (Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis), 130 patients suffered from IBS and 72 patients presented with abdominal pain and/or diarrhea, or other GI-related non-inflammatory conditions (refer to table 5). Final diagnosis was supported by endoscopic as well as other clinical findings.

A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 83.7% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and GI-related non-inflammatory conditions, including IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.923 (refer to table 6).

A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 85.4% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.933 (refer to table 8).

The optimal cut-off combination for these patient pools could be defined by ROC analysis at 80 µg/g and 160 µg/g calprotectin, which is slightly more stringent than a combination of **a more sensitive lower cut-off of 50 µg/g** with lower performance in specificity, and **an upper cut-off of 200 µg/g** with slightly lower sensitivity (table 7 and 9).

### II. IBD monitoring

**Clinical thresholds and evaluation**

The determination of fecal calprotectin is also a reliable and simple way to assist the monitoring of IBD patients (ref. 7-18).
Correlation of calprotectin levels and the inflammatory status of patients' intestinal mucosa, according to endoscopic evaluations, were determined in three independent studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 10). The diagnostic value of calprotectin in predicting clinical remission and relapse, according to patient`s symptoms, clinical activity indices, unplanned need for therapy escalation, hospitalization or emergency was determined in three studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 11).
The result categories shown are recommendations and their establishment is based on condensed knowledge of published cut-offs and clinical performance studies. It is advised that healthcare practitioners establish individual patient thresholds by determining the patient's baseline calprotectin level during disease remission.

**Calprotectin values below 100 µg/g:**

Fecal calprotectin levels below 100 µg/g can reliably indicate patients, with low risk of clinical relapse, in endoscopic remission for whom invasive endoscopic procedures can be avoided (ref. 7-18).

**Calprotectin values between 100 and 300 µg/g:**

Fecal calprotectin levels between 100-300 µg/g may indicate the necessity of tighter control in the following period to assess disease development tendencies.

**Calprotectin values above 300 µg/g:**

Fecal calprotectin levels above 300 µg/g should be repeated and, if raised levels are confirmed, prompt further investigative procedures (ref. 7-18).

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics of the BÜHLMANN fCAL® ELISA were established using the manual extraction method, unless otherwise stated.

**Working range: 10-600 µg/g**

**Repeatability (intra-assay precision): 1.9 - 8.0% CV**

**Within-laboratory precision: 5.5 - 14.0% CV**

Repeatability and within-laboratory precision were established according to the CLSI guideline EP05-A2 using a 22 days x 2 replicates study design. Ten extracted stool samples were tested. The values are presented in table 13.

**Limit of Detection (LoD): 4.2 µg/g**

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A and with proportions of false positives (α) less than 5% and false negatives (β) less than 5% based on 240 determinations, with 80 blank (extraction buffer) and 160 low level replicates; and a **LoB of 0.29 µg/g**. A cubic spline function was used to extrapolate OD values of blank samples to calprotectin concentrations in µg/g.

**Limit of Quantitation (LoQ): 9.8 µg/g**

Forty determinations of ten stool samples with values between 5.2 and 1254 µg/g were performed to generate a non-linear precision profile and establish a LoQ based on a precision goal of 20 % CV. Precise measurements <15 % CV were obtained within the whole standard range from 10 to 600 µg/g. The results are presented in figure 2.

**Linearity: 10-600 µg/g**

The linear range of the BÜHLMANN fCAL® ELISA was determined according to the CLSI guideline EP06-A. A maximum deviation from linearity of ±20 % was allowed. For values below 75 µg/g an absolute difference of less than ±15 µg/g was allowed (table 14).

**Accuracy/Recovery**

**Total bias: -1.1%;**

**Lower Limit of Agreement: -17.5%,**

**Upper Limit of Agreement: 15.4%**

Four negative extracted stool samples were spiked with increasing amounts of calprotectin from serum specimens. The results are presented in figure 3.

**High dose hook effect**

Samples with theoretical concentrations of up to 60'000 µg/g can be assayed without limiting the measuring range of the assay.

**Working range: 30-1800 µg/g**

**Repeatability (intra-assay precision) : 1.7 - 5.8% CV**

**Within-laboratory precision: 3.1 - 9.4% CV**

Repeatability and within-laboratory precision were established according to the CLSI guideline EP05-A3 using a 10 days x 2 runs x 4 replicates study design. Seven pooled stool specimen extracts were tested (table 16).

**Between-lot precision: 4.2 - 9.7% CV**

Lot-to-lot reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3 using a 3 lots x 5 days x 5 replicates study design. Six extracted stool samples were analysed. A random effects variance components model was employed for data analysis. The values are presented in table 17.

**Reproducibility (Multisite Precision Evaluation Study): 6.4 – 19.0% CV**

Reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3, using a 3 sites x 2 operators x 5 days x 2 runs x 4 replicates study design. For the two runs performed each day, operators alternated between two different ELISA readers and two different reagent lots. Three reagent lots, in total, were used across the study sites. Five pooled stool specimen extracts were tested (table 18 and 19).

**Limit of Detection (LoD): 12.6 µg/g**

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 and with proportions of false positives (α) less than 5% and false negatives (β) less than 5% based on 120 determinations, with 60 blank (extraction buffer) and 60 low level replicates; and an **LoB of 8.3 µg/g**.

**Limit of Quantitation (LoQ): 21.3 µg/g**

The LoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2, based on 60 determinations and a precision goal of 20 % CV.

**Linearity: 30-1800 µg/g**

The linear range of the BÜHLMANN fCAL® ELISA was determined according to the CLSI guideline EP06-A. A maximum deviation from linearity of ±20 % was allowed. For values below 75 µg/g an absolute difference of less than ±15 µg/g was allowed (table 20).

**Accuracy / Recovery: 96.4 – 102.2%**

Seven stool specimen extracts with calprotectin levels spanning the measuring range of the test were spiked with 180 µg/g calprotectin in calibrator material. Spiking was performed at 10 % the specimen extract volume. "Baseline" samples were spiked with the corresponding amount of incubation buffer. "Baseline" and "baseline + spike" samples were measured in three replicates with one reagent lot. The results are presented in table 21.

**Preanalytics**

The performance characteristics of the BÜHLMANN fCAL® ELISA with regard to preanalytical procedures was established using the working range 30 – 1800 µg/g.

**Extraction reproducibility – manual extraction: 9.5 - 20.5%**

Extraction reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3 using a 10 extraction x 2 replicates study design. Nine clinical stool samples, including solid, semi-solid and liquid sample consistency, were tested. The values are presented in table 22.

**Extraction reproducibility – CALEX® Cap: 7.9 - 16.9%**

Extraction reproducibility was established according to the CLSI guideline EP05-A3 using a 3 CALEX® Cap lots x 4 extractions x 4 replicates study design. Five clinical stool samples, including solid, semi-solid and liquid sample consistency, were tested. The values are presented in table 23.

**Method comparison CALEX® Cap vs. manual extraction**

**Bias at 80 µg/g: 5.9% (95% CI: 1.4 - 12.2%)**

**Bias at 160 µg/g: 12.0% (95% CI: 7.8 – 17.0%)**

**Mean Bias: 10.1% (95% CI: 5.7 – 14.5%)**

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. Two hundred forty one (241) clinical samples were extracted with one lot of the CALEX® Cap device. Reference values were established in extracts obtained with the manual extraction method. In total, 172 samples within the measuring range of the BÜHLMANN fCAL® ELISA and a reference calprotectin concentration interval of 30.5 – 1496.6 µg/g were assessed. Single extractions and assay determinations were performed for both methods. Bias was determined using Passing-Bablok linear regression and Bland-Altman analysis (tables 24 and 25).

## INTERFERING SUBSTANCES

The susceptibility of the BÜHLMANN fCAL® ELISA assay to oral pharmaceuticals, nutritional supplements, hemoglobin as well as entheropathological microorganisms was assessed according to the CLSI guideline EP07-A2, using the extended working range. Bias in results exceeding 10% was considered as interference. No interference was detected with substances, listed in table 26, up to the indicated concentrations. No interference was detected with entheropathological microorganisms, listed in table 27, up to the indicated amounts of colony forming units (CFU) per mL of stool specimen extract.

# DEUTSCH

## VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN fCAL® ELISA ist ein *in-vitro*-Diagnosetest für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben, der als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Darmschleimhautentzündungen dient. Die Testergebnisse dienen bei der Diagnose als Hilfsmittel zur Unterscheidung zwischen organischen, entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen (CED), speziell Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (UC)) und funktionellen Erkrankungen (Reizdarmsyndrom (RDS)) (Ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen und als Hilfsmittel bei der Überwachung der CED (Ref. 7-18).

Nur für den Laborgebrauch.

## TESTPRINZIP

Der BÜHLMANN fCAL® ELISA ermöglicht die selektive Messung von Calprotectin in Stuhlprobenextrakten mit dem Sandwich-ELISA. Die Mikrotiterplatte des BÜHLMANN fCAL® ELISA ist mit einem monoklonalen Fängerantikörper (mAb) beschichtet, der hochspezifisch für heterodimeren und polymeren Calprotectinkomplexe ist. Stuhlprobenextrakte von Patienten, Kontrollen zur Bestimmung der ELISA Messakzeptanz und Kalibratoren werden in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und nach den Waschschritten bindet ein Detektionsantikörper (Ak), der an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, an die Caplprotectinmoleküle, die wiederum an die Fängerantikörper auf der Platte gebunden sind. Nach der Inkubation und weiteren Waschschritten wird das chromogene HRP-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt (Bildung einer blauen Farbe); danach wird die Reaktion gestoppt (Farbumschlag nach gelb). Die Absorption wird bei 450 nm gemessen. Die endgültige Calprotectinkonzentration in µg/g Stuhl in den Patientenproben wird mithilfe der Kalibrierkurve ermittelt, die anhand der gemessenen Kalibratorwerte erstellt worden ist.

## GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

| Reagenzien | Menge | | Code | Rekonstitution |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Extraktionspuffer** | 3 Flaschen x 125 mL | 6 Flaschen x 125 mL | B-CAL-EX | Gebrauchsfertig |
| **Mikrotiterplatte** mit anti-Calprotectin mAK vorbeschichtet | 12 x 8-Well Streifen mit Halter | 2 x 12 x 8-Well Streifen mit Halter | B-CAL-MP | Gebrauchsfertig |
| **Abdeckfolie** | 3 Stück | 6 Stück | - | Gebrauchsfertig |
| **Waschpufferkonzentrat (10x)** mit Konservierungsmittel | 1 Flasche x 100 mL | 2 Flaschen x 100 mL | B-CAL-WB | Jede mit 900 mL deionisiertem $H_2O$ verdünnen |
| **Inkubationspuffer** mit Konservierungsmittel | 2 Flaschen x 125 mL | 3 Flaschen x 125 mL | B-CAL-IB | Gebrauchsfertig |
| **Kalibratoren A-E**[1) 2)] Aus Serum gewonnenes Calprotectin in einer Puffermatrix mit Konservierungsmittel | 5 Fläschchen x 1 mL | 5 Fläschchen x 1 mL | B-CAL-CASET | Gebrauchsfertig |
| **Kontrolle tief / hoch**[3)] Aus Serum gewonnenes Calprotectin in einer Puffermatrix mit Konservierungsmittel | 2 Fläschchen x 1 mL | 2 Fläschchen x 1 mL | B-CAL-CONSET | Gebrauchsfertig |
| **Enzymmarker** anti-Calprotectin Ak konjugiert mit HRP | 1 Fläschchen x 12 mL | 2 Fläschchen x 12 ml | B-CAL-EL | Gebrauchsfertig |
| **TMB-Substrat** TMB in Citratpuffer | 1 Fläschchen x 12 mL | 2 Fläschchen x 12 mL | B-TMB12 | Gebrauchsfertig |
| **Stopp-Lösung** 0,25 M Schwefelsäure | 1 Fläschchen x 12 mL | 2 Fläschchen x 12 mL | B-STS12 | Gebrauchsfertig **korrosives Agens** |

Tabelle 1

[1)] Die tatsächliche Konzentrationen der Kalibratoren A-E betragen 4, 12, 40, 120 und 240 ng/mL Calprotectin. Für die „Lower Range“ ELISA Variante müssen die Kalibratorwerte wie folgt eingestellt werden: 10, 30, 100, 300 und 600 µg/g Calprotectin. Diese Verwendung entspricht einer Probenendverdünnung von 1:2500 in der „Lower Range“ ELISA Variante.

[2)] Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die nominalen Kalibratorwerte wie folgt eingestellt werden: 30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g Calprotectin. Diese Verwendung entspricht einer Probenendverdünnung von 1:7500 in der „Extended Range“ ELISA Variante.

[3)] Die Kontrollen enthalten chargenspezifische Mengen von nativem, humanem Calprotectin. Die tatsächlichen Konzentrationen werden auf dem zusätzlichen QC Datenblatt angegeben

## LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN UND ARBEITSLÖSUNGEN

| **Verschlossene / ungeöffnete Reagenzien** | |
|---|---|
| Bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden, das auf den Etiketten aufgedruckt ist. | |
| **Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien** | |
| Extraktionspuffer | Bei 2-8 ˚C bis zu 6 Monate lagern. |
| Mikrotiterplatte | Ungebrauchte Streifen sofort in den Folienbeutel mit den Trockenmittelpackungen zurücklegen und den Druckleistenverschluss entlang der ganzen Leiste wieder verschliessen.<br>Bei 2-8 ˚C bis zu 6 Monate lagern. |
| Verdünnter Waschpuffer | Bei 2-8 ˚C bis zu 6 Monate lagern. |
| Inkubationspuffer | |
| Kalibratoren | |
| Kontrollen | |
| Enzymmarker | |
| TMB-Substrat | |
| Stopp-Lösung | |

Tabelle 2

## ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

### Extraktionsprodukte für Stuhlproben

Die in Tabelle 3 beschriebenen Extraktionsprodukte zur Stuhlextraktion werden nicht mit diesem Kit mitgeliefert. Die ausgewählten Extraktionsprodukte müssen getrennt bestellt werden.

| **Extraktions-produkt Kits** | **Menge** | **Code** |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Packungen zu 50, 200 oder 500 Röhrchen, jedes mit 5 mL Extraktionspuffer gefüllt<br>Gebrauchsfertig | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 Röhrchen, Spateln und Böden | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, jedes mit 1,3 ml Extraktionspuffer gefüllt<br>Gebrauchsfertig | B-CAL-SO50 |

Tabelle 3

## ERFORDERLICHE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

### Extraktion

- 100 µL und 1000 µL Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Polystyrol- oder Polypropyleneinwegröhrchen zum Überführen der Extrakte (bei Bedarf)
- Laminar Flow Arbeitsplatz
- Multiröhrchen-Vortexmischer / Vortexmischer
- Mikrozentrifuge (≥3000 x g)
- Zentrifuge (≥500 x g)
- Extraktionsprodukte (siehe Tabelle 3 oben) oder für die manuelle Extraktion:
  - 10 µL Einwegimpfschlingen
  - 15 mL Polypropylenröhrchen mit Schraubkappen erforderlich
  - Präzisionswaage (10-200 mg)

### ELISA

- 10 µL, 100 µL und 1000 µL Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen
- Polystyrol- oder Polypropyleneinwegröhrchen zur Durchführung der Probenverdünnungen
- 1000 ml Messzylinder zur Verdünnung des Waschpuffers
- Mikrotiterplattenwaschautomat (siehe technische Vorsichtsmassnahmen) oder Spritzflasche für Waschpuffer
- Mikrotiterplattenschüttler (siehe technische Vorsichtsmassnahmen)
- Fliesspapier
- Mikrotiterplattenphotometer zur Messung der Absorption bei 450 nm

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

### Sicherheitsmassnahmen

- Die Kalibratoren und Kontrollen dieses Tests enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss Guter Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheits-vorkehrungen getroffen werden.
- Die Stopp-Lösung enthält Schwefelsäure (0,25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
- Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung oder Verätzungen auftreten.
- Die Reagenzien und Chemikalien müssen gemäss den nationalen Richtlinien und Bestimmungen als gefährlicher Abfall behandelt werden.

### Technische Vorsichtsmassnahmen

#### Kit-Komponenten

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten geben. Sie werden im Waschschritt (Testdurchführung Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- Die Komponenten dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Komponenten von Kits mit verschiedenen Chargennummern nicht mischen oder verwenden.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu Kontaminationen zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.

- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen. Die Reagenzien vor dem Gebrauch gut mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

**Manuelle Extraktion**

- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die zugefügte Stuhlprobe vollständig im Extraktionspuffer homogenisiert wird. Kontaminationen am oberen Rand des Extraktions-röhrchens sollten vermieden werden. Eine kleine Menge an unlöslichen Partikeln können auch nach dem Mischen vorhanden sein.

**ELISA**

- Bei der Durchführung des ELISA sind die Waschschritte essentiell, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine minimale Inkubationszeit des Waschpuffers im Well von mindestens 20 Sekunden muss vor dem Entfernen eingehalten werden.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, wird dringend angeraten den „Platten- Modus“ auszuwählen. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen / Absaugen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor mit dem nächsten Waschschritt fortgefahren wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.
- Die angegebene Anzahl von Waschschritten muss dringend eingehalten werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Der Plattenschüttler muss auf ca. 450 U/min (7,5 Hz) eingestellt sein. Eine höhere Rotations-geschwindigkeit kann zu einer schlechteren Verdünnungslinearität bei Werten zwischen 300/900 und 600/1800 µg/g führen. Eine Rotationsbewegung sollte einer Horizontalbewegung vorgezogen werden.
- Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig ablaufen kann, muss die Inkubationszeit in Schritt 5 mindestens 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkubationszeiten (bis zu 5 Minuten) zeigen keinen Einfluss auf das Endresultat.
- Der Enzymmarker wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische chlorierte Kohlenwasserstoffe, die oft in der Wasser-versorgung des Labors vorkommen. Daher sollte nur deionisiertes von hoher Qualität verwendet werden.
- Die Standardkurve muss bei jedem Test (jeder Mikrotiterplatte oder partiellen Mikrotiterplatte) neu erstellt werden.
- Falls die Anfangskonzentration einer unbekannten Probe grösser als diejenige des höchsten Kalibrators (E) ist, kann diese Probe mit Inkubationspuffer weiter verdünnt und erneut gemäss der Testdurchführung gemessen werden. Der resultierende Gesamt-verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

## PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Für das Extraktionsverfahren werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt. Die Stuhlproben in Röhrchen ohne Zusatzstoffe füllen.

Wichtiger Hinweis: Den Proben dürfen keine chemische oder biologische Zusatzstoffe beigefügt werden.

**Transport der Proben**

Die Stuhlproben sollten innerhalb von 3 Tagen nach der Gewinnung zur Bearbeitung im Labor eingehen. Die Stuhlproben können bei Raumtemperatur oder gekühlt versendet werden.

**Lagerung der Proben**

Die Stuhlproben sollten im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt und innerhalb von 3 Tagen nach Eingang im Labor extrahiert werden. Die Proben nicht bei erhöhten Temperaturen lagern.

## EXTRAKTION DER STUHLPROBEN UND LAGERUNG DER EXTRAKTE

### 1. CALEX® Cap

**1.1 Extraktion**

Die Gebrauchsanweisung beachten, die dem CALEX® Cap (Code B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500) beigelegt ist.

CALEX® Cap: Flüssige Stuhlproben können direkt in das CALEX® Cap pipettiert werden. Die blaue Kappe abschrauben und 10 µL der Stuhlprobe in das Röhrchen pipettieren. Die Kappe des CALEX® Cap wieder aufschrauben und mit dem Vortex-Schritt gemäss dem Extraktions-verfahren, das in der mit dem CALEX® Cap mitgelieferten Gebrauchsanweisung beschrieben und abgebildet ist, fortfahren.

Wichtiger Hinweis: Nach der Extraktion wird das CALEX® Cap 5 Minuten bei 500-3000 x g zentrifugiert. Danach mit der Testdurchführung fortfahren.

**1.2 Lagerung der Extrakte**

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem CALEX® Cap gewonnen wurden, ist bei Raumtemperatur 3 Tage und bei 2-8 °C bis zu 6 Tage stabil. Bei längerer Lagerung, die Extrakte bei -20 °C einfrieren. Gefrorene Extrakte sind für einen Zeitraum von bis zu 23 Monaten stabil.
CALEX® Cap Extrakte können direkt gefroren und im CALEX® Cap gelagert werden. Die Extrakte können vier Einfrier/Auftau-Zyklen ausgesetzt werden. Vor der Messung die gefrorenen Extrakte auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen, 10 Sekunden gründlich vortexen und 5 Minuten bei 500 - 3000 x g zentrifugieren.

### 2. Sonstige Extraktionsprodukte

**2.1 Extraktionsverfahren**

- Die Gebrauchsanweisung beachten, die dem jeweiligen Extraktionsprodukt beigelegt ist:
- Fäkales Extraktionsprodukt Roche (Code 10745804322) oder BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).
- ScheBo® Quick-PrepTM (Code B-CAL-SO50).

Wichtiger Hinweis: Nach der Extraktion mit BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ werden die

Röhrchen 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Alternativ wird das Homogenat in ein 2 mL Eppendorf Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 3000 x g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen dekantieren und mit der Testdurchführung fortfahren.

### 2.2 Lagerung der Extrakte

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ gewonnen wurden, ist bei 2-8 °C ≤ 7 Tage und bei -20 °C 36 Monate stabil.

## 3. Manuelle Extraktion

### 3.1 Extraktion

1. Die leeren Polypropylenröhrchen beschriften und zusammen mit der Impfschlinge wiegen. Das Gewicht (Leergewicht) notieren.
2. Mit Hilfe der Impfschlinge 50 bis 100 mg Stuhlprobe entnehmen und in das vorgewogene Röhrchen geben und es erneut wiegen (Bruttogewicht). Während der Probenentnahme die Aufnahme von Ballaststoffen, die in der Probe vorhanden sind, vermeiden.
3. Das Nettogewicht der Probe durch Subtraktion des Leergewichts vom Bruttogewicht berechnen, die Impfschlinge abbrechen und den unteren Teil der Schlinge im Röhrchen lassen.
4. Extraktionspuffer entsprechend der Formel
   x mg Stuhl x 49 = y µL Extraktionspuffer (z. B. 50 mg Stuhl + 2450 µL Puffer) ins Röhrchen geben und das Röhrchen verschliessen.
5. Die Proben folgendermassen extrahieren:
   - Das Extraktionsröhrchen mit dem Puffer und der Stuhlprobe auf einem (Multiröhrchen-) Vortexer (bei der höchsten Geschwindigkeit) 30 Sekunden gründlich vortexen.
   - Danach das Extraktionsröhrchen 25 +/-5 Minuten auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei ca. 400 U/min inkubieren. Die Impfschlinge im Röhrchen dient dazu, das Schütteln zu verstärken.
   - Das Extraktionsröhrchen erneut 30 Sekunden gründlich vortexen.
6. 1,5 mL des Homogenats in ein 2 mL Eppendorf Röhrchen überführen und 5 Minuten bei 3000 x g in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
7. Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen dekantieren und mit der Testdurchführung fortfahren oder die Extrakte lagern (siehe hierzu Lagerung der Extrakte).

### 3.2 Lagerung der Extrakte

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die durch manuelle Extraktion gewonnen wurden, kann bei 2-8 °C ≤ 7 Tage und bei -20 °C 36 Monate gelagert werden.

## MESSBEREICH

Der Test kann gemäss der „Lower Range“ oder der „Extended Range“ ELISA Variante durchgeführt werden. Die geeignete Variante sollte je nach der erwarteten Calprotectinkonzentration ausgewählt werden:

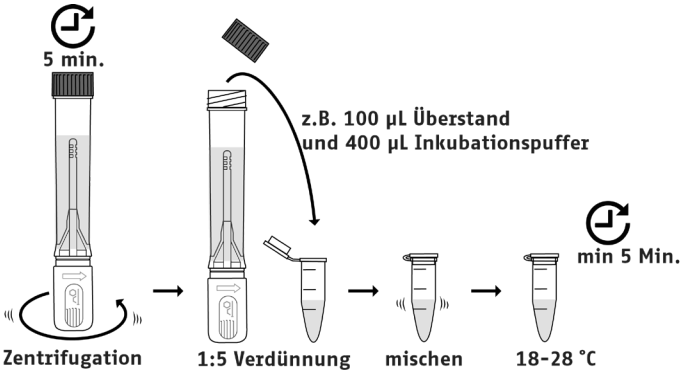
- Bei Proben bis zu 600 µg/g Calprotectin sollte die „Lower Range“ Variante (Messbereich 10-600 µg/g) ausgewählt werden.
- Falls die Proben 600 µg/g häufig überschreiten, sollte die „Extended Range“ Variante (Messbereich 30-1800 µg/g) ausgewählt werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Wichtiger Hinweis: Die Reagenzien vor dem Gebrauch mindestens 30 Minuten auf 18-28 °C äquilibrieren lassen. Nur die Stuhlextrakte verdünnen. Kalibratoren und Kontrollen sind gebrauchsfertig.

**1. Option 1 für die Probenverdünnung: Messbereich 10-600 µg/g**

1.1 CALEX® Cap: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:5 verdünnen (z. B. 100 µL Extrakt und 400 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

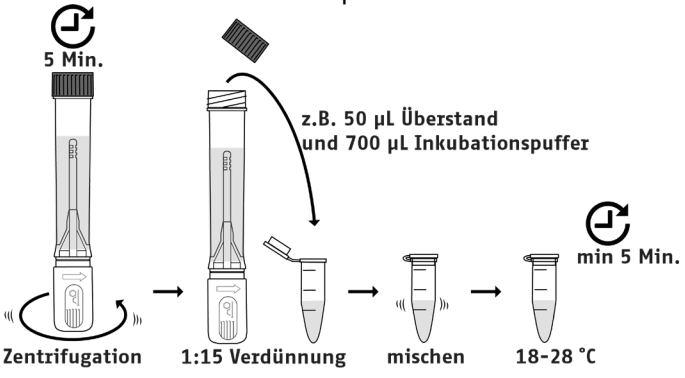



1.2 Manuelle Extraktion, Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z. B. 20 µL Extrakt und 980 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

**1.` Option 2 für die Probenverdünnung: Messbereich 30-1800 µg/g**

Der Messbereich kann um einen Faktor von 3 erweitert werden, wenn die Proben 1:7500 statt 1:2500 verdünnt werden. Diese Testversion wird empfohlen, wenn hohe Calprotectinkonzentrationen zu erwarten sind.

1.1` CALEX® Cap: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:15 verdünnen (z. B. 50 µL Extrakt und 700 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

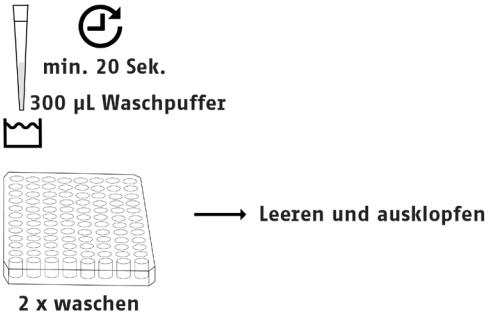



1.2` Manuelle Extraktion, Smart-Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:150 verdünnen (z. B. 20 µL Extrakt und

2980 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

2. Einen Mikrotiterplattenhalter mit ausreichender Menge an Streifen für die Bestimmung der erforderlichen Anzahl von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort in den Folienbeutel mit den Trockenmittelpackungen zurücklegen und den Beutel wieder verschliessen. Gekühlt lagern.
3. Die beschichteten Wells zweimal mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen.

Wichtiger Hinweis: Eine minimale Inkubationszeit des Waschpuffers im Well von 20 Sekunden muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.



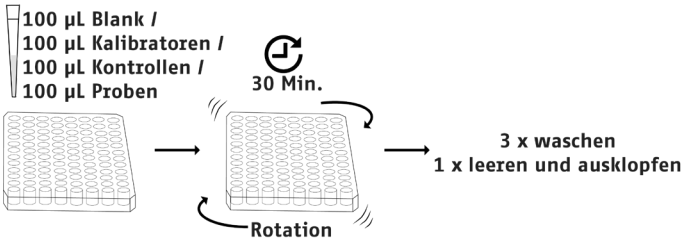

4a. 100 µL Inkubationspuffer (Leerprobe) und

Je 100 µL Kalibrator A-E in die entsprechenden Wells pipettieren.

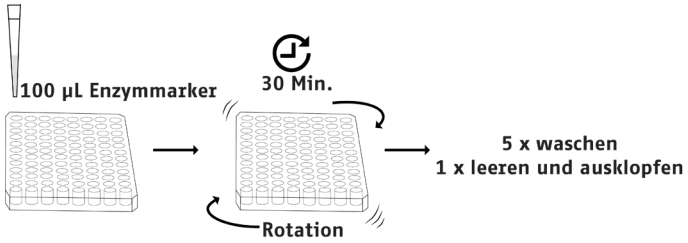
4b. Je 100 µL der Kontrollen tief und hoch in die entsprechenden Wells pipettieren.

4c. Je 100 µL der verdünnten Proben in die nächsten Wells pipettieren.

5. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei ~450 U/min 30 + max. 5 Minuten bei 18-28 °C inkubieren (siehe technische Vorsichtsmassnahmen - ELISA).
6. Abdeckfolie entfernen und entsorgen. Die Wells entleeren und 3 x mit jeweils mind. 300 µL Waschpuffer waschen (siehe technische Vorsichtsmassnahmen - ELISA). Waschpuffer ausschütten und Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen

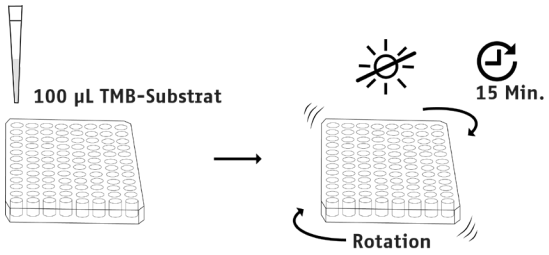



7. 100 µL des Enzymmarkers in jedes Well pipettieren.
8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei ~450 U/min 30 ±5 Minuten bei 18-28 °C inkubieren.
9. Abdeckfolie entfernen und entsorgen. Die Wells entleeren und 5 x mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen.

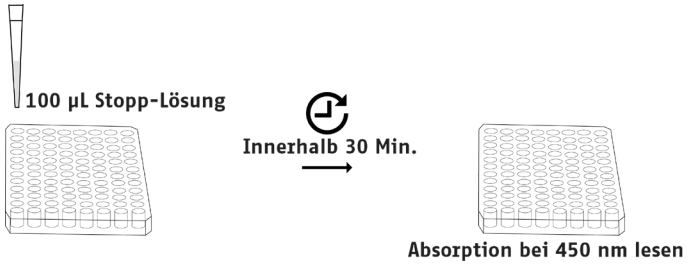



Wichtiger Hinweis: TMB-Substrat vor dem Gebrauch auf 18-28 °C äquilibrieren lassen.

10. 100 µL des TMB-Substrats in jedes Well pipettieren.
11. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei ~450 U/min 15 ±2 Minuten bei 18-28 °C inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.




12. 100 µL der Stopp-Lösung in jedes Well pipettieren. Vorhandene Luftbläschen mit einer Pipettenspitze entfernen. Innerhalb der nächsten 30 Minuten mit Schritt 13 fortfahren.
13. Absorption in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm messen.




## QUALITÄTSKONTROLLE

Für den erfolgreichen Einsatz des Produktes ist eine gründliche Kenntnis der Gebrauchsanweisung notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung präziser Labormethoden und die genaue Befolgung der Gebrauchsanweisung erreicht.

Das BÜHLMANN fCAL® ELISA Kit wird mit zwei Kontrollen geliefert: Kontrolle, tief und hoch. Die entsprechenden Referenzwerte der Kontrollen sind im QC-Datenblatt, das jedem Kit beiliegt, angegeben. Die auf dem QC-Datenblatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten für den direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Sollten die Ergebnisse der Kontrollen tief und/oder hoch ausserhalb des im QC-Datenblatt angegebenen Bereichs liegen, wird empfohlen, den ganzen Test als ungültig anzusehen.

Es wird empfohlen, neben den Kitkontrollen auch interne Kontrollproben gemäss örtlicher und nationaler

Bestimmungen zu verwenden. Die Verwendung von internen Kontrollproben wird empfohlen, um die Gültigkeit der Ergebnisse von Tag zu Tag zu gewährleisten. Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für fäkales Calprotectin gibt, wird empfohlen, einen Pool von positiven Stuhlextrakten mit normalen und pathologischen Konzentrationen als interne Qualitätskontrolle mitzuführen

Die Reproduzierbarkeit der Standardkurvenparameter und Kontrollwerte sollte innerhalb gängiger Laborakzeptanzgrenzwerte liegen. Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Punkte zu überprüfen: i) Pipettieren, Temperaturkontrolle und Zeitmesser, ii) Einstellungen des ELISA Photometers, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubationsbedingungen, v) das TMB-Substrat sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit; vii) Absauge- und Waschmethoden.

## STANDARDISIERUNG

Die BÜHLMANN fCAL® ELISA Kalibratorwerte werden in mehrfachen Messdurchgängen mithilfe von internem Referenzmaterial berechnet, das auf Humanserum und dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Messverfahren basiert. Die Calprotectinkonzentration des internen Referenzmaterials wurde mithilfe von gereinigtem MRP8/14 aus humanen Granulozyten als primäres Referenzmaterial ermittelt.

## BERECHNUNG UND ERGEBNISSE

### Standardkurve

Es wird ein Softwareprogramm empfohlen, das die folgenden Berechnungen ausführen kann: Abzug des OD Leerwerts von jedem Kalibrator-Well zur Berechnung des Kalibratorwerts und die Anpassung der Standardkurve mithilfe einer 4 Parameter Logistik (4 PL).

### Kontrollen und Proben

Es wird ein Softwareprogramm empfohlen, das die folgenden Berechnungen ausführen kann: Abzug des OD Leerwerts von jedem Kontroll- und Proben-Well und Berechnung der Calprotectinkonzentrationen der Kontrollen und Proben in jedem Well mithilfe der ermittelten Standardkurve in µg/g.

### Messbereich 10-600 µg/g

Wenn die „Lower Range“ ELISA Variante ausgewählt wird, müssen die Kalibratorkonzentrationen wie folgt eingestellt werden: 10, 30, 100, 300 und 600 µg/g Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren (bei Verwendung einer anderen Verdünnung als 1:2500) müssen für den Erhalt der endgültigen Ergebnisse mit den Ergebnissen multipliziert werden.

In Tabelle 12 und Abbildung 1 sind Beispiele für Ergebnisse und die Standardkurve angegeben. Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Für jeden Probensatz, der getestet werden soll, muss eine Standardkurve erstellt werden.

### Messbereich 30-1800 µg/g

Wenn die „Extended Range“ ELISA Variante ausgewählt wird, müssen die nominalen Kalibratorwerte wie folgt eingestellt werden: 30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren (bei Verwendung einer anderen Verdünnung als 1:7500) müssen für den Erhalt der endgültigen Ergebnisse mit den Ergebnissen multipliziert werden.

In Tabelle 15 und Abbildung 4 sind Beispiele für Ergebnisse und die Standardkurve angegeben. Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Für jeden Probensatz, der getestet werden soll, muss eine Standardkurve erstellt werden.

## LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.
- Die Testergebnisse sollten zusammen mit Informationen, die aus der klinischen Beurteilung des Patienten und anderer diagnostischer Verfahren verfügbar sind, interpretiert werden.
- Bei der CED-Überwachung gibt es Hinweise, dass mehrfache Messungen von Calprotectin im Stuhl, die in bis zu 4-wöchigen Zeitabständen durchgeführt werden, die höchste diagnostische Genauigkeit bei der Vorhersage eines klinischen Rezidivs bei Patienten haben (Ref. 19-20).
- Patienten, die nichtsteroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) einnehmen, haben möglicherweise erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl.
- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinspiegel im Stuhl aufweisen (Ref. 21-24).

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

### I. Unterscheiden einer organischen Erkrankung von einer funktionellen gastrointestinalen Erkrankung

Die Ergebniskategorien basieren auf Daten aus klinischen Studien, die von BÜHLMANN durchgeführt wurden, und sind Empfehlungen von BÜHLMANN. Alle Testergebnisse sollten zusammen mit Informationen, die aus den klinischen Symptomen des Patienten, der Anamnese und anderen klinischen Ergebnissen und Laborbefunden verfügbar sind, interpretiert werden:

#### Klinische Schwellenwerte

Ergebnisse aus 58 klinischen Proben von mit RDS diagnostizierten Patienten und aus 131 klinischen Proben von mit CED diagnostizierten Patienten aus einer internationalen klinischen Studie wurden herangezogen, um die in Tabelle 4 angegebenen Werte zu erhalten.

| Calprotectin-konzentration | Interpretation | Nachuntersuchung |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normal | Keine |
| 80 – 160 µg/g | Grauzone/grenzwertig | Nachbeobachtung innerhalb 4 – 6 Wochen |
| > 160 µg/g | Erhöht | Nach Bedarf wiederholen |

Tabelle 4

**Calprotectinwerte unterhalb 80 µg/g**

Calprotectinwerte im Stuhl <80 µg/g deuten nicht auf eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes hin. Patienten mit niedrigen Calprotectinspiegeln benötigen vermutlich keine invasiven Untersuchungen, um die Entzündungsursache zu bestimmen.

**Calprotectinwerte zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g**

Calprotectinspiegel im Stuhl im Mittelbereich zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g, die auch als Grauzonenspiegel bezeichnet werden, deuten nicht direkt auf eine aktive Entzündung hin, die eine sofortige Nachuntersuchung mit invasiven Tests erfordert. Das Vorliegen einer Entzündung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Entzündungsstatus wird eine erneute Überprüfung der Calprotectinspiegel im Stuhl nach 4 bis 6 Wochen empfohlen.

**Calprotectinwerte oberhalb von 160 µg/g**

Calprotectinwerte im Stuhl >160 µg/g deuten auf eine neutrophile Infiltration des gastrointestinalen Traktes hin; daher kann dies ein Zeichen dafür sein, dass eine aktive entzündliche Erkrankung vorliegt. Entsprechende weiterführende Untersuchungen durch Fachärzte zur Erhaltung einer klinischen Gesamtdiagnose werden empfohlen.

**Klinische Beurteilung**

Die Fähigkeit des BÜHLMANN fCAL® ELISA zwischen Patienten mit CED und anderen nichtentzündlichen GI-Erkrankungen einschliesslich RDS zu unterscheiden, wurde in einer klinischen Studie mit insgesamt 337 erwachsenen und pädiatrischen Patienten untersucht. Einhundertfünfunddreissig (135) Patienten hatten die endgültige Diagnose einer CED (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder unklare Colitis), 130 Patienten hatten RDS und 72 Patienten stellten sich mit Bauchschmerzen und/oder Durchfall bzw. anderen GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen vor (siehe Tabelle 5). Die endgültige Diagnose wurde durch Endoskopie sowie andere klinische Befunde gestützt.

Die Differenzierung zwischen CED und GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen einschliesslich RDS wurde mit einer klinischen Empfindlichkeit von 93,3% bei 80 µg/g und einer klinischen Spezifität von 83,7% bei 160 µg/g erreicht. Die ROC-Kurvenanalyse ergab einen AUC von 0,923 (siehe Tabelle 6).

Die Differenzierung zwischen CED und RDS wurde mit einer klinischen Empfindlichkeit von 93,3% bei 80 µg/g und einer klinischen Spezifität von 85,4% bei 160 µg/g erreicht. Die ROC-Kurvenanalyse ergab einen AUC von 0,933 (siehe Tabelle 8).

Die durch ROC-Analyse definierte optimale Kombination von Toleranzgrenzen für diese Patientenpopulationen betrug 80 µg/g und 160 µg/g Calprotectin, welches etwas stringenter ist als die Kombination einer empfindlicheren unteren Toleranzgrenze von **50 µg/g mit geringerer Spezifitätsleistung** und einer oberen Toleranzgrenze von **200 µg/g mit etwas geringerer Empfindlichkeit** (Tabelle 7 und 9).

## II. CED-Überwachung

**Klinische Schwellenwerte und Beurteilung**

Die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl ist eine zuverlässige und einfache Hilfe bei der Überwachung von CED-Patienten (Ref. 7-18).

Die Korrelation von Calprotectin-Spiegeln und dem Entzündungszustand der Darmschleimhaut von Patienten gemäss endoskopischer Untersuchungen wurde in drei unabhängigen Studien mithilfe von BÜHLMANN Calprotectin Tests bestimmt (Tabelle 10). Die diagnostische Aussagekraft von Calprotectin bei der Vorhersage von klinischen Remissionen und Rezidiven gemäss Patientensymptomen, die klinischen Aktivitätsindizes sowie der ungeplante Bedarf für eine Therapieeskalation, Hospitalisierung oder einen Notfall wurde in drei Studien mithilfe von BÜHLMANN Calprotectin Tests bestimmt (Tabelle 11).

Die dargestellten Ergebniskategorien sind Empfehlungen und ihre Erstellung basiert auf den zusammengefassten Erkenntnissen der publizierten Toleranzgrenzen und klinischen Leistungsstudien. Es ist angeraten, dass Ärzte individuelle Patienten-Schwellenwerte durch Bestimmung des Calprotectin-Spiegelausgangswerts des Patienten während der Krankheitsremission festlegen.

**Calprotectinwerte unterhalb 100 µg/g:**

Calprotectin-Spiegel im Stuhl unterhalb 100 µg/g können Patienten mit niedrigem Risiko eines klinischem Rezidivs in endoskopischer Remission verlässlich identifizieren. Invasive endoskopische Verfahren können bei diesen Patienten vermieden werden (Ref. 7-18).

**Calprotectinwerte zwischen 100 und 300 µg/g:**

Calprotectin-Spiegel im Stuhl von 100 bis 300 µg/g können auf die Notwendigkeit einer engmaschigeren Überwachung im folgenden Zeitraum hinweisen, um Tendenzen der Krankheitsentwicklung zu beurteilen.

**Calprotectinwerte oberhalb 300 µg/g:**

Bei Calprotectinspiegeln im Stuhl von über 300 µg/g sollte die Bestimmung wiederholt und bei Bestätigung erhöhter Spiegel weitere Untersuchungsverfahren veranlasst werden (Ref. 7-18).

## LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® ELISA wurden mit der manuellen Extraktionsmethode ermittelt, soweit nicht anders angegeben.

**Messbereich: 10-600 µg/g**

**Wiederholbarkeit (Intra-Test-Präzision): 1,9 – 8,0%VK**

**Laborinterne Präzision: 5,5 – 14,0% VK**

Die Wiederholbarkeit und laborinterne Präzision wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A2 mit dem Studiendesign 22 Tage x 2 Replikate ermittelt. Zehn extrahierte Stuhlproben wurden getestet. Die Werte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Nachweisgrenze (LoD): 4,2 µg/g**

Die LoD wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A ermittelt und mit Anteilen von weniger als 5% falsch-positiven (α) und weniger als 5% falsch-negativen (β) basierend auf 240 Bestimmungen, mit 80 Leerproben-(Extraktionspuffer) und 160 Niedrigspiegel-Replikaten; und einem **LoB von 0,29 µg/g**. Eine kubische Spline-

Funktion wurde verwendet, um die OD-Werte der Leerproben auf die Calprotectinkonzentrationen in µg/g zu extrapolieren.

**Bestimmungsgrenze (LoQ): 9,8 µg/g**

Vierzig Bestimmungen von zehn Stuhlproben mit Werten zwischen 5,2 und 1254 µg/g wurden durchgeführt, um ein nicht-lineares Präzisionsprofil zu erstellen und eine LoQ basierend auf einem Präzisionsziel von 20% VK zu ermitteln. Im gesamten Standardbereich von 10 bis 600 µg/g wurden genaue Messungen <15% VK erhalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

**Linearität 10-600 µg/g**

Der Linearitätsbereich des BÜHLMANN fCAL® ELISA wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Eine maximale Linearitätsabweichung von ±20% war zugelassen. Bei Werten unterhalb 75 µg/g war eine absolute Differenz von weniger als ±15 µg/g zugelassen (Tabelle 14).

**Genauigkeit / Wiederfindung**

**Gesamtabweichung: -1,1%;**

**Untere Grenze der Übereinstimmung: -17,5%,**

**Obere Grenze der Übereinstimmung: 15,4%**

Vier negative extrahierte Stuhlproben wurden mit ansteigenden Mengen von Calprotectin aus Serumproben versetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

**Hochdosis Hook-Effekt**

Proben mit theoretischen Konzentrationen bis zu 60‘000 µg/g können ohne Begrenzung des Messbereichs des Tests gemessen werden.

**Messbereich: 30-1800 µg/g**

**Wiederholbarkeit (Intra-Test-Präzision): 1,7 – 5,8%VK**

**Laborinterne Präzision: 3,1 – 9,4% VK**

Die Wiederholbarkeit und laborinterne Präzision wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 10 Tage x 2 Läufe x 4 Replikate ermittelt. Es wurden sieben gepoolte Stuhlprobenextrakte untersucht (Tabelle 16).

**Präzision zwischen verschiedenen Chargen: 4,2 – 9,7% VK**

Die Charge zu Charge Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Chargen x 5 Tage x 5 Replikate ermittelt. Sechs extrahierte Stuhlproben wurden analysiert. Für die Datenanalyse wurde ein Random-Effects-Varianz-komponenten-Modell verwendet. Die Werte sind in Tabelle 17 aufgeführt.

**Reproduzierbarkeit (Präzisionsbeurteilungsstudie an mehreren Standorten): 6,4 – 19.0% VK**

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Standorte x 2 Bediener x 5 Tage x 2 Läufe x 4 Replikate ermittelt. Bei den zwei täglich durchgeführten Läufen wechselten die Bediener zwischen zwei verschiedenen ELISA-Photometern und zwei verschiedenen Reagenzchargen. Es wurden insgesamt drei Reagenzchargen in den Studienstandorten verwendet. Es wurden fünf gepoolte Stuhlprobenextrakte getestet (Tabelle 18 und 19).

**Nachweisgrenze (LoD): 12,6 µg/g**

Die LoD wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A2 ermittelt und mit Anteilen von weniger als 5 % falsch-positiven (α) und weniger als 5 % falsch-negativen (β) basierend auf 120 Bestimmungen, mit 60 Leerproben-(Extraktionspuffer) und 60 Niedrigspiegel-Replikaten; und einem **LoB von 8,3 µg/g**.

**Bestimmungsgrenze (LoQ): 21,3 µg/g**

Die LoQ wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A2 basierend auf 60 Bestimmungen und einem Präzisionsziel von 20% VK ermittelt.

**Linearität 30-1800 µg/g**

Der Linearitätsbereich des BÜHLMANN fCAL® ELISA wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Eine maximale Linearitätsabweichung von ±20% war zugelassen. Bei Werten unterhalb 75 µg/g war eine absolute Differenz von weniger als ±15 µg/g zugelassen (Tabelle 20).

**Genauigkeit / Wiederfindung: 96,4 – 102,2%**

Sieben Stuhlprobenextrakte mit Calprotectin-konzentrationen, die den Messbereich des Tests abdecken, wurden mit 180 µg/g Calprotectin in Kalibratormaterial versetzt (gespikt). Das Spiking wurde mit 10% des Probenextraktvolumens durchgeführt. Die „Baseline“ Proben wurden mit der entsprechenden Menge von Inkubationspuffer gespikt. Die „Baseline“ und “Baseline + Spike” Proben wurden in drei Replikaten mit einer Reagenzcharge gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

**Präanalytik**

Die Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® ELISA bezüglich präanalytischer Verfahren wurde mit einem Messbereich von 30 – 1800 µg/g ermittelt.

**Reproduzierbarkeit der Extraktion – manuelle Extraktion: 9,5 – 20,5%**

Die Reproduzierbarkeit der Extraktion wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 10 Extraktionen x 2 Replikate ermittelt. Neun klinische Stuhlproben, einschliesslich Proben mit fester, halbfester und flüssiger Konsistenz, wurden getestet. Die Werte sind in Tabelle 22 aufgeführt.

**Reproduzierbarkeit der Extraktion – CALEX® Cap: 7,9 – 16,9%**

Die Reproduzierbarkeit der Extraktion wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 CALEX® Cap Chargen x 4 Extraktionen x 4 Replikate ermittelt. Fünf klinische Stuhlproben, einschliesslich Proben mit fester, halbfester und flüssiger Konsistenz, wurden getestet. Die Werte sind in Tabelle 23 aufgeführt.

**Methodenvergleich CALEX® Cap vs. manuelle Extraktion**

**Abweichung bei 80 µg/g: 5,9% (95% KI: 1,4 – 12,2%)**

**Abweichung bei 160 µg/g: 12,0% (95% KI: 7,8 – 17,0%)**

**Durchschnittliche Abweichung 10,1% (95% KI: 5,7 – 14,5%)**

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP09-A3 durchgeführt. Zweihundert-einundvierzig (241) klinische Proben wurden mit einer

Charge des CALEX® Cap extrahiert. Die Referenzwerte wurden in Extrakten ermittelt, die mit der manuellen Extraktionsmethode gewonnen wurden. Insgesamt 172 Proben im Messbereich des BÜHLMANN fCAL® ELISA und einem Calprotectin-Referenzkonzentrationsinterval von 30,5 – 1496,6 µg/g wurden bewertet. Einzelextraktionen und Test-bestimmungen wurden mit beiden Methoden durchgeführt. Die Abweichung wurde mithilfe der linearen Regression nach Passing-Bablok und der Bland-Altman-Analyse bestimmt (Tabellen 24 und 25)

## STÖRSUBSTANZEN

Die Anfälligkeit des BÜHLMANN fCAL® ELISA Tests für oral anwendbare Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel, Hämoglobin sowie enteropathologische Mikroorganismen wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP07-A2 mit einem erweiterten Messbereich beurteilt. Eine Abweichung der Ergebnisse höher als 10% wurde als Störeinfluss betrachtet. Es wurde kein Störeinfluss der in Tabelle 26 aufgeführten Substanzen bis zu den angegebenen Konzentrationen nachgewiesen. Es wurde kein Störeinfluss der in Tabelle 27 aufgeführten enteropathologischen Mikroorganismen bis zu den angegebenen Mengen an koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL Stuhlprobenextrakt nach-gewiesen.

# FRANCAIS

## UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN fCAL® ELISA est un test de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de la calprotectine dans les prélèvements de selles humaines destiné à aider à l'évaluation de l'inflammation de la muqueuse intestinale. Les résultats du dosage peuvent aider au diagnostic différenciant une maladie inflammatoire organique du tractus gastro-intestinal (maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou MICI, spécifiquement maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable ou SCI) (réf. 1-7), chez les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques et peuvent également aider au suivi d'une MICI (réf. 7-18).

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

## PRINCIPE DU DOSAGE

Le test BÜHLMANN fCAL® ELISA permet la mesure sélective de la calprotectine dans les extraits de selles par ELISA sandwich. La plaque de microtitration du test BÜHLMANN fCAL® ELISA est revêtue d'un anticorps monoclonal de capture (mAc) hautement spécifique des complexes hétérodimères et polymères de la calprotectine. Les extraits d'échantillons de selles de patients, les contrôles destinés à la détermination de l'acceptabilité des analyses ELISA et les calibrateurs sont chargés dans des puits de la plaque de microtitration. Après des étapes d'incubation de 30 minutes à température ambiante et de lavages, un anticorps de détection (Ac) conjugué à la péroxydase de raifort (HRP) détecte les molécules de calprotectine liées à l'anticorps de capture sur la plaque. Après des étapes d'incubation et de lavages supplémentaires, le substrat chromogène, la TMB (tétraméthylbenzidine), est ajouté (formation de la couleur bleue) suivi d'une solution stoppant la réaction (virement de la couleur en jaune). L'absorbance est mesurée à 450 nm. La concentration finale en calprotectine en µg/g dans les échantillons de patients est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage générée à partir des valeurs mesurées des calibrateurs.

## RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

| Réactifs | Quantité | | Code | Reconstitution |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Tampon d'extraction** | 3 flacons x 125 mL | 6 flacons x 125 mL | B-CAL-EX | Prêt à l'emploi |
| **Plaque de microtitration** revêtue d'un mAc anti-calprotectine | 12 barrettes de 8 puits avec cadre | 2 x 12 barrettes de 8 puits avec cadre | B-CAL-MP | Prêt à l'emploi |
| **Film adhésif** | 3 exemplaires | 6 exemplaires | - | Prêt à l'emploi |
| **Tampon de lavage concentré 10x** avec conservateurs | 1 flacon x 100 mL | 2 flacons x 100 mL | B-CAL-WB | Diluer chaque flacon avec 900 mL de $H_2O$ déionisée |
| **Tampon d'incubation** avec conservateurs | 2 flacons x 125 mL | 3 flacons x 125 mL | B-CAL-IB | Prêt à l'emploi |
| **Calibrateurs A à E**[1) 2)] Calprotectine dérivée de sérum dans une matrice tamponnée avec des conservateurs | 5 flacons x 1 mL | 5 flacons x 1 mL | B-CAL-CASET | Prêt à l'emploi |
| **Contrôle Haut/ Bas**[3)] Calprotectine dérivée de sérum dans une matrice tamponnée avec des conservateurs | 2 flacons x 1 mL | 2 flacons x 1 mL | B-CAL-CONSET | Prêt à l'emploi |
| **Marqueur enzymatique** Ac anti-calprotectine conjugué à la HRP | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-CAL-EL | Prêt à l'emploi |
| **Substrat TMB** TMB dans un tampon citrate | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-TMB12 | Prêt à l'emploi |
| **Solution stop** acide sulfurique 0,25 M | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-STS12 | Prêt à l'emploi **Agent corrosif** |

Tableau 1

[1)] Les concentrations réelles en calprotectine des calibrateurs A à E sont respectivement de 4, 12, 40, 120 et 240 ng/mL. Pour la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses, les valeurs des calibrateurs doivent être établies à : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine. Cette attribution correspond à la dilution finale au 1:2500e de l'échantillon dans la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses.

[2)] Si vous choisissez la procédure ELISA étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être établies à : 30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de calprotectine. Cette attribution correspond à la dilution finale au 1:7500e de l'échantillon dans la procédure ELISA étendue.

[3)] Les contrôles contiennent des quantités de calprotectine humaine native spécifiques à chaque lot. Se référer à la fiche additionnelle de QC pour les concentrations réelles.

## STOCKAGE ET STABILITÉ DES RÉACTIFS ET DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

| **Réactifs scellés/non ouverts** | |
|---|---|
| Stocker à 2-8 °C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes. | |
| **Réactifs ouverts/reconstitués** | |
| Tampon d'extraction | Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Plaque de microtitration | Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant les sachets de dessiccateur puis refermer soigneusement le joint.<br>Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Tampon de lavage dilué | Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Tampon d'incubation | |
| Calibrateurs | |
| Contrôles | |
| Marqueur enzymatique | |
| Substrat TMB | |
| Solution stop | |

Tableau 2

## RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS SUR DEMANDE

### Dispositifs d'extraction de selles

Les dispositifs d'extraction de selles décrits dans le tableau 3 ne sont pas fournis avec le kit. Les dispositifs d'extraction sélectionnés doivent être commandés séparément.

| **Kits de dispositifs d'extraction** | **Quantité** | **Code** |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Coffrets de 50, 200 ou 500 tubes disponibles, chaque tube contenant 5 mL de tampon d'extraction<br>Prêt à l'emploi | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 tubes, spatules et fonds de tube | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 tubes constitués d'un tube, d'un cône et d'un embout doseur, chacun rempli de 1,3 mL de tampon d'extraction<br>Prêt à l'emploi | B-CAL-SO50 |

Tableau 3

## MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

### Procédure d'extraction

- Pipettes de précision de 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables
- Tubes de polystyrène ou de polypropylène jetables pour le transfert des extraits (en option)
- Hotte à flux laminaire
- Vortex multi-tubes/Mélangeur vortex
- Microcentrifugeuse (≥ 3000 x g)
- Centrifugeuse (≥ 500 x g)
- Dispositifs d'extraction (voir le tableau 3 ci-dessus) ou pour la procédure d'extraction manuelle :
  - Anses d'inoculation jetables de 10 µL
  - Tubes de 15 ml en polypropylène avec bouchons à visser requis
  - Balance de précision (10-200 mg)

### Procédure ELISA

- Pipettes de précision de 10 µL, 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Éprouvette graduée de 1000 mL pour la dilution du tampon de lavage
- Laveur automatique de micro-plaques (voir précautions techniques) ou pissette pour le tampon de lavage
- Agitateur de plaques de microtitration (voir précautions techniques)
- Papier absorbant
- Lecteur de plaques de microtitration pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

### Règles de sécurité

- Les calibrateurs et les contrôles de ce test contiennent des composants d'origine humaine. Bien qu'ils aient été testés négatifs à l'antigène de surface du VHB, au VHC et aux anticorps du VIH1/2, les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL), en respectant les précautions appropriées.
- La solution stop contient de l'acide sulfurique (0,25 M). Le réactif est irritant pour les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement à grande eau.
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact accidentel, rincer immédiatement à grande eau pour éviter tout risque d'irritation ou de brûlures.
- Traiter les réactifs et les produits chimiques comme des déchets dangereux conformément aux lignes directrices ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

### Précautions techniques

#### Composants du kit

- Le procédé de production entraîne la formation de résidus dans les puits des plaques de microtitration. Ces résidus sont éliminés dans l'étape de lavage (procédure de dosage, étape 3) et n'affectent pas les résultats.
- Les composants ne doivent pas être utilisés après la date de péremption imprimée sur les étiquettes.

- Ne pas mélanger ou utiliser les composants de kits de numéros de lot différents.
- S'assurer impérativement qu'aucune contamination ne se produit entre réactifs, échantillons ou puits.
- Laisser les réactifs s'équilibrer à température ambiante. Mélanger vigoureusement (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les micropuits ne peuvent pas être réutilisés.

**Procédure d'extraction manuelle**

- Pour obtenir des résultats quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'intégralité des selles ajoutées dans le tampon d'extraction. Toute contamination au sommet du tube d'extraction doit être évitée. Une petite quantité de particules insolubles peut demeurer dans le tube après le mélange.

**Procédure ELISA**

- Dans la procédure ELISA, les étapes de lavage sont essentielles pour garantir des résultats reproductibles. Laisser le tampon de lavage incuber dans les puits pendant un minimum de 20 secondes avant de le retirer.
- Si un laveur automatique de plaques est utilisé, il est fortement recommandé d'utiliser le « mode plaque », c'est-à-dire que chaque étape du procédé (distribution/aspiration) est mise en œuvre sur toutes les barrettes, séquentiellement, avant que l'instrument ne passe au cycle de lavage suivant. De cette façon, un temps d'incubation minimum est garanti.
- Il est obligatoire de respecter le nombre de cycles de lavages indiqué pour l'obtention de résultats fiables.
- L'agitateur de plaque doit être ajusté à environ 450 rpm (7,5 Hz). Une fréquence de rotation supérieure peut avoir pour conséquence une faible linéarité de dilution pour les valeurs comprises entre 300/900 et 600/1800 µg/g. Un mouvement de rotation est préférable à un mouvement horizontal.
- Pour garantir que la réaction entre l'antigène et l'anticorps soit terminée, le temps d'incubation de l'étape 5 doit être de 30 minutes minimum. Des temps d'incubation modérément supérieurs (jusqu'à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- Le marqueur enzymatique est inactivé par l'oxygène et est hautement sensible à l'azide de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux chlorohydrocarbures aromatiques couramment rencontrés dans l'alimentation en eau des laboratoires. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée de qualité élevée.
- Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être générée à chaque fois que le dosage est effectué (pour chaque plaque ou plaque partielle).
- Si la concentration initiale d'un échantillon inconnu est plus élevée que celle du calibrateur le plus concentré, calibrateur E, l'échantillon peut être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure de dosage. Le facteur de dilution résultant doit être pris en compte pour le calcul des résultats.

## PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Moins de 1 g d'échantillon primaire de selles est exigé par la procédure d'extraction. Récupérer l'échantillon de selles dans des tubes ordinaires.

Important : l'échantillon doit être collecté sans adjonction de quelque additif chimique ou biologique que ce soit.

**Transport des échantillons**

Les échantillons de selles doivent être reçus par le laboratoire en charge du traitement dans les 3 jours qui suivent la collecte. Les échantillons de selles peuvent être expédiés à température ambiante ou réfrigérés.

**Stockage des échantillons**

Les échantillons de selles doivent être réfrigérés à 2-8 °C et extraits dans les 3 jours qui suivent leur réception par le laboratoire. Ne pas stocker les échantillons à des températures supérieures à l'ambiante.

## EXTRACTION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES ET STOCKAGE DES EXTRAITS

### 1. CALEX® Cap

#### 1.1 Procédure d'extraction

Suivre les instructions d'utilisation fournies avec le dispositif CALEX® Cap (Code B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositif CALEX® Cap : Les échantillons de selles liquides peuvent être directement pipetés dans le dispositif CALEX® Cap. Dévisser le bouchon bleu et pipeter 10 µL d'échantillon de selles dans le dispositif. Reboucher le dispositif CALEX® Cap et passer à l'étape d'homogénéisation au vortex conformément à la procédure d'extraction décrite et illustrée dans les instructions d'utilisation livrées avec le dispositif CALEX® Cap.

Important : Après extraction, centrifuger le dispositif CALEX® Cap pendant 5 minutes à 500-3000 x g avant de poursuivre la procédure de dosage.

#### 1.2 Stockage des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus avec le dispositif CALEX® Cap sont stables à température ambiante pendant 3 jours et à 2-8 °C jusqu'à 6 jours. Pour un stockage plus long, congeler les extraits à -20 °C. Les extraits congelés sont stables pendant une durée pouvant aller jusqu'à 23 mois.
Les extraits CALEX® Cap peuvent être directement congelés et stockés dans le dispositif CALEX® Cap. Les extraits peuvent être soumis à quatre cycles de congélation-décongélation. Avant la mesure, laisser les extraits congelés s'équilibrer à température ambiante, les mélanger vigoureusement au vortex pendant 10 secondes et centrifuger pendant 5 minutes à 500-3000 x g.

### 2. Autres dispositifs d'extraction

#### 2.1 Procédures d'extraction

Suivre les instructions d'utilisation fournies avec le dispositif d'extraction correspondant :

- Dispositif d'extraction de selles Roche (code 10745804322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (code : B-CAL-RD).

- ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50).

Important : Après extraction à l'aide du dispositif BÜHLMANN Smart-Prep et du ScheBo® Quick-Prep™, centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 3000 x g. Alternativement, transférer l'homogénat dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g. Décanter le surnageant dans un tube neuf étiqueté avant de poursuivre la procédure de dosage.

### 2.2 Stockage des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus à l'aide des dispositifs Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ sont stables à 2-8 °C jusqu'à 7 jours ou à -20 °C pendant 36 mois.

## 3. Extraction manuelle

### 3.1 Procédure d'extraction

1. Étiqueter et peser les tubes en polypropylène vide avec l'anse d'inoculation. Noter le poids (tare).
2. Prélever 50 à 100 mg d'échantillon de selles au moyen de l'anse d'inoculation et la placer dans le tube pré-pesé avant de repeser celui-ci (poids total). Éviter de prélever les fibres alimentaires présentes dans l'échantillon pendant le processus d'échantillonnage.
3. Calculer la quantité nette d'échantillon en soustrayant la tare du poids total, casser l'anse d'inoculation et laisser sa partie inférieure dans le tube.
4. Ajouter le tampon d'extraction selon la formule x mg de selles x 49 = y µL de tampon d'extraction (par exemple 50 mg de selles + 2450 µL de tampon) dans le tube et refermer celui-ci.
5. Extraire les échantillons en
   - Mélangeant vigoureusement au vortex (multitubes) le tube d'extraction contenant le tampon et l'échantillon de selles à la vitesse la plus élevée pendant 30 secondes.
   - Incubant ensuite le tube d'extraction pendant 25 +/-5 minutes sur un agitateur de plaque à environ 400 rpm. L'anse d'inoculation à l'intérieur du tube sert à améliorer l'agitation.
   - Mélangeant à nouveau vigoureusement au vortex le tube d'extraction pendant 30 secondes.
6. Transférer 1,5 mL d'homogénat dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g.
7. Décanter le surnageant dans un tube neuf étiqueté avant de poursuivre la procédure de dosage, ou stocker les extraits en se référant à la rubrique Stockage des extraits.

### 3.2 Stockage des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus par extraction manuelle peuvent être stockés à 2-8 °C pendant 7 jours ou à -20 °C pendant 36 mois.

## GAMMES DE TRAVAIL

Le dosage peut être mis en œuvre selon les procédures ELISA à valeurs basses ou étendues. La procédure adaptée doit être choisie en fonction de la concentration en calprotectine attendue :

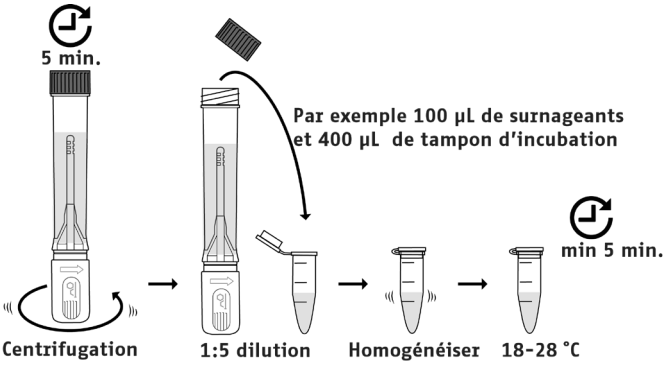
- Pour les échantillons contenant jusqu'à 600 µg/g de calprotectine, choisir la procédure à valeurs basses (gamme de 10-600 µg/g).
- Si la concentration des échantillons tend à dépasser 600 µg/g, choisir la procédure étendue (gamme de 30-1800 µg/g).

## PROCEDURE DE DOSAGE

Important : Laisser tous les réactifs s'équilibrer pendant 30 minutes minimum à 18-28 °C avant utilisation. Seuls les extraits de selles doivent être dilués. Les calibrateurs et les contrôles sont prêts à l'emploi.

### 1. Option de dilution d'échantillon 1 : Gamme 10-600 µg/g

1.1. Dispositif CALEX® Cap : Diluer les extraits de selles au 1:5e avec le tampon d'incubation (par exemple 100 µL d'extrait pour 400 µL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

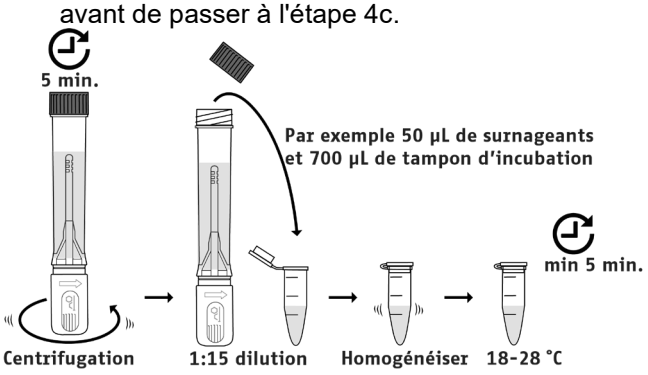



1.2 Extraction manuelle, Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™: Diluer les extraits de selles au 1:50e avec le tampon d'incubation (par exemple 20 µL d'extrait pour 980 µL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

### 1.` Option de dilution d'échantillon 2 : Gamme 30-1800 µg/g

La gamme de dosage peut être étendue d'un facteur 3 en diluant les échantillons au 1:7500e au lieu du 1:2500e. Cette procédure est recommandée lorsque des concentrations élevées en calprotectine sont attendues.

1.1` Dispositif CALEX® Cap : Diluer les extraits de selles au 1:15e avec le tampon d'incubation (par exemple 50 µL d'extrait pour 700 µL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

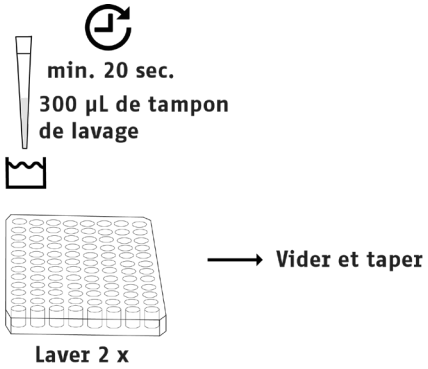



1.2` Extraction manuelle, Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : Diluer les extraits de selles au 1:150e avec

le tampon d'incubation, en utilisant par exemple 20 µL d'extrait pour 2980 µL de tampon d'incubation. Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

2. Préparer un cadre de plaque avec suffisamment de barrettes pour tester le nombre requis de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du cadre et les placer immédiatement dans la pochette prévue à cet effet avec les sachets de dessiccateur. Conserver au réfrigérateur.
3. Laver deux fois les puits coatés avec minimum 300 µL de tampon de lavage par puits. Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant.

Important : Laisser le tampon de lavage dans les puits pendant un minimum de 20 secondes à chaque étape de lavage.



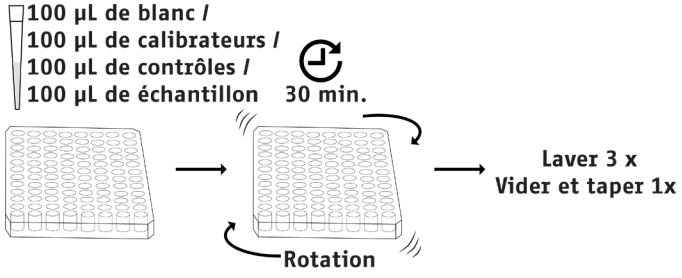

4a. Pipeter 100 µL de tampon d'incubation (blanc) et

Pipeter 100 µL des calibrateurs A-E dans les puits correspondants.

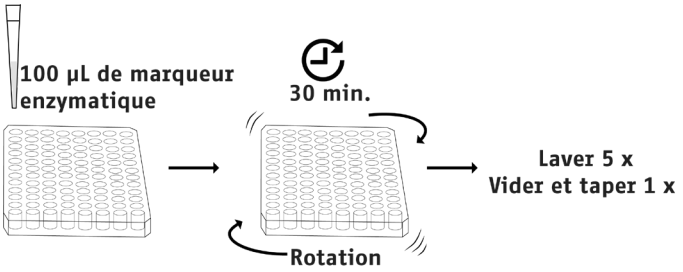
4b. Pipeter 100 µL des contrôles haut et bas dans les puits correspondants.

4c. Pipeter 100 µL de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.

5. Couvrir la plaque à l'aide d'un film adhésif et incuber pendant 30 + 5 minutes maximum sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C (voir précautions techniques – procédure ELISA).
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider les puits puis les laver trois fois, avec au moins 300 µL de tampon de lavage par puits (voir précautions techniques – procédure ELISA). Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant

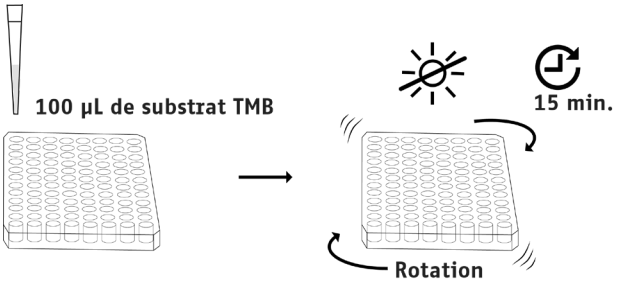



7. Pipeter 100 µL de marqueur enzymatique dans tous les puits.
8. Couvrir la plaque d'un film adhésif et incuber pendant 30 ±5 min sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C.
9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider les puits et les laver cinq fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage par puits. Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant.

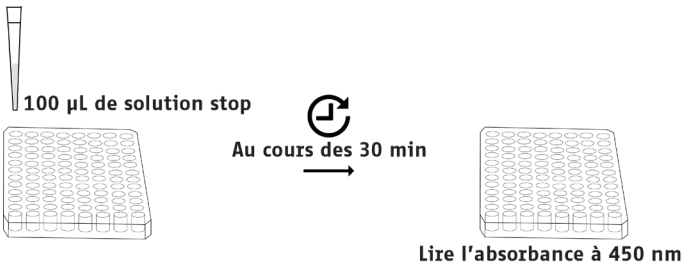



Important : Laisser le substrat TMB s'équilibrer à 18-28 °C.

10. Pipeter 100 µL de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
11. Couvrir la plaque d'un film adhésif, protéger la plaque de la lumière directe et incuber pendant 15 ±2 min sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C.




12. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits. Retirer les bulles d'air avec une pointe de pipette. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes qui suivent.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.




## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis et en suivant fidèlement les présentes instructions d'utilisation.

Le coffret BÜHLMANN fCAL® ELISA est livré avec deux contrôles, haut et bas. Les valeurs de référence correspondantes aux contrôles sont indiquées dans la fiche de données de contrôle qualité (QC) fournie dans chaque coffret. Les valeurs et les plages d'acceptabilité indiquées dans la fiche de données QC se réfèrent toujours au lot actuel et doivent être utilisées pour la

comparaison directe des résultats. Si les résultats des contrôles haut et/ou bas sont hors gamme indiquée dans la fiche de données QC, il est recommandé de considérer l'ensemble de la série comme invalide.

Il est recommandé d'utiliser des échantillons de contrôle interne, en plus des contrôles du kit, en fonction des réglementations locales et nationales. L'utilisation d'échantillons de contrôle interne est conseillée pour garantir la validité des résultats d'un jour à l'autre. Comme il n'existe pas de contrôle commercial pour la calprotectine fécale, nous recommandons l'utilisation d'un pool d'extraits de selles avec des niveaux normaux et pathologiques pour le contrôle qualité interne.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs de contrôles doit se situer dans les limites d'acceptabilité établies par le laboratoire. Si les performances du dosage ne répondent pas aux limites établies et que la répétition a exclu les erreurs de technique, contrôler les problèmes suivants : i) dispositifs de pipetage, de régulation de température et de chronométrage ; ii) réglages du lecteur ELISA ; iii) dates de péremption des réactifs ; iv) conditions de stockage et d'incubation ; v) la solution de substrat TMB doit être incolore ; vi) pureté de l'eau ; vii) méthodes d'aspiration et de lavage.

## STANDARDISATION

Les valeurs des calibrateurs BÜHLMANN fCAL® ELISA ont été attribuées par de multiples séries de mesure en utilisant un matériel de référence interne à base de sérum humain et le protocole du test BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentration en calprotectine du matériel de référence interne a été établie en utilisant du MRP8/14 purifié à partir de granulocytes humains en tant que matériel de référence primaire.

## CALCUL DES RÉSULTATS DU TEST

### Courbe d'étalonnage

Il est recommandé d'utiliser un logiciel capable d'effectuer les calculs suivants : soustraction de la valeur de DO du blanc de chaque puits de calibrateur pour calculer la valeur de calibrateur. Établir une courbe d'étalonnage en utilisant un ajustement logistique à 4 paramètres (4 PL).

### Contrôles et échantillons

Il est recommandé d'utiliser un logiciel capable d'effectuer les calculs suivants : soustraction de la valeur de DO du blanc de chaque puits de contrôle/échantillon. Calculer la concentration en calprotectine du contrôle/de l'échantillon dans chaque puits, en µg/g, en utilisant la courbe d'étalonnage établie.

### Gamme 10-600 µg/g

Si vous sélectionnez la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses, les concentrations des calibrateurs doivent être établies à : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par les facteurs de dilution supplémentaires (si une dilution finale différente du 1:2500[e] a été réalisée) pour obtenir les résultats finaux.

Des exemples classiques sont reportés dans le tableau 12 (résultats) et la figure 1 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'échantillons à doser.

### Gamme 30-1800 µg/g

Si vous choisissez la procédure ELISA étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être établies à : 30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par les facteurs de dilution supplémentaires (si une dilution finale différente de 1:7500[e] a été réalisée) pour obtenir les résultats finaux.

Des exemples classiques sont reportés dans le tableau 15 (résultats) et la figure 4 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'échantillons à doser.

## LIMITES

- Les réactifs fournis avec le coffret BÜHLMANN fCAL® ELISA sont exclusivement destinés à la détermination du niveau de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les résultats des tests doivent être interprétés en conjonction avec les informations issues de l'évaluation clinique du patient et des autres procédures diagnostiques.
- Pour le suivi des MICI, il a été suggéré que de multiples mesures de la calprotectine fécale réalisées à des intervalles pouvant aller jusqu'à 4 semaines permettent d'obtenir la meilleure précision diagnostique dans la prédiction de la rechute clinique des patients (réf. 19-20).
- Certains patients prenant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) présenteront des niveaux de calprotectine fécale supérieurs.
- Les résultats peuvent ne pas être cliniquement applicables aux enfants de moins de 4 ans dont les niveaux de calprotectine sont légèrement supérieurs à la normale (réf. 21-24).

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### I. Différenciation entre maladie organique et maladie gastro-intestinale fonctionnelle

Les catégories de résultats se basent sur les données d'études cliniques mises en œuvre par BÜHLMANN et constituent des recommandations de BÜHLMANN. Tous les résultats de test doivent être interprétés en conjonction avec les informations obtenues à partir des symptômes cliniques du patient, ses antécédents médicaux et les autres résultats cliniques et biologiques :

**Valeurs seuils cliniques**

Les résultats provenant de 58 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour un SCI et de 131 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour une MICI, provenant d'une étude clinique internationale, ont été analysés pour obtenir les valeurs décrites dans le tableau 4.

| Concentration en calprotectine | Interprétation | Suite |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normale | Aucune |
| 80 – 160 µg/g | Zone grise/frontière | Suite dans les 4 à 6 semaines |
| > 160 µg/g | Supérieure à la normale | Répéter le cas échéant |

Tableau 4

**Valeurs de calprotectine inférieures à 80 µg/g**

Des valeurs de calprotectine fécale < 80 µg/g n'indiquent pas d'inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est peu probable que les patients présentant de faibles niveaux de calprotectine nécessitent des procédures invasives visant à déterminer la cause de l'inflammation.

**Valeurs de calprotectine comprises entre 80 et 160 µg/g (bornes incluses)**

Des niveaux de calprotectine fécale moyens, compris entre 80 et 160 µg/g, bornes incluses, également qualifiés de niveaux dans la zone grise, ne sont pas directement révélateurs d'une inflammation active exigeant un suivi thérapeutique immédiat par des tests invasifs. Cependant, la présence d'une inflammation ne peut pas être exclue. Il est recommandé de réévaluer les niveaux de calprotectine fécale après 4 à 6 semaines pour déterminer l'état d'inflammation.

**Valeurs de calprotectine supérieures à 160 µg/g**

Des valeurs de calprotectine fécale supérieures à 160 µg/g indiquent une infiltration de neutrophiles dans le tractus gastro-intestinal ; ceci peut signaler la présence d'une maladie inflammatoire active. Des procédures de recherche supplémentaires et appropriées menées par des spécialistes sont suggérées pour obtenir un diagnostic clinique global.

**Évaluation clinique**

La capacité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA à différencier les patients atteints de MICI des autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI, a été testée dans une étude clinique avec un total de 337 patients adultes et pédiatriques. Cent trente-cinq patients (135) présentaient un diagnostic final de MICI (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique ou colite indéterminée), 130 patients souffraient de SCI et 72 patients présentaient des douleurs abdominales et/ou des diarrhées, ou d'autres états non inflammatoires liés au tractus gastro-intestinal (voir tableau 5). Le diagnostic final était étayé par des résultats endoscopiques ainsi que d'autres résultats cliniques.

Une sensibilité clinique de 93,3 % à 80 µg/g et une spécificité clinique de 83,7 % à 160 µg/g peuvent être atteinte dans la différenciation entre MICI et les autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,923 (voir tableau 6).

Une sensibilité clinique de 93,3 % à 80 µg/g et une spécificité clinique de 85,4% à 160 µg/g peuvent être atteinte dans la différenciation entre MICI et le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,933 (voir tableau 8).

La combinaison optimale des seuils pour ces pools de patients a pu être définie par analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) à 80 µg/g et 160 µg/g de calprotectine, ce qui est légèrement plus restrictif que la combinaison **du seuil bas plus sensible de 50 µg/g** mais avec une performance de spécificité inférieure, et **du seuil haut de 200 µg/g** de sensibilité légèrement inférieure (tableaux 7 et 9).

### II. Suivi des MICI

**Seuils cliniques et évaluation**

Le dosage de la calprotectine fécale constitue un moyen simple et fiable d'aider au suivi des patients atteints de MICI (réf. 7-18).

La corrélation entre les niveaux de calprotectine et l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale du patient, évalué par endoscopie, a été déterminée dans trois études indépendantes utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 10). La valeur diagnostique de la calprotectine dans la prédiction de la rémission et de la rechute cliniques, en fonction des symptômes du patient, des indices d'activité clinique, du recours non planifié à une intensification thérapeutique, une hospitalisation ou une intervention d'urgence, a été déterminée dans trois études utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 11).

Les catégories de résultats indiquées sont des recommandations ; elles sont établies en condensant les connaissances des études publiées sur les seuils et performances cliniques. Il est recommandé aux praticiens de santé d'établir des seuils individuels pour chaque patient en déterminant le niveau "basal" de calprotectine du patient pendant les périodes de rémission.

**Valeurs de calprotectine inférieures à 100 µg/g**

Des niveaux de calprotectine fécale en dessous de 100 µg/g peuvent indiquer de façon fiable des patients à faible risque de rechute clinique, en rémission endoscopique pour lesquels des procédures endoscopiques invasives peuvent être évitées (réf. 7-18).

**Valeurs de calprotectine comprises entre 100 et 300 µg/g**

Des niveaux de calprotectine fécale entre 100 et 300 µg/g peuvent indiquer la nécessité d'un contrôle plus rapproché dans la période suivante pour évaluer les tendances d'évolution de la maladie.

**Valeurs de calprotectine supérieures à 300 µg/g**

En cas de niveau de calprotectine fécale supérieur à 300 µg/g, la mesure doit être répétée, et si ces niveaux élevés sont confirmés, des procédures d'investigation supplémentaires doivent être mises en œuvre (réf. 7-18).

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques des performances du test BÜHLMANN fCAL® ELISA ont été établies en utilisant la méthode d'extraction manuelle, à moins que le contraire ne soit précisé.

**Gamme : 10-600 µg/g**

**Répétabilité (précision intra-dosage) : 1,9 - 8,0% CV**

**Précision intra-laboratoire : 5,5- 14,0% CV**

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies en suivant la ligne directrice EP05-A2 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 22 jours x 2 répétitions. Dix échantillons de selles extraites ont été testés. Les valeurs sont présentées dans le tableau 13.

**Limite de détection (LD) : 4,2 µg/g**

La LD a été établie en suivant la ligne directrice EP17-A du CLSI et avec des proportions de faux positifs (α) inférieure à 5 % et de faux négatifs (β) inférieure à 5 % en se basant sur 240 déterminations, avec 80 blancs (tampon d'extraction) et 160 répétitions de faible niveau ; et une **LB de 0,29 µg/g**. Une fonction spline cubique a été utilisée pour extrapoler les valeurs DO des échantillons de blanc aux concentrations en calprotectine en µg/g.

**Limite de quantification (LQ) : 9,8 µg/g**

40 mesures de 10 échantillons de selles avec des valeurs comprises entre 5,2 et 1254 µg/g ont été réalisées pour générer un profil de précision non linéaire et établir une LQ basée sur un objectif de précision de 20 % CV. Des mesures précises < 15 % CV ont été obtenues sur la totalité de la gamme d'étalonnage entre 10 et 600 µg/g. Les résultats sont présentés sur la figure 2.

**Linéarité : 10-600 µg/g**

La linéarité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA a été déterminée en suivant la ligne directrice EP06-A du CLSI. Un écart maximal avec la linéarité de ± 20% était autorisé. Pour les valeurs inférieures à 75 µg/g, une différence absolue de moins de ± 15 µg/g était autorisée (tableau 14).

**Exactitude/Récupération**

**Biais total : -1,1% ;**

**Limite de concordance inférieure : -17,5%,**

**Limite de concordance supérieure : 15,4%**

Quatre échantillons de selles extraites négatifs ont été additionnés de quantités croissantes de calprotectine issues de prélèvements de sérum. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

**« Effet crochet » à dose élevée**

Les échantillons de concentration théorique pouvant atteindre 60 000 µg/g peuvent être dosés sans limiter la gamme de mesure du dosage.

**Gamme : 30-1800 µg/g**

**Répétabilité (précision intra-dosage) : 1,7- 5,8% CV**

**Précision intra-laboratoire : 3,1- 9,4% CV**

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies en suivant la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 10 jours x 2 analyses x 4 répétitions. Sept pool d'extraits d'échantillons de selles ont été testés (tableau 16).

**Précision entre lots : 4,2- 9,7% CV**

La reproductibilité lot à lot a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 3 lots x 5 jours x 5 répétitions. Six échantillons de selles extraites ont été analysés. Un modèle des composantes de la variance à effets aléatoires a été employé pour l'analyse des données. Les valeurs sont présentées dans le tableau 17.

**Reproductibilité (étude d'évaluation de précision multisite) : 6,4– 19,0% CV**

La reproductibilité a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle 3 sites x 2 opérateurs x 5 jours x 2 analyses x 4 répétitions. Pour les deux analyses effectuées quotidiennement, les opérateurs ont alterné entre deux lecteurs ELISA différents et deux lots de réactifs différents. Trois lots de réactifs au total ont été utilisés sur les sites d'études. Cinq pool d'extraits 'échantillons de selles ont été testés (tableau 18 et 19).

**Limite de détection (LD) : 12,6 µg/g**

La LD a été établie en suivant la ligne directrice EP17-A2 du CLSI et avec des proportions de faux positifs (α) inférieure à 5 % et de faux négatifs (β) inférieure à 5 % en se basant sur 120 déterminations, avec 60 blancs (Tampon d'extraction) et 60 répétitions de faible niveau ; et une **LB de 8,3 µg/g**.

**Limite de quantification (LQ) : 21,3 µg/g**

La LQ a été établie en suivant la ligne directrice EP17-A2 du CLSI en se basant sur 60 déterminations et un objectif de précision de 20% CV.

**Linéarité : 30-1800 µg/g**

La linéarité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA a été déterminée en suivant la ligne directrice EP06-A du CLSI. Un écart maximal avec la linéarité de ± 20% était autorisé. Pour les valeurs inférieures à 75 µg/g, une différence absolue de moins de ± 15 µg/g était autorisée (tableau 20).

**Exactitude / Récupération : 96,4 – 102,2%**

Sept extraits d'échantillons de selles avec des niveaux de calprotectine répartis sur la gamme de mesure du test ont été additionnés de calprotectine à 180 µg/g dans du matériel d'étalonnage. L'addition a été mise en œuvre à 10 % du volume d'extrait de l'échantillon. Les échantillons « de base » ont été additionnés de la quantité correspondant de tampon d'incubation. Les échantillons « de base » et « de base + addition » ont été mesurés en trois répétitions avec un lot de réactifs. Les résultats sont présentés dans le tableau 21.

**Pré-analyse**

Les caractéristiques de performance du test BÜHLMANN fCAL® ELISA en ce qui concerne les procédures pré-analytiques ont été établies dans la plage de fonctionnement 30 – 1800 µg/g.

**Reproductibilité de l'extraction – extraction manuelle : 9,5 - 20,5%**

La reproductibilité de l'extraction a été établie en suivant la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 10 extractions x 2 répétitions. Neuf échantillons cliniques de selles, incluant des échantillons de consistance solide, semi-solide et liquide, ont été testés. Les valeurs sont présentées dans le tableau 22.

**Reproductibilité de l'extraction – CALEX® Cap : 7,9 - 16,9%**

La reproductibilité de l'extraction a été établie en suivant la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 3 lots de CALEX® Cap x 4 extractions x 4 répétitions. Cinq échantillons cliniques de selles, incluant des échantillons de consistance solide, semi-solide et liquide, ont été testés. Les valeurs sont présentées dans le tableau 23.

**Comparaison des méthodes CALEX® Cap contre extraction manuelle**

**Biais à 80 µg/g : 5,9% (IC à 95% : 1,4- 12,2%)**

**Biais à 160 µg/g : 12,0% (IC à 95% : 7,8 – 17,0%)**

**Biais moyen : 10,1% (IC à 95% : 5,7 – 14,5%)**

L'étude de comparaison des méthodes a été réalisée en suivant la ligne directrice EP09-A3 du CLSI. Deux cent quarante-et-un (241) échantillons cliniques ont été extraits par un lot du dispositif CALEX® Cap. Les valeurs de référence ont été établies dans des extraits obtenus par la méthode d'extraction manuelle. Au total, 172 échantillons situés dans la gamme de mesure du test BÜHLMANN fCAL® ELISA et un intervalle de concentration de calprotectine de référence de 30,5 à 1496,6 µg/g ont été évalués. Des extractions et dosages simples ont été mis en œuvre avec les deux méthodes. Le biais a été déterminé en utilisant une régression linéaire de Passing-Bablok et une analyse de Bland-Altman (tableaux 24 et 25).

## SUBSTANCES INTERFERENTES

La sensibilité du dosage BÜHLMANN fCAL® ELISA aux produits pharmaceutiques oraux, aux suppléments nutritionnels, à l'hémoglobine ainsi qu'aux micro-organismes entéropathologiques a été évaluée en suivant la ligne directrice EP07-A2 du CLSI, en utilisant la gamme de mesure étendue. Un biais dans les résultats dépassant 10 % a été considéré comme une interférence. Aucune interférence n'a été détectée avec les substances répertoriées dans le tableau 26 jusqu'aux concentrations indiquées. Aucune interférence n'a été détectée avec les micro-organismes entéropathologiques répertoriés dans le tableau 27 jusqu'aux quantités indiquées d'unités formant colonie (UFC) par mL d'extrait de prélèvement de selles.

# ITALIANO

## USO PREVISTO

BÜHLMANN fCAL® ELISA è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane e viene impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto alla diagnosi differenziale tra malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale organiche (malattia infiammatoria intestinale (IBD), nello specifico la malattia di morbo di Crohn o colite ulcerosa (CU)) e funzionali (sindrome dell'intestino irritabile (IBS)) (rif. 1-7) in pazienti con dolore addominale cronico, nonché come supporto al monitoraggio della IBD (rif. 7-18).

Solo per uso di laboratorio.

## PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test BÜHLMANN fCAL® ELISA consente la misurazione selettiva della calprotectina presente in estratti fecali mediante la tecnica ELISA a sandwich. I pozzetti della piastra per microtitolazione di BÜHLMANN fCAL® ELISA sono rivestiti con un anticorpo monoclonale (mAb) di cattura altamente specifico per i complessi eterodimerici e polimerici della calprotectina. Gli estratti dei campioni di feci dei pazienti, i controlli per la determinazione dell'accettabilità di ogni analisi del test ELISA e i calibratori vengono caricati nei pozzetti della micropiastra. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e le fasi di lavaggio, un anticorpo (Ab) di rilevazione coniugato con perossidasi di rafano (HRP) rileva le molecole di calprotectina legate all'anticorpo di cattura che riveste i pozzetti della piastra. Dopo l'incubazione e altre fasi di lavaggio si aggiunge TMB (tetrametilbenzidina, il substrato cromogenico della HRP, che determina la formazione di colore blu), quindi la reazione viene bloccata (e il suo colore vira al giallo). L'assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm. La concentrazione finale di calprotectina (espressa in µg/g di feci) nel campione del paziente è calcolata per interpolazione dalla curva di calibrazione ottenuta dalla misurazione dei calibratori.

## REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

| Reagenti | Quantità | | Codice | Ricostituzione |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Tampone di estrazione** | 3 flaconi x 125 mL | 6 flaconi x 125 mL | B-CAL-EX | Pronte all'uso |
| **Micropiastre** pre-rivestita con mAB anti-calprotectina | 12 strisce da 8 pozzetti con supporto | 2 x 12 strisce da 8 pozzetti con supporto | B-CAL-MP | Pronte all'uso |
| **Foglio sigillante per piastre** | 3 pezzi | 6 pezzi | - | Pronte all'uso |
| **Tampone di lavaggio concentrato (10x)** con conservanti | 1 flacone x 100 mL | 2 flaconi x 100 mL | B-CAL-WB | Diluire ogni flacone con 900 mL di $H_2O$ deionizzata |
| **Tampone di incubazione** con conservanti | 2 flaconi x 125 mL | 3 flaconi x 125 mL | B-CAL-IB | Pronte all'uso |
| **Calibratori da A a E**[1) 2)] Calprotectina di derivazione sierica in una matrice tampone con conservanti | 5 fiale x 1 mL | 5 fiale x 1 mL | B-CAL-CASET | Pronte all'uso |
| **Controlli basso / alto**[3)] Calprotectina di derivazione sierica in una matrice tampone con conservanti | 2 fiale x 1 mL | 2 fiale x 1 mL | B-CAL-CONSET | Pronte all'uso |
| **Marcatore enzimatico** Ab anti-calprotectina coniugato con HRP | 1 fiala x 12 mL | 2 fiale x 12 mL | B-CAL-EL | Pronte all'uso |
| **Substrato TMB** TMB in tampone citrato | 1 fiala x 12 mL | 2 fiale x 12 mL | B-TMB12 | Pronte all'uso |
| **Soluzione di stop** Acido solforico 0,25 M | 1 fiala x 12 mL | 2 fiale x 12 mL | B-STS12 | Pronte all'uso **Agente corrosivo** |

Tabella 1

[1)] La concentrazione effettiva di calprotectina nei calibratori da A a E è rispettivamente di 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL. Se si utilizza una procedura ELISA nel range inferiore, i valori dei calibratori devono essere così impostati: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di calprotectina. Questa assegnazione corrisponde a una diluizione finale 1:2.500 del campione quando analizzato con la procedura ELISA nel range inferiore.

[2)] Se si sceglie una procedura ELISA nel range esteso, i valori nominali dei calibratori devono essere così impostati: 30, 90, 300, 900 e 1.800 µg/g di calprotectina. Questa assegnazione corrisponde a una diluizione finale 1:7.500 del campione quando analizzato con la procedura ELISA nel range esteso.

[3)] I controlli contengono quantità lotto-specifiche di calprotectina umana nativa. Per le concentrazioni effettive, consultare la scheda dati-QC aggiuntiva.

## CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI E DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

| **Reagenti sigillati/non aperti** | |
|---|---|
| Conservare a 2-8 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette. | |
| **Reagenti aperti/ricostituiti** | |
| Tampone di estrazione | Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi. |
| Micropiastre | Riporre subito le strisce di pozzetti non utilizzate dentro la busta di alluminio contenente l'essiccante e risigillarla premendo lungo tutta la chiusura ermetica.<br>Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi. |
| Tampone di lavaggio diluito | Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi. |
| Tampone di incubazione | |
| Calibratori | |
| Controlli | |
| Marcatore enzimatico | |
| Substrato TMB | |
| Soluzione di stop | |

Tabella 2

## REAGENTI E MATERIALI SUPPLEMENTARI DISPONIBILI

### Dispositivi per l'estrazione delle feci

I dispositivi per l'estrazione delle feci descritti nella Tabella 3 non fanno parte del kit. I dispositivi di estrazione indicati devono essere ordinati separatamente.

| Kit di dispositivi di estrazione | Quantità | Codice |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Sono disponibili confezioni da 50, 200 o 500 provette contenenti 5 mL di tampone di estrazione ciascuna<br>Pronte all'uso | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 provette, spatole e camere di raccolta per le feci | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 provette costituite da provetta, cono e tappo dosatore, contenenti 1,3 mL di tampone di estrazione ciascuna<br>Pronte all'uso | B-CAL-SO50 |

Tabella 3

## MATERIALI NESSESARI MA NON FORNITI

### Procedura di estrazione

- Pipettatori di precisione da 100 µL e 1.000 µL con puntali monouso
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per il trasferimento degli estratti (opzionali)
- Cappa a flusso laminare
- Miscelatore vortex per più provette / Miscelatore vortex
- Microcentrifuga (≥3.000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)
- Dispositivi di estrazione (vedere tabella 3 sopra) o per la procedura di estrazione manuale:
  - Anse per l'inoculazione da 10 µL monouso
  - Provette di polipropilene da 15 mL con tappo a vite indispensabile
  - Bilancia di precisione (10-200 mg)

### Procedura del test ELISA

- Pipettatori di precisione da 10 µL, 100 µL e 1.000 µL con puntali monouso
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione delle diluizioni dei campioni
- Cilindro da 1.000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistema di lavaggio per micropiastre (vedere le precauzioni tecniche) o erogatore a spruzzo per il tampone di lavaggio
- Agitatore di micropiastre (vedere le precauzioni tecniche)
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per misurare l'assorbanza a 450 nm

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

### Precauzioni per la sicurezza

- I calibratori e i controlli di questo test contengono componenti di origine umana. Sebbene i reagenti siano stati testati per l'antigene di superficie del virus HBV e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV 1/2 e siano risultati negativi, vanno considerati come potenziali vettori di infezioni e quindi maneggiati secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) adottando le precauzioni del caso.
- La soluzione di stop contiene acido solforico (0,25 M). Il reagente è irritanti per gli occhi, la pelle e le membrane mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, lavare immediatamente con molta acqua.
- Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua; in caso contrario può manifestarsi irritazione/ustioni.
- I reagenti e gli agenti chimici devono essere trattati come rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

### Precauzioni tecniche

#### Componenti del kit

- I residui presenti nella micropiastra derivano dal processo di produzione. Vengono rimossi nella fase di lavaggio (fase 3 della procedura di analisi) e non influiscono sui risultati.
- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- Non mescolare né usare componenti di kit con numero di lotto diverso.

- Adottare tutte le precauzioni possibili per evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti.
- Lasciar equilibrare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso. Miscelare bene (con vortex) i reagenti prima dell'uso.
- I pozzetti della micropiastra non possono essere riutilizzati.

**Procedura di estrazione manuale**

- Per ottenere risultati quantitativi, è importante omogeneizzare completamente il campione fecale aggiunto al tampone di estrazione. Si deve evitare di contaminare il bordo superiore della provetta di estrazione. Dopo la miscelazione può rimanere una piccola quantità di particelle insolubili.

**Procedura del test ELISA**

- Nella procedura del test ELISA le fasi di lavaggio sono essenziali per garantire risultati riproducibili. L'incubazione del tampone di lavaggio nei pozzetti deve durare per minimo 20 secondi prima che venga riaspirato.
- Se si usa un sistema di lavaggio automatico, si raccomanda fortemente di usare la "modalità piastra", cioè ogni fase della procedura (erogazione/ aspirazione) viene eseguita in sequenza su tutte le strisce prima che lo strumento prosegua con il ciclo di lavaggio successivo. In questo modo il tempo di incubazione minimo è garantito.
- Il numero indicato di cicli di lavaggio è obbligatorio per garantire la riproducibilità dei risultati.
- L'agitatore per piastre deve essere impostato su circa 450 rpm (7,5 Hz). Frequenze di rotazione più elevate possono causare scarsa linearità di diluizione a valori compresi tra 300/900 e 600/1.800 µg/g. Si deve selezionare un movimento rotatorio e non orizzontale.
- Per essere sicuri che la reazione antigene/anticorpo sia completa, il tempo di incubazione nella fase 5 deve essere di almeno 30 minuti. Tempi di incubazione leggermente più lunghi (fino a 5 minuti in più) non influiscono sul risultato finale.
- Il marcatore enzimatico è inattivato dall'ossigeno ed è estremamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso e agli idroclorocarburi aromatici spesso presenti nelle reti idriche che riforniscono i laboratori. Perciò va usata solo acqua deionizzata di alta qualità.
- Ogni volta che si esegue il test (ogni piastra o piastra parziale) va generata una nuova curva standard.
- Se la concentrazione iniziale di un campione ignoto fornisce letture che superano la concentrazione del calibratore più alto, ossia il calibratore E, il campione può essere ulteriormente diluito con il tampone di incubazione e nuovamente analizzato secondo la procedura del test. Per il calcolo dei risultati va tenuto conto del fattore di diluizione totale risultante.

## RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per la procedura di estrazione è necessario meno di 1 g di campione di feci native. Raccogliere il campione di feci in provette semplici.

Importante: Il campione deve essere raccolto senza l'aggiunta di nessun additivo chimico o biologico.

**Trasporto dei campioni**

I campioni di feci devono essere ricevuti per il processamento da parte del laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni di feci possono essere spediti a temperatura ambiente o refrigerati.

**Conservazione dei campioni**

I campioni di feci devono essere refrigerati a 2-8 °C ed estratti entro 3 giorni dalla ricezione in laboratorio. I campioni non vanno conservati a temperature elevate.

## ESTRAZIONE DEI CAMPIONI DI FECI E CONSERVAZIONE DEGLI ESTRATTI

### 1. CALEX® Cap

#### 1.1 Procedura di estrazione

Seguire le Istruzioni per l'uso fornite insieme al dispositivo CALEX® Cap (Codice: B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

I campioni di feci liquide possono essere pipettati direttamente nel dispositivo CALEX® Cap. Svitare il tappo blu e pipettare 10 µL di campione di feci nel dispositivo. Richiudere il dispositivo CALEX® Cap e vortexare secondo la procedura di estrazione descritta e illustrata nelle Istruzioni per l'uso fornite insieme al dispositivo CALEX® Cap.

Importante: dopo l'estrazione, centrifugare il dispositivo CALEX® Cap per 5 minuti a 500-3.000 x g e continuare la procedura del test.

#### 1.2 Conservazione degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti con il dispositivo CALEX® Cap sono stabili a temperatura ambiente per 3 giorni e a 2-8°C al massimo per 6 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare gli estratti a -20°C. Gli estratti congelati sono stabili per un periodo massimo di 23 mesi.
Gli estratti ottenuti con CALEX® Cap possono essere congelati e conservati direttamente dentro il dispositivo CALEX® Cap. Gli estratti possono subire al massimo 4 cicli di congelamento / scongelamento. Prima della misurazione, lasciare equilibrare gli estratti a temperatura ambiente, vortexare bene per 10 secondi e centrifugare per 5 minuti a 500-3.000 x g.

### 2. Altri dispositivi di estrazione

#### 2.1 Procedure di estrazione

Seguire le Istruzioni per l'uso fornite insieme al relativo dispositivo di estrazione:

- dispositivo di estrazione delle feci Roche (Codice: 10745804322) o BÜHLMANN Smart-Prep (Codice: B-CAL-RD).
- ScheBo® Quick-Prep™ (Codice: B-CAL-SO50).

Importante: dopo l'estrazione con BÜHLMANN Smart Prep e con ScheBo® Quick-Prep™, centrifugare le provette per 5 minuti a 3.000 x g. In alternativa, trasferire l'omogenato in una provetta Eppendorf da 2 mL e centrifugarla in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g. Far decantare il surnatante in una nuova provetta etichettata e proseguire con la procedura di analisi.

### 2.2 Conservazione degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti con Smart-Prep o con ScheBo® Quick-Prep™ sono stabili a 2-8°C per ≤ 7 giorni o a -20°C per 36 mesi.

## 3. Estrazione manuale

### 3.1 Procedura di estrazione

1. Etichettare e pesare la provetta di polipropilene vuota, ansa di inoculazione inclusa. Annotare il peso (tara).
2. Con l'ansa di inoculazione, prelevare da 50 a 100 mg di campione fecale e porli nella provetta già pesata, quindi pesarla di nuovo (peso lordo). Durante la raccolta del campione, evitare di prelevare le fibre alimentari presenti nel campione.
3. Calcolare il peso netto del campione (sottraendo la tara dal peso lordo), spezzare l'ansa di inoculazione e lasciare la sua parte inferiore all'interno della provetta.
4. Aggiungere alla provetta il tampone di estrazione secondo la formula
   x mg di feci x 49 = y µL di tampone di estrazione (per es. 50 mg di feci + 2.450 µL di tampone), quindi chiudere la provetta.
5. Estrarre il campione:
   - agitare vigorosamente la provetta di estrazione contenente il tampone e il campione fecale su un vortex (per più provette) alla velocità massima per 30 secondi;
   - quindi incubare la provetta di estrazione per 25 +/- 5 minuti su un agitatore per piastre a ca. 400 rpm. La parte dell'ansa di inoculazione rimasta nella provetta facilita l'agitazione del campione;
   - vortexare vigorosamente la provetta di estrazione per altri 30 secondi.
6. Trasferire 1,5 mL dell'omogenato in una provetta Eppendorf da 2 mL e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g.
7. Far decantare il surnatante in una nuova provetta etichettata e proseguire con la procedura di analisi o conservare gli estratti (consultare le istruzioni per la conservazione degli estratti).

### 3.2 Conservazione degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti tramite estrazione manuale possono essere conservati a 2-8 °C per ≤ 7 giorni o a -20 °C per 36 mesi.

## GAMMA DI LAVORO

L'esecuzione del dosaggio può avvenire nelle seguenti condizioni: procedura ELISA nel range inferiore o nel range esteso. Il tipo di procedura appropriato va selezionato in base alla concentrazione di calprotectina attesa:

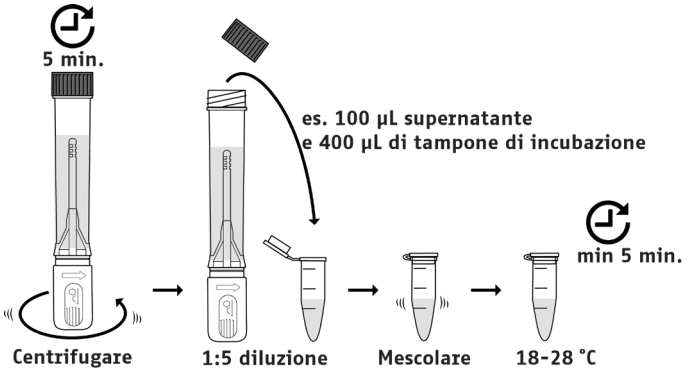
- in caso di campioni con un massimo di 600 µg/g di calprotectina selezionare la procedura nel range inferiore (gamma di lavoro: 10-600 µg/g);
- se tendenzialmente i campioni superano i 600 µg/g, selezionare la procedura nel range esteso (gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g).

## PROCEDURA DEL TEST

Importante: lasciar equilibrare tutti i reagenti per almeno 30 minuti a 18-28 °C prima dell'uso. Diluire solo gli estratti di feci. I calibratori e i controlli sono pronti all'uso.

**1. Diluizione dei campioni, opzione 1:**
**Gamma di lavoro: 10-600 µg/g**

1.1. Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti fecali 1:5 con tampone di incubazione (per es. 100 µL di estratto e 400 µL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

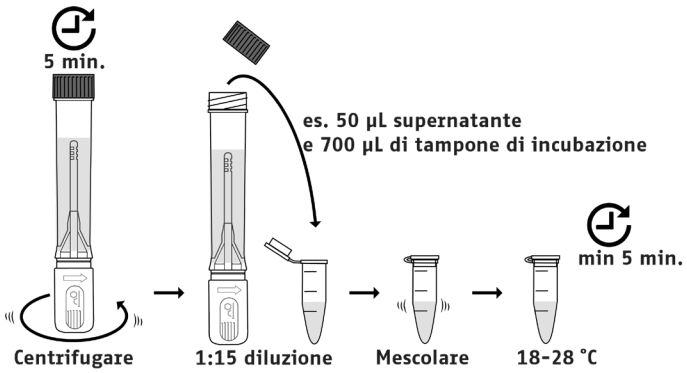



1.2 Estrazione manuale o con Smart Prep o ScheBo® Quick-Prep™: Diluire gli estratti fecali 1:50 con tampone di incubazione (per es. 20 µL di estratto e 980 µL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

**1.` Diluizione dei campioni, opzione 2:**
**Gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g**

Questo range di lavoro può essere esteso per un fattore 3 se i campioni vengono diluiti 1:7.500 invece che 1:2.500. Questa è la procedura raccomandata quando ci si aspettano concentrazioni elevate di calprotectina.

1.1` Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti fecali 1:15 con tampone di incubazione (per es. 50 µL di estratto e 700 µL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

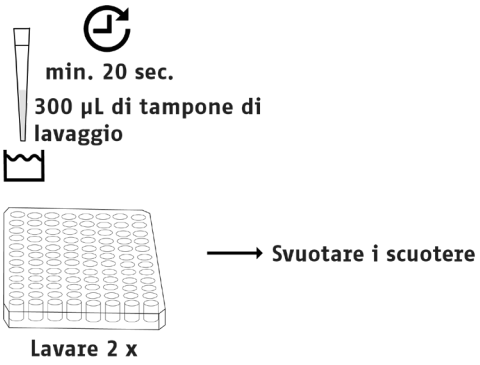



1.2` Estrazione manuale o con Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluire gli estratti fecali 1:150 con

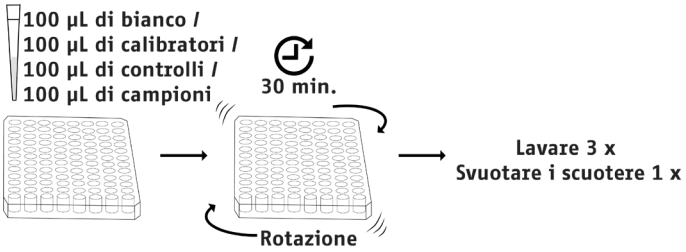
tampone di incubazione (per es. 20 µL di estratto e 2.980 µL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

2. Preparare un supporto per piastre con un numero sufficiente di strisce per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Staccare dal supporto le strisce in eccesso e risigillarle nella busta di alluminio insieme con l'essiccante senza indugio. Conservare in frigorifero.
3. Lavare due volte i pozzetti rivestiti usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

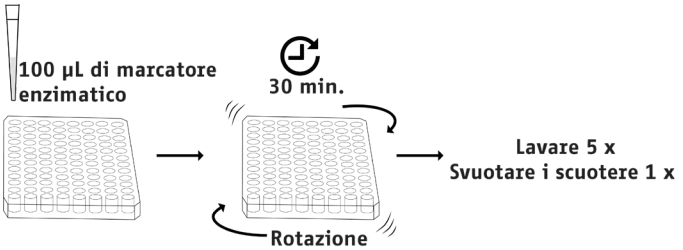
Importante: durante tutte le fasi di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio nei pozzetti per almeno 20 secondi.




4a. Pipettare 100 µL di tampone di incubazione (bianco) e Pipettare 100 µL dei calibratori A-E nei rispettivi pozzetti.
4b. Pipettare 100 µL dei controlli basso e alto nei rispettivi pozzetti.
4c. Pipettare 100 µL di ogni campione diluito nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con il foglio sigillante e incubarla per 30 + max. 5 min su un agitatore per piastre impostato su ~450 rpm a 18-28 °C (vedere le Precauzioni tecniche – Procedura del test ELISA).
6. Togliere il foglio sigillante e gettarlo. Vuotare i pozzetti e lavarli tre volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto (vedere le Precauzioni tecniche – Procedura del test ELISA). Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

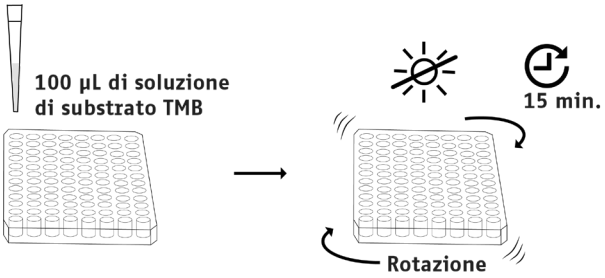



7. Pipettare 100 µL di marcatore enzimatico in tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con il foglio sigillante e incubarla per 30 ±5 min su un agitatore per piastre impostato su ~450 rpm a 18-28 °C.
9. Togliere il foglio sigillante e gettarlo. Vuotare i pozzetti e lavarli cinque volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

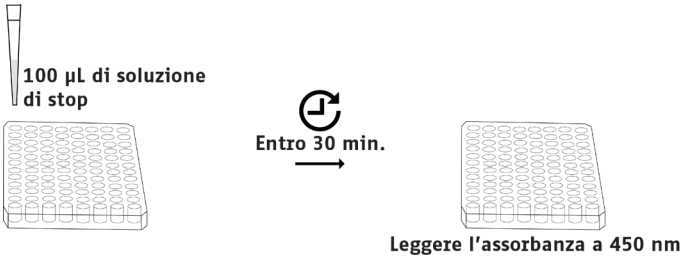



Importante: lasciar equilibrare la soluzione del substrato TMB a 18-28 °C.

10. Pipettare 100 µL di soluzione del substrato TMB in tutti i pozzetti.
11. Coprire la piastra con il foglio sigillante, proteggerla dalla luce diretta e incubarla per 15 ±2 min su un agitatore per piastre impostato su ~450 rpm a 18-28 °C.




12. Pipettare 100 µL di soluzione di stop in tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con un puntale per pipette. Passare alla fase 13 entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di micropiastre.




## CONTROLLO DI QUALITA'

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni per l'uso. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'applicazione di tecniche di laboratorio precise e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Nel kit BÜHLMANN fCAL® ELISA sono inclusi due controlli: basso e alto. I corrispondenti valori di riferimento dei controlli sono indicati sulla scheda dati-QC fornita insieme a ogni kit. I valori e i range indicati sulla scheda dati-QC si riferiscono sempre al lotto di quello specifico kit e vanno usati per il confronto diretto dei risultati. Nell'eventualità che i controlli basso e/o alto non rientrino nel range dichiarato nella scheda dati-QC, si raccomanda di considerare non valida tale analisi.

Si raccomanda di usare campioni di controllo interno, oltre ai controlli presenti nel kit, come da normative locali e nazionali. L'uso di campioni di controllo interno è consigliato per garantire la validità dei risultati su base quotidiana. Dal momento che in commercio non è

disponibile alcun controllo per la calprotectina fecale, come controllo di qualità interno si consiglia l'uso di un pool di estratti di feci con livelli normali e patologici.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori di controllo deve rientrare entro i limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. Se le prestazioni del dosaggio non soddisfano i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) pipettatura, controllo della temperatura e dei tempi impostati sui dispositivi; ii) impostazioni del lettore ELISA; iii) date di scadenza dei reagenti; iv) condizioni di conservazione e di incubazione; v) la soluzione del substrato TMB deve essere incolore; vi) purezza dell'acqua; vii) metodi di aspirazione e lavaggio.

## STANDARDIZZAZIONE

I valori dei calibratori BÜHLMANN fCAL® ELISA sono assegnati ripetendo più volte le analisi di misurazione e impiegando materiale di riferimento interno basato su siero umano, nonché la procedura di misurazione per BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentrazione di calprotectina nel materiale di riferimento interno è stata stabilita utilizzando MRP8/14 purificata da granulociti umani come materiale di riferimento primario.

## CALCOLO DEI RISULTATI DEL TEST

### Curva standard

Si raccomanda l'uso di un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli: sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di calibratore per calcolare il valore dei calibratori. Generare la curva standard usando una curvalogistica a 4 parametri (4 PL).

### Controlli e campioni

Si raccomanda l'uso di un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli: sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di controllo/campione. Calcolare la concentrazione di calprotectina del controllo/campione in ogni pozzetto, in µg/g, usando la curva standard generata.

### Gamma di lavoro: 10-600 µg/g

Se si seleziona una procedura ELISA nel range inferiore, le concentrazioni dei calibratori devono essere così impostate: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di calprotectina. Per ottenere i risultati finali, i dati ottenuti vanno moltiplicati per il fattore di diluizione addizionale (se si usa una diluizione finale diversa da 1:2.500).

Consultare la tabella 12 e la figura 1 per i dati tipici (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti solo a scopo dimostrativo. Per ogni serie di campioni da analizzare va generata una nuova curva standard.

### Gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g

Se si sceglie una procedura ELISA nel range esteso, i valori nominali dei calibratori devono essere così impostati: 30, 90, 300, 900 e 1.800 µg/g di calprotectina. Per ottenere i risultati finali, i dati ottenuti vanno moltiplicati per il fattore di diluizione addizionale (se si usa una diluizione finale diversa da 1:7.500).
Consultare la tabella 15 e la figura 4 per i dati tipici (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti solo a scopo dimostrativo. Per ogni serie di campioni da analizzare va generata una nuova curva standard.

## LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit BÜHLMANN fCAL® ELISA sono intesi per la determinazione dei livelli di calprotectina solamente in campioni di feci umane.
- I risultati del test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni cliniche ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Per il monitoraggio della IBD, la migliore accuratezza diagnostica nel prevedere la recidiva clinica nei pazienti è stata ottenuta tramite più misurazioni della calprotectina fecale eseguite a intervalli di durata massima di 4 settimane (rif. 19-20).
- I pazienti in terapia con farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) possono presentare un aumento dei livelli fecali di calprotectina.
- I risultati non possono essere clinicamente applicabili a bambini di età inferiore ai 4 anni, i quali presentano livelli di calprotectina lievemente più alti (rif. 21-24).

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### I. Differenziazione della malattia gastrointestinale organica da quella funzionale

Le categorie dei risultati sono basate su dati ottenuti in studi clinici eseguiti da BÜHLMANN e costituiscono le raccomandazioni di BÜHLMANN. Tutti i risultati dei test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni disponibili dai sintomi clinici del paziente, dalla anamnesi e da altri risultati clinici e di laboratorio.

**Soglie cliniche**

Per ottenere i valori descritti nella tabella 4, sono stati analizzati i risultati ottenuti in uno studio clinico internazionale condotto su 58 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBS e 131 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBD.

| Concentrazione di calprotectina | Interpretazione | Follow-up |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normale | Nessuno |
| 80 – 160 µg/g | Zona grigia/Borderline | Follow-up entro 4 6 settimane |
| > 160 µg/g | Elevata | Ripetere ogni qualvolta necessario |

Tabella 4

### Valori di calprotectina inferiori a 80 µg/g

I valori di calprotectina fecale <80 µg/g non sono indicative di infiammazione nel tratto gastrointestinale. É probabile che i pazienti con livelli bassi di calprotectina non necessitano di procedure invasive per determinare la causa dell'infiammazione.

### Valori di calprotectina compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g

I livelli intermedi di calprotectina fecale compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g, detti anche livelli nella zona grigia, non sono direttamente indicativi di un'infiammazione attiva che richieda un controllo immediato con l'esecuzione di test invasivi. Tuttavia non

si può escludere la presenza di infiammazione. Si raccomanda di rivalutare il livello della calprotectina dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio.

**Valori di calprotectina maggiori di 160 µg/g**

I valori di calprotectina fecale >160 µg/g sono indicativi di infiltrati di neutrofili nel tratto gastrointestinale; pertanto questo risultato può segnalare la presenza di una malattia infiammatoria in fase attiva. Per ottenere una diagnosi clinica completa si suggerisce procedere con le appropriate procedure investigative da parte di specialisti.

**Valutazione clinica**

La capacità di BÜHLMANN fCAL® ELISA di differenziare tra IBD e altre malattie gastrointestinali (GI) non infiammatorie, inclusa la IBS, è stata valutata in uno studio clinico condotto in totale su 337 pazienti adulti e pediatrici. Di questi pazienti, 135 avevano una diagnosi finale di IBD (morbo di Crohn, colite ulcerosa o colite intermedia), 130 una diagnosi di IBS e 72 presentavano dolore addominale e/o diarrea, o altre condizioni non infiammatorie GI-correlate (vedere la tabella 5). La diagnosi finale è stata confermata sia endoscopicamente sia tramite altri reperti clinici.

Nella differenziazione tra IBD e condizioni non infiammatorie GI-correlate, inclusa la IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'83,7% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) è risultata una AUC (area sotto la curva) di 0,923 (vedere la tabella 6).

Nella differenziazione tra IBD e IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'85,4% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC è risultata una AUC di 0,933 (vedere la tabella 8).

È stato possibile definire una combinazione di cut-off ottimale mediante un'analisi ROC per questi pool di pazienti pari a 80 µg/g e a 160 µg/g di calprotectina che è leggermente più stringente rispetto a una combinazione con **cut-off minimo a 50 µg/g,** più sensibile ma con prestazioni di specificità inferiori, e **cut-off massimo a 200 µg/g** con una sensibilità leggermente minore (tabelle 7 e 9).

## II. Monitoraggio della IBD

**Soglie cliniche e valutazione**

La determinazione della calprotectina fecale è una procedura e semplice e affidabile a supporto del monitoraggio dei pazienti con IBD (rif. 7-18).
La correlazione tra livelli di calprotectina e stato infiammatorio della mucosa intestinale del paziente, valutato tramite endoscopia, è stata stabilita da tre studi indipendenti che si sono avvalsi di test Calprotectina BÜHLMANN per la (tabella 10). Il valore diagnostico della calprotectina nel prevedere la remissione e la recidiva clinica, in base ai sintomi del paziente, agli indici di attività clinica, alla necessità non pianificata di incrementare la terapia, al ricovero o all'emergenza, è stato determinato in tre studi utilizzando i test Calprotectina BÜHLMANN (tabella 11).
Le categorie dei risultati mostrate costituiscono soltanto delle raccomandazioni e la loro determinazione è basata sulla valutazione globale dei valori di cut-off e degli studi sulle prestazioni cliniche pubblicati. Si consiglia ai medici di stabilire le soglie individuali di ogni paziente determinando il livello basale di calprotectina del paziente durante la remissione della malattia.

**Valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g**

I livelli di calprotectina fecale inferiori a 100 µg/g possono indicare in modo affidabile i pazienti, a basso rischio di recidiva clinica, in remissione endoscopica nei quali si possono evitare le procedure endoscopiche invasive (rif. 7-18).

**Valori di calprotectina nel range 100 - 300 µg/g**

I Livelli di calprotectina fecale nel range 100-300 µg/g possono indicare la necessità di controlli più ravvicinati nel periodo successivo per valutare l'andamento della malattia.

**Valori di calprotectina superiori a 300 µg/g**

In caso di livelli di calprotectina fecale superiori a 300 µg/g l'esame va ripetuto e, se l'aumento dei livelli è confermato, è necessario eseguire altri accertamenti (rif. 7-18).

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali del dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA sono state determinate usando il metodo di estrazione manuale, salvo diversamente specificato.

**Gamma di lavoro: 10-600 µg/g**

**Riproducibilità (precisione intra-analisi):**
**CV: 1,9 - 8,0%**

**Precisione intra-laboratorio: CV: 5,5 - 14,0%**

La riproducibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida EP05-A2 del CLSI usando il seguente disegno di studio: 22 giorni x 2 replicati. Sono stati analizzati dieci estratti di campioni di feci. I valori sono riportati nella tabella 13.

**Limite di rilevabilità (LoD): 4,2 µg/g**

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A del CLSI e con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 240 determinazioni, con 80 replicati del bianco (tampone di estrazione) e 160 replicati con bassi livelli; e un **limite del bianco (LoB) di 0,29 µg/g**. Per estrapolare dai valori di OD dei campioni di bianco le concentrazioni di calprotectina in µg/g è stata usata una funzione di spline cubico.

**Limite di quantificazione (LoQ): 9,8 µg/g**

Sono state eseguite 40 determinazioni su 10 campioni di feci con valori tra 5,2 e 1.254 µg/g per generare un profilo di precisione non lineare e determinare un LoQ basato su un obiettivo di precisione con un CV del 20%. Sono state ottenute misurazioni precise con CV <15% entro l'intero range standard da 10 a 600 µg/g. I risultati sono riportati nella figura 2.

**Linearità: 10-600 µg/g**

Il range di linearità di BÜHLMANN fCAL® ELISA è stato determinato secondo le linee guida EP06-A del CLSI. Una deviazione massima dalla linearità pari a ±20% è stata considerata accettabile. Per valori inferiori a 75 µg/g è stata accettata una differenza assoluta inferiore a ±15 µg/g (tabella 14).

**Accuratezza/Recupero:**

**Bias totale: -1,1%;**

**Limite inferiore di concordanza: -17,5%;**

**Limite superiore di concordanza: 15,4%**

Quattro estratti di campioni di feci sono stati arricchiti (spiking) con quantità crescenti di calprotectina da campioni di siero. I risultati sono riportati nella figura 3.

**Effetto "hook" delle concentrazioni elevate**

È possibile misurare campioni con concentrazioni teoriche fino a 60.000 µg/g senza limitare il range di misurazione del dosaggio.

**Gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g**

**Riproducibilità (precisione intra-analisi): CV: 1,7 - 5,8%**

**Precisione intra-laboratorio: CV: 3,1 - 9,4%**

La riproducibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI usando il seguente disegno di studio: 10 giorni x 2 analisi x 4 replicati. Sono stati analizzati un pool di sette campioni di estratti fecali (tabella 16).

**Precisione tra lotti: CV: 4,2 - 9,7%**

La riproducibilità da lotto a lotto è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 lotti x 5 giorni x 5 replicati. Sono stati analizzati sei estratti di campioni di feci. Per l'analisi dei dati è stato applicato un modello di analisi della varianza a effetti casuali. I valori sono riportati nella tabella 17.

**Riproducibilità (studio multicentrico per la valutazione della precisione) CV 6,4 – 19,0%**

La riproducibilità è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 centri x 2 operatori x 5 giorni x 2 analisi x 4 replicati. Per le due analisi eseguite ciascun giorno, gli operatori hanno alternato due diversi lettori di piastre ELISA e due diversi lotti di reagenti. Nei diversi centri dello studio sono stati usati in totale tre lotti di reagenti. Sono stati analizzati cinque pool di campioni di estratti fecali (tabelle 18 e 19).

**Limite di rilevabilità (LoD): 12,6 µg/g**

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI e con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 120 determinazioni, con 60 replicati del bianco (tampone di estrazione) e 60 replicati con bassi livelli; e un **limite del bianco (LoB) di 8,3 µg/g**.

**Limite di quantificazione (LoQ): 21,3 µg/g**

Il LoQ è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI, basandosi su 60 determinazioni e un obiettivo di precisione valutato come coefficiente di variazione (CV) del 20%.

**Linearità: 30-1.800 µg/g**

Il range di linearità di BÜHLMANN fCAL® ELISA è stato determinato secondo le linee guida EP06-A del CLSI. Una deviazione massima dalla linearità pari a ±20% è stata considerata accettabile. Per valori inferiori a 75 µg/g è stata accettata una differenza assoluta inferiore a ±15 µg/g (tabella 20).

**Accuratezza/Recupero: 96,4 – 102,2%**

Sette estratti di campioni fecali con livelli di calprotectina a copertura dell'intero range di misurazione del test sono stati arricchiti (spiking) con 180 µg/g di calprotectina in materiale calibratore. Lo spiking è stato eseguito al 10% del volume dell'estratto del campione. I campioni "basali" sono stati arricchiti con la corrispondente quantità di tampone di incubazione. I campioni "basali" e "basali + arricchiti" sono stati misurati in triplicato con un lotto di reagenti. I risultati sono riportati nella tabella 21.

**Preanalitica**

Le caratteristiche prestazionali di BÜHLMANN fCAL® ELISA relativamente alle procedure analitiche sono state stabilite usando il range di lavoro di 30 – 1.800 µg/g.

**Riproducibilità dell'estrazione - estrazione manuale: 9,5 - 20,5%**

La riproducibilità dell'estrazione è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: x 10 estrazioni x 2 replicati. Sono stati analizzati 9 campioni clinici fecali, comprendenti campioni a consistenza solida, semi-solida e liquida. I valori sono riportati nella tabella 22.

**Riproducibilità dell'estrazione – CALEX® Cap: 7,9 - 16,9%**

La riproducibilità dell'estrazione è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: x 3 lotti di CALEX® Cap x 4 estrazioni x 4 replicati. Sono stati analizzati 5 campioni clinici fecali, comprendenti campioni a consistenza solida, semi-solida e liquida. I valori sono riportati nella tabella 23.

**Confronto tra metodi: CALEX® Cap vs. estrazione manuale**

**Bias a 80 µg/g: 5,9% (IC 95%: 1,4 - 12,2%)**

**Bias a 160 µg/g: 12,0% (IC 95%: 7,8 - 17,0%)**

**Bias medio: 10,1% (IC 95%: 5,7 - 14,5%)**

Lo studio di confronto tra metodi è stato condotto secondo le linee guida EP09-A3 del CLSI. Sono stati estratti 241 campioni clinici con un lotto di dispositivi CALEX® Cap. I valori di riferimento sono stati determinati in estratti ottenuti con il metodo di estrazione manuale. In totale sono stati analizzati 172 campioni entro la gamma di misurazione di BÜHLMANN fCAL® ELISA e un intervallo di concentrazione di riferimento della calprotectina di 30,5 – 1.496,6 µg/g. Sono state eseguite singole estrazioni e determinazioni dell'analisi per entrambi i metodi. Il bias è stato determinato usando l'analisi di regressione lineare di Passing-Bablok e l'analisi di Bland-Altman (tabelle 24 e 25).

## SOSTANZE INTERFERENTI

La sensibilità del dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA a farmaci orali, integratori nutrizionali, emoglobina e microrganismi enteropatologici è stata analizzata secondo le linee guida EP07-A2 del CLSI, utilizzando il range di lavoro esteso. Nei risultati, un bias eccedente il 10% è stato considerato interferenza. Non sono emerse interferenze con le sostanze elencate nella tabella 26, fino alle concentrazioni indicate. Non sono emerse interferenze con i microrganismi enteropatologici elencati nella tabella 27, fino alle quantità di unità formanti colonie (CFU) indicate per mL di estratto di campione di feci.

# ESPANOL

## USO PREVISTO

El ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA es un ensayo diagnóstico *in vitro* automatizado para la determinación cuantitativa de la calprotectina en muestras de heces humanas al efecto de facilitar la valoración de la inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo pueden utilizarse en el diagnóstico para distinguir entre las enfermedades inflamatorias orgánicas del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, en particular la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU)) y las enfermedades funcionales (síndrome del intestino irritable, SII) (ref. 1-7) en los pacientes con dolor abdominal crónico y para facilitar el control de la EII (ref. 7-18).

Solo para uso en laboratorio.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA permite la medición selectiva de la calprotectina en extractos fecales mediante ELISA de tipo *sandwich*. La placa de microtitulación de BÜHLMANN fCAL® ELISA está recubierta con un anticuerpo de captura monoclonal (mAb) altamente específico para los complejos poliméricos y heterodiméricos de la calprotectina. Los extractos de las muestras fecales del paciente, los controles para la determinación de la aceptabilidad de la prueba ELISA y los calibradores se cargan en los pocillos de la placa de microtitulación. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y unos pasos de lavado, un anticuerpo (Ab) de detección conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) detecta las moléculas de calprotectina unidas al anticuerpo de captura en la placa. Después de la incubación y pasos de lavado adicionales, se añade el sustrato cromogénico de HRP, tetrametilbenzidina (TMB) (formación de color azul), seguido de una solución de parada (cambio a color amarillo). La absorción se mide a 450 nm. La concentración final de calprotectina en µg/g de heces de la muestra del paciente se determina mediante la curva de calibración generada a partir de los valores medidos en el calibrador.

## REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

| Reactivos | Cantidad | | Código | Reconstitución |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Tampón de extracción** | 3 frascos × 125 mL | 6 frascos × 125 mL | B-CAL-EX | Listo para usar |
| **Placa de microtitulación** con revestimiento previo de mAb anticalprotectina | 12 × 8 tiras de pocillos con marco | 2× 12 × 8 tiras de pocillos con marco | B-CAL-MP | Listo para usar |
| **Alfombrilla de sellado** | 3 unidades | 6 unidades | - | Listo para usar |
| **Concentrado de tampón de lavado (10×)** con conservantes | 1 frasco × 100 mL | 2 frascos × 100 mL | B-CAL-WB | Diluir cada uno con 900 ml de $H_2O$ desionizada |
| **Tampón de incubación** con conservantes | 2 frascos × 125 mL | 3 frascos × 125 mL | B-CAL-IB | Listo para usar |
| **Calibradores de A a E**[1) 2)] Calprotectina sérica en una matriz tampón con conservantes | 5 viales × 1 mL | 5 viales × 1 mL | B-CAL-CASET | Listo para usar |
| **Controles bajo / alto**[3)] Calprotectina sérica en una matriz tampón con conservantes | 2 viales × 1 mL | 2 viales × 1 mL | B-CAL-CONSET | Listo para usar |
| **Marcador enzimático** Ab anticalprotectina conjugado con HRP | 1 vial × 12 ml | 2 viales × 12 mL | B-CAL-EL | Listo para usar |
| **Sustrato de TMB** TMB en tampón de citrato | 1 vial × 12 mL | 2 viales × 12 mL | B-TMB12 | Listo para usar |
| **Solución de parada** ácido sulfúrico 0,25 M | 1 vial × 12 mL | 2 viales × 12 mL | B-STS12 | Listo para usar **Agente corrosivo** |

Tabla 1

[1)] La concentración real de calprotectina de los calibradores A a E es de 4, 12, 40, 120 y 240 ng/ml, respectivamente. Para el procedimiento ELISA de intervalo inferior, los valores del calibrador deben fijarse como sigue: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de calprotectina. Esta asignación corresponde a la dilución final de la muestra 1:2500 en el procedimiento ELISA de intervalo inferior.

[2)] Si se selecciona el procedimiento ELISA de intervalo extendido, los valores nominales del calibrador deben fijarse como sigue: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de calprotectina. Esta asignación corresponde a la dilución final de la muestra 1:7500 en el procedimiento ELISA de intervalo extendido.

[3)] Los controles contienen cantidades específicas de calprotectina humana natural. Consultar la ficha de datos de control de calidad para conocer los valores reales de concentración

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS Y SOLUCIONES DE TRABAJO

| **Reactivos sellados / sin abrir** | |
|---|---|
| Conservar a 2-8 °C. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. | |
| **Reactivos abiertos / reconstituidos** | |
| Tampón de extracción | Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C. |
| Placa de microtitulación | Volver a colocar inmediatamente las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio que contiene los paquetes de secante y sellar completamente.<br>Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C. |
| Tampón de lavado diluido | Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C. |
| Tampón de incubación | |
| Calibradores | |
| Controles | |
| Marcador enzimático | |
| Sustrato de TMB | |
| Solución de parada | |

Tabla 2

## REACTIVOS Y MATERIALES INCLUIDOS COMPLEMENTARIOS

### Dispositivos de extracción de heces

Los dispositivos de extracción de heces descritos en la tabla 3 no están incluidos en el kit. Los dispositivos de extracción elegidos deben pedirse por separado.

| Kits de dispositivos de extracción | Cantidad | Código |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Paquetes de 50, 200 o 500 tubos disponibles, cada uno de los cuales contiene 5 mL de tampón de extracción.<br>Listo para usar | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 tubos, espátulas y fondos | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 tubos compuestos de tubo, cono y punta dosificadora, cada uno de los cuales contiene 1,3 mL de tampón de extracción.<br>Listo para usar | B-CAL-SO50 |

Tabla 3

## MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

### Procedimiento de extracción

- Pipetas de precisión de 100 µl y 1000 µl con puntas desechables
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para transferir los extractos (opcional)
- Cámara de flujo laminar
- Agitador vórtex multitubo/agitador vórtex
- Micro centrífuga (≥3000 g)
- Centrífuga (≥500 g)
- Dispositivos de extracción (véase la Tabla 3 anterior) o, para el procedimiento de extracción manual:
  - Asas de siembra desechables de 10 µL
  - Tubos de polipropileno de 15 mL con tapón de rosca, requeridos
  - Balanza de precisión (10-200 mg)

### Procedimiento ELISA

- Pipetas de precisión de 10 µL, 100 µL y 1000 µL con puntas desechables
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de las muestras.
- Probeta de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado
- Lavador de placas de microtitulación (véanse las precauciones técnicas) o frasco comprimible para el tampón de lavado
- Agitador de placas de microtitulación (véanse las precauciones técnicas)
- Papel secante
- Lector de microplacas para la medición de la absorbancia a 450 nm

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### Precauciones de seguridad

- Los calibradores y controles de este ensayo contienen componentes de origen humano. Aunque los ensayos de detección del antígeno de superficie del VHB y de los anticuerpos del VHC y VIH1/2 hayan dado resultado negativo, los reactivos deben manipularse como si pudiesen transmitir infecciones y de acuerdo con las Prácticas Correctas de Laboratorio (PCL), adoptando las precauciones oportunas.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es un irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuagar inmediatamente con agua abundante.
- Evite el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, enjuagar inmediatamente con abundante agua; de lo contrario, pueden producirse irritaciones o quemaduras.
- Los reactivos y productos químicos deben tratarse como residuos peligrosos conforme a las normas nacionales de seguridad sobre riesgos biológicos.

### Precauciones técnicas

#### Componentes del kit

- En el proceso de producción se acumulan residuos en los pocillos de la placa de microtitulación. Éstos se eliminan en el paso de lavado (paso 3 del procedimiento de ensayo) y no afectan a los resultados.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

- No mezclar ni utilizar componentes de kits con números de lote diferentes.
- Se deben realizar los máximos esfuerzos para asegurar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos y muestras o entre pocillos.
- Dejar que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente. Mezclar bien (en vórtex) los reactivos antes de su uso.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

**Procedimiento de extracción manual**

- Para lograr resultados cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces añadida en el tampón de extracción. Debe evitarse la contaminación en la parte superior del tubo de extracción. Después de la mezcla, puede quedar una pequeña cantidad de partículas insolubles.

**Procedimiento ELISA**

- En el procedimiento ELISA, los pasos de lavado son esenciales para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Dejar incubar el tampón de lavado en los pocillos durante un mínimo de 20 segundos antes de retirarlo.
- Si se utiliza un lavador automatizado, se deberá elegir el «modo placa», en el que cada paso del proceso (dispensado/aspiración) se realiza de manera secuencial en todas las tiras antes de proceder al ciclo de lavado siguiente. De este modo, se garantiza el tiempo mínimo de incubación.
- Es obligatorio realizar el número de ciclos de lavado indicado para obtener resultados reproducibles.
- El agitador de placas debe ajustarse a aproximadamente 450 rpm (7,5 Hz). Unas frecuencias de rotación más altas pueden causar una baja linealidad de dilución en valores entre 300/900 y 600/1800 µg/g. El movimiento debe ser rotatorio y no horizontal.
- Para asegurar que la reacción antígeno/anticuerpo es completa, el tiempo de incubación del paso 5 debe ser de al menos 30 minutos. Un tiempo de incubación moderadamente más largo (de hasta 5 minutos) no influye en el resultado final.
- El marcador enzimático es inactivado por el oxígeno y es altamente sensible a la azida de sodio, el timerosal, el ácido hipocloroso y los clorohidrocarburos aromáticos que se encuentran a menudo en los suministros de agua de laboratorio. Por lo tanto, solo se debe utilizar agua desionizada de alta calidad.
- Cada vez que se realiza el ensayo (por cada placa o placa parcial) se debe generar una nueva curva estándar.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida devuelve una lectura superior a la del calibrador más alto, el calibrador E, la muestra podrá diluirse con tampón de incubación y analizarse de nuevo según el procedimiento de ensayo. El factor de dilución total resultante debe tenerse en cuenta en el cálculo de los resultados.

## OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el procedimiento de extracción, se requiere menos de 1 g de muestra de heces naturales. Recoger la muestra de heces en tubos simples.

Importante: La muestra debe recogerse sin ningún aditivo químico o biológico.

**Transporte de las muestras**

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces para su procesamiento en un plazo de 3 días desde su recolección. Las muestras de heces pueden enviarse a temperatura ambiente o refrigeradas.

**Almacenamiento de las muestras**

Las muestras de heces deben refrigerarse a 2-8 °C y extraerse en un plazo de 3 días a partir de su recepción en el laboratorio. No conservar las muestras a temperaturas elevadas.

## EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES Y CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS

### 1. CALEX® Cap

**1.1 Procedimiento de extracción**

Seguir las instrucciones de uso proporcionadas con el dispositivo CALEX® Cap (código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositivo CALEX® Cap: Las muestras de heces líquidas se pueden pipetear directamente en el dispositivo CALEX® Cap. Desenroscar la tapa azul y pipetear 10 µl de muestra de materia fecal en el dispositivo. Volver a tapar el dispositivo CALEX® Cap y proceder con el paso de mezclado en vórtex de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito e ilustrado en las instrucciones de uso suministradas con el dispositivo CALEX® Cap

Importante: Después de la extracción, centrifugar el dispositivo CALEX® Cap durante 5 minutos a 500-3000 g y continuar con el procedimiento del ensayo.

**1.2 Conservación de los extractos**

Los extractos de calprotectina fecal en los extractos obtenidos con CALEX® Cap son estables a temperatura ambiente durante 3 días y a 2-8 °C hasta 6 días. Para una conservación más prolongada, congelar los extractos a –20 °C. Los extractos congelados son estables durante un período de hasta 23 meses.
Los extractos de Calex® Cap pueden ser congelados directamente y conservados en el dispositivo CALEX® Cap. Los extractos pueden someterse a cuatro ciclos de congelación y descongelación. Antes de la medición, equilibrar los extractos congelados a temperatura ambiente, mezclar en vórtex completamente durante 10 segundos y centrifugar durante 5 minutos a 500-3000 g.

### 2. Otros dispositivos de extracción

**2.1 Procedimientos de extracción**

Seguir las instrucciones de uso incluidas el dispositivo de extracción correspondiente:

- Dispositivo de extracción fecal Roche (código 10745804322) o Smart-Prep de BÜHLMANN (código B-CAL-RD);
- ScheBo® Quick-Prep™ (código B-CAL-SO50).

Importante: Después de la extracción con BÜHLMANN Smart Prep y ScheBo® Quick-Prep™, centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3000 g. Alternativamente, transferir el homogeneizado a un tubo de Eppendorf de 2 mL y centrifugar en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000 g. Decantar el sobrenadante en un tubo fresco y etiquetado y continuar con el procedimiento de ensayo.

### 2.2 Conservación de los extractos

Los extractos de calprotectina fecal obtenidos con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ son estables a 2-8 °C durante ≤ 7 días y a –20 °C hasta 36 meses.

## 3. Extracción manual

### 3.1 Procedimiento de extracción

1. Etiquetar y pesar el tubo de polipropileno vacío, incluida el asa de siembra. Anotar el peso (tara).
2. Sacar de 50 a 100 mg de la muestra de materia fecal por medio del asa de siembra, colocarla en el tubo anteriormente pesado y volver a pesarla (peso bruto). En el muestreo, evitar las fibras presentes en la muestra.
3. Calcular la cantidad neta de la muestra, restando la tara del peso bruto, romper el asa de siembra y dejar la parte inferior en el tubo.
4. Añadir el tampón de extracción según la fórmula
   x mg materia fecal × 49 = y µL tampón de extracción
   (p.ej. 50 mg de materia fecal + 2450 µL tampón) en el tubo y cerrarlo.
5. Extraer las muestras siguiendo los pasos:
   - Mezclar vigorosamente el tubo de extracción que contiene el tampón y la muestra fecal en un vórtex (multitubo) durante 30 segundos (a la velocidad máxima).
   - A continuación, incubar el tubo de extracción durante 25 ± 5 minutos en un agitador de placas a unas 400 rpm. El asa de siembra en el tubo sirve para mejorar la agitación.
   - Una vez más, mezclar vigorosamente mediante vórtex el tubo de extracción durante 30 segundos.
6. Transferir 1,5 mL de homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000 g.
7. Decantar el sobrenadante en un tubo fresco y etiquetado y continuar con el procedimiento de ensayo o almacenar los extractos (consultar el apartado de conservación de extractos).

### 3.2 Conservación de los extractos

La calprotectina fecal obtenida por extracción manual puede conservarse a 2-8 °C durante ≤ 7 días y a –20 °C hasta 36 meses.

## INTERVALO DE TRABAJO

El ensayo puede realizarse como procedimiento ELISA de intervalo inferior o extendido. Se debe seleccionar el procedimiento apropiado en función de la concentración esperada de calprotectina:

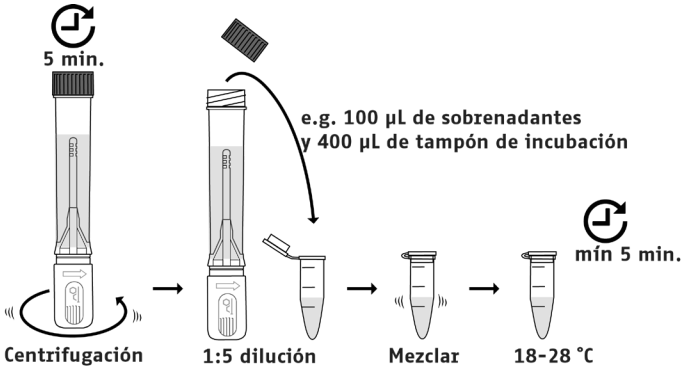
- Para muestras con hasta 600 µg/g de calprotectina, seleccionar el procedimiento de intervalo inferior (intervalo de trabajo 10-600 µg/g).
- Si las muestras tienden a superar los 600 µg/g, seleccionar el procedimiento de intervalo extendido (intervalo de trabajo 30-1800 µg/g).

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Importante: Equilibrar los reactivos a 18-28 °C durante al menos 30 minutos antes de usarlos. Diluir exclusivamente los extractos fecales. Los calibradores y controles están listos para usar.

### 1. Opción 1 de dilución de muestras: Intervalo de trabajo 10-600 µg/g

1.1. Dispositivo CALEX® Cap: Diluir los extractos de heces 1:5 con el tampón de incubación (por ejemplo, 100 µL de extracto y 400 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.

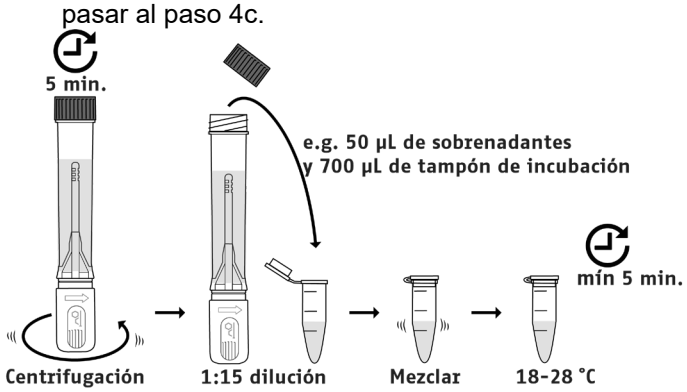



1.2 Extracción manual, Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™: Diluir los extractos de heces 1:50 con el tampón de incubación (por ejemplo, 20 µL de extracto y 980 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.

### 1.` Opción 2 de dilución de muestras: Intervalo de trabajo 30-1800 µg/g

El intervalo de trabajo se puede ampliar en un factor 3 diluyendo las muestras 1:7500 en lugar de 1:2500. Se recomienda este procedimiento si se esperan altas concentraciones de calprotectina.

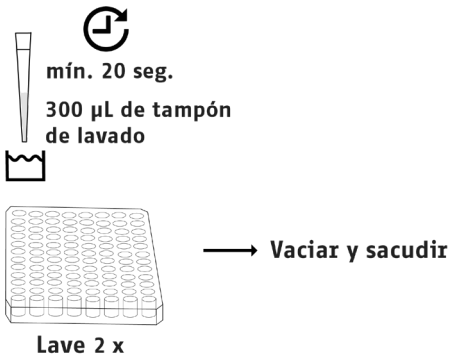
1.1` Dispositivo CALEX® Cap Diluir los extractos de heces 1:15 con el tampón de incubación (por ejemplo, 50 µL de extracto y 700 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.



1.2` Manual extraction, Smart-Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir los extractos de heces 1:150 con el tampón de incubación (por ejemplo, 20 µL de extracto y 2980 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.

2. Preparar un marco de placa con suficientes tiras para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidas. Retirar las tiras sobrantes del marco y volver a sellarlas en la bolsa de aluminio junto con los paquetes de secante sin demora. Conservar refrigeradas.
3. Lavar los pocillos recubiertos dos veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo. Vacíar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.

Importante: El tampón de lavado debe permanecer en los pocillos durante un mínimo de 20 segundos durante cada paso de lavado.

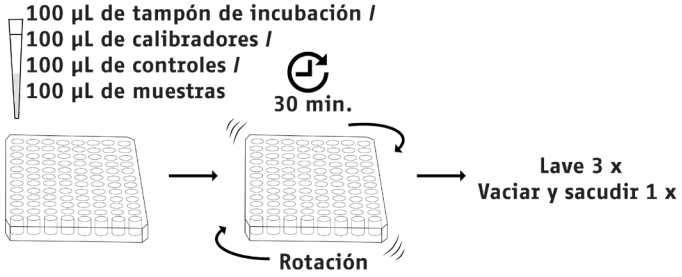



4a. Pipetear 100 µL de tampón de incubación (blanco) y
Pipetear 100 µL de los calibradores A-E en los pocillos respectivos.

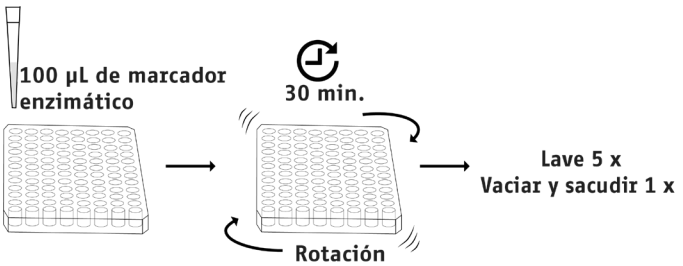
4b. Pipetear 100 µL de los controles bajo y alto en los pocillos respectivos.

4c. Pipetear 100 µL de cada muestra diluida en los pocillos siguientes.

5. Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado e incubar durante 30 + máx. 5 minutos en un agitador de placas a ~450 rpm a 18-28 °C (véanse las Precauciones técnicas - Procedimiento ELISA).
6. Retirar y desechar la alfombrilla de sellado. Vaciar los pocillos y lavar tres veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo (véanse las Precauciones técnicas - Procedimiento ELISA). Vacíar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.

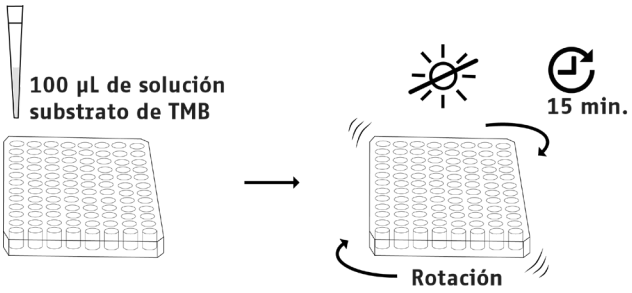



7. Pipetear 100 µL del marcador enzimático en todos los pocillos.
8. Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado e incubar durante 30 ±5 minutos en un agitador de placas ajustado a ~450 rpm a 18-28 °C.
9. Retirar y desechar la alfombrilla de sellado. Vaciar los pocillos y lavarlos cinco veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo. Vacíar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.

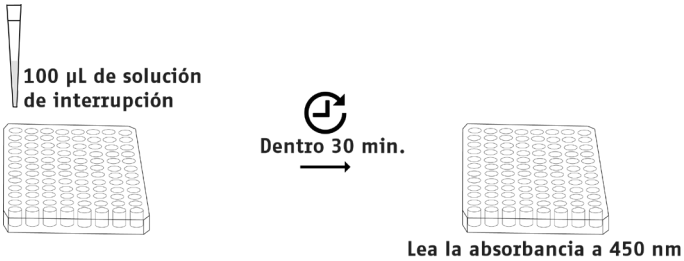



Importante: Equilibrar la solución sustrato de TMB a 18-28 °C.

10. Pipetear 100 µL de la solución sustrato de TMB a cada pocillo.
11. Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado, proteger la placa de la luz directa e incubar durante 15 ±2 minutos en un agitador de placas ajustado a ~450 rpm a 18-28 °C.




12. Pipetear 100 µL de solución de parada en todos los pocillos. Eliminar las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Realizar el paso 13 en un plazo de 30 minutos.
13. Leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.




## CONTROL DE CALIDAD

Para usar correctamente el producto, es necesario entender a fondo estas instrucciones de uso. Solo se obtendrán resultados fiables aplicando técnicas precisas de laboratorio y siguiendo con precisión estas instrucciones de uso.

El kit BÜHLMANN fCAL® ELISA se suministra con dos controles: el control bajo y el control alto. Los valores de referencia de los controles se indican en la hoja de datos de control de calidad incluida en cada kit. Los valores e intervalos indicados en la hoja de datos de control de

calidad siempre se refieren al lote en cuestión y deben utilizarse para la comparación directa de los resultados. En caso de que los resultados de los controles bajo y/o alto estuvieran fuera del intervalo indicado en la hoja de datos de control de calidad, se recomienda considerar inválida la serie completa.

Se recomienda el uso de controles internos, además de los controles del kit, de acuerdo con la normativa local y nacional. El uso de controles internos se recomienda para asegurar la validez continuada de los resultados. Dado que no existe ningún control para la calprotectina fecal disponible comercialmente, para el control de calidad interno se recomienda el uso de un grupo de extractos fecales con niveles normales y alterados.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe estar dentro de los límites de aceptabilidad establecidos del laboratorio. Si la eficacia diagnóstica del ensayo no cumple los límites establecidos y se han excluido errores en la técnica mediante la repetición, comprobar los siguientes aspectos: i) dispositivos de pipeteado, control de temperatura y temporización; ii) ajustes del lector ELISA; iii) fechas de caducidad de los reactivos; iv) condiciones de conservación e incubación; v) color de la solución sustrato de TMB (debe ser incolora); vi) pureza del agua; vii) métodos de aspiración y lavado.

## ESTANDARIZACIÓN

Los valores de los calibradores de BÜHLMANN fCAL® ELISA se determinan en varias series de mediciones utilizando material de referencia interno procedente de suero humano y el procedimiento de medición de BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentración de calprotectina del material de referencia interno se estableció utilizando MRP8/14 purificado de granulocitos humanos como material de referencia principal.

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

### Curva estándar

Se recomienda utilizar un programa informático capaz de realizar los siguientes cálculos: restar el valor de DO del blanco de cada pocillo del calibrador para calcular el valor del calibrador. Determinar una curva estándar usando un ajuste logístico de 4 parámetros.

### Controles y muestras

Se recomienda utilizar un programa informático capaz de realizar los siguientes cálculos: restar el valor de DO del blanco de cada pocillo de control o muestra. Calcular la concentración de calprotectina del control o muestra en cada pocillo, en µg/g, utilizando la curva estándar establecida.

### Intervalo de trabajo 10-600 µg/g

Si se selecciona el procedimiento ELISA de intervalo inferior, las concentraciones del calibrador deben fijarse como sigue: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de calprotectina. Los resultados deben multiplicarse por los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final diferente a 1:2500) para obtener los resultados finales.

Consultar la tabla 12 y la figura 1 para datos representativos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva estándar se muestran solo a efecto de ejemplificación. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras a analizar.

### Intervalo de trabajo 30-1800 µg/g

Si se elige el procedimiento ELISA de intervalo extendido, los valores nominales del calibrador deben fijarse como sigue: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de calprotectina. Los resultados deben multiplicarse por los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final diferente a 1:7500) para obtener los resultados finales.

Consultar la tabla 15 y la figura 4 para datos representativos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva estándar se muestran solo a efecto de ejemplificación. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras a analizar.

## LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit BÜHLMANN fCAL® ELISA están destinados exclusivamente a la determinación de la concentración de calprotectina en muestras de heces humanas.
- Los resultados del ensayo deben ser interpretados en combinación con la información derivada de la evaluación clínica del paciente y los otros procedimientos diagnósticos.
- En el control de la EII, se ha sugerido que las mediciones múltiples de calprotectina fecal realizadas a intervalos de hasta 4 semanas maximizan la precisión diagnóstica en el pronóstico las recaídas clínicas de los enfermos (ref. 19-20).
- Los pacientes que toman antinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden presentar concentraciones elevadas de calprotectina fecal.
- Los resultados pueden no ser clínicamente aplicables a niños menores de 4 años de edad con ligeros aumentos de la concentración de calprotectina fecal (ref. 21-24).

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### I. Diferenciar entre las enfermedades gastro-intestinales orgánicas de las funcionales

Las categorías de resultados se basan en datos de estudios clínicos realizados por BÜHLMANN y son recomendaciones de BÜHLMANN. Todos los resultados del ensayo deben ser interpretados en combinación con la información derivada de las manifestaciones clínicas del paciente, sus antecedentes médicos y otros datos clínicos y de laboratorio:

**Umbrales clínicos**

Se analizaron los resultados de 58 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con SII y 131 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con EII, de un estudio clínico internacional, para obtener los valores mostrados en la tabla 4.

| Concentración de calprotectina | Interpretación | Seguimiento |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normal | Ninguno |
| 80 – 160 µg/g | Zona gris/valor límite | Seguimiento en un plazo de 4 a 6 semanas |
| > 160 µg/g | Elevado | Repetir según sea necesario |

Tabla 4

**Valores de calprotectina por debajo de 80 µg/g**

Unos valores de calprotectina fecal <80 µg/g no son indicativos de inflamación gastrointestinal. Los pacientes con bajas concentraciones de calprotectina probablemente no necesiten procedimientos invasivos para determinar la causa de la inflamación.

**Valores de calprotectina entre o igual a 80 y 160 µg/g**

Unos valores intermedios de calprotectina fecal de entre o igual a 80 y 160 µg/g, también denominados valores de la zona gris, no son una indicación directa de inflamación activa que requiera un seguimiento inmediato con pruebas invasivas. Sin embargo, no se puede excluir la presencia de inflamación. Se recomienda la reevaluación de los valores de calprotectina fecal después de entre 4 y 6 semanas para determinar el estado inflamatorio.

**Valores de calprotectina superiores a 160 µg/g**

Los valores de calprotectina fecal >160 µg/g son indicativos de infiltrado neutrofílico en el tubo gastrointestinal y pueden indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria activa. Se recomienda llevar a cabo los procedimientos de investigación especializados oportunos para alcanzar un diagnóstico clínico global.

**Evaluación clínica**

La capacidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA para diferenciar la EII de los otros trastornos gastrointestinales no inflamatorios, incluido el SII, se evaluó en un estudio clínico en el que participaron 337 pacientes adultos y niños. Ciento treinta y cinco (135) pacientes tenían un diagnóstico final de EII (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o colitis intermedia), 130 pacientes presentaban SII y 72 pacientes presentaban dolor abdominal y/o diarrea u otras afecciones gastronitestinales no inflamatorias (véase la tabla 5). El diagnóstico final se apoyó en datos endoscópicos y otros datos clínicos.

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 µg/g y una especificidad clínica del 83,7% a 160 µg/g en la diferenciación entre la EII y otras afecciones gastrointestinales no inflamatorias, incluido el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,923 (véase la tabla 6).

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 µg/g y una especificidad clínica del 85,4% a 160 µg/g en la diferenciación entre la EII y el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,933 (véase la tabla 8).

La combinación óptima de cortes para estos grupos de pacientes se estableció en 80 µg/g y 160 µg/g de calprotectina mediante el análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC). Esta combinación es ligeramente más restrictiva que la combinación de **un corte inferior más sensible de 50 µg/g,** con una especificidad ligeramente inferior, y **un corte superior de 200 µg/g,** con una sensibilidad ligeramente inferior (tablas 7 y 9).

## II. IBD monitoring

**Umbrales clínicos y evaluación**

La determinación de la calprotectina fecal es un método fiable y sencillo para facilitar el control de los pacientes con EII (ref. 7-18).

Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios independientes determinaron la correlación entre los valores de calprotectina y el estado inflamatorio de la mucosa intestinal del paciente basado en las evaluaciones endoscópicas (tabla 10). Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios determinaron el valor diagnóstico de la calprotectina para pronosticar la remisión y las recaídas clínicas, sobre la base de los síntomas, los índices de actividad clínica, la necesidad no programada de aumento del tratamiento, la hospitalización y las urgencias (tabla 11).

Las categorías de resultados mostradas son recomendaciones y su determinación se basa en el conocimiento condensado de los valores de corte y los estudios de eficacia diagnóstica publicados. Se recomienda la determinación de los umbrales individuales de cada paciente por el médico sobre la base del valor de referencia de calprotectina del paciente durante la remisión de la enfermedad.

**Valores de calprotectina por debajo de 100 µg/g**

Unos valores de calprotectina fecal por debajo de 100 µg/g pueden indicar de forma fiable que el paciente presenta bajo riesgo de recaída clínica y se encuentra en remisión endoscópica, por lo que pueden evitarse los procedimientos endoscópicos invasivos (ref. 7-18).

**Valores de calprotectina entre 100 y 300 µg/g**

Fecal calprotectin levels between 100-300 µg/g may indicate the necessity of tighter control in the following period to assess disease development tendencies.

**Valores de calprotectina superiores a 300 µg/g:**

Si se obtienen valores de calprotectina fecal superiores a 300 µg/g, se debe repetir el ensayo y, en caso de confirmarse el resultado, realizar pruebas ulteriores (ref. 7-18).

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La eficacia diagnóstica de BÜHLMANN fCAL® ELISA se estableció utilizando el método de extracción manual, a menos que se indique lo contrario.

**Intervalo de trabajo: 10-600 µg/g**

**Repetibilidad (precisión intraensayo): 1,9-8,0% CV**

**Precisión dentro de un mismo laboratorio: 5,5-14,0% CV**

La repetibilidad y la precisión dentro del laboratorio se determinaron de acuerdo con la norma EP05-A2 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 22 días × 2 repeticiones. Se analizaron diez muestras de heces extraídas. Los valores se presentan en la tabla 13.

**Límite de detección (LoD): 4,2 µg/g**

El LoD se determinó de acuerdo con la norma EP17-A del CLSI y con proporciones de falsos positivos (α)

inferiores al 5% y de falsos negativos (β) inferiores al 5% sobre la base de 240 determinaciones, con 80 muestras de blanco (tampón de extracción) y 160 repeticiones de valores bajos; y un **LoB de 0,29 µg/g**. Se utilizó una función de spline cúbico para extrapolar los valores de DO de las muestras de blanco a concentraciones de calprotectina en µg/g.

**Límite de cuantificación (LoQ): 9,8 µg/g**

Se realizaron cuarenta determinaciones de diez muestras de heces con valores de entre 5,2 y 1254 µg/g para generar un perfil de precisión no lineal y establecer un LoQ basado en un objetivo de precisión del 20% CV. Se obtuvieron mediciones precisas con <15% CV en todo el intervalo estándar de 10 a 600 µg/g. Los resultados se presentan en la figura 2.

**Linealidad: 10-600 µg/g**

El intervalo de linealidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA se ha determinado conforme a la norma EP06-A del CLSI. Se permitió una desviación máxima de la linealidad de ±20%. Para valores inferiores a 75 µg/g se permitió una diferencia absoluta inferior a ±15 µg/g (tabla 14).

**Exactitud/Recuperación**

**Sesgo total: –1,1%;**

**Límite inferior de concordancia: –17,5%,**

**Límite superior de concordancia: 15,4%**

Cuatro muestras fecales extraídas negativas se enriquecieron con cantidades crecientes de calprotectina de muestras de suero. Los resultados se presentan en la figura 3.

**Efecto gancho a dosis altas**

Se pueden medir muestras con concentraciones teóricas de hasta 60'000 µg/g sin limitar el intervalo de medición del ensayo.

**Intervalo de trabajo: 30-1800 µg/g**

**Repetibilidad (precisión intraensayo): 1,7-5,8% CV**

**Precisión dentro de un mismo laboratorio: 3,1-9,4% CV**

La repetibilidad y la precisión dentro de un mismo laboratorio se determinaron de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 10 días × 2 series × 4 repeticiones. Se analizaron siete extractos de muestras de heces combinadas (tabla 16).

**Precisión entre lotes: 4,2-9,7% CV**

La reproducibilidad entre lotes se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 3 lotes × 5 días × 5 repeticiones. Se analizaron seis muestras de heces extraídas. Para el análisis de los datos se utilizó un modelo de componentes de varianza de efectos aleatorios. Los valores se presentan en la tabla 17.

**Reproducibilidad (estudio multicéntrico de evaluación de la precisión): 6,4-19,0% CV**

La reproducibilidad se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI con un diseño de 3 laboratorios × 2 operadores × 5 días × 2 series × 4 repeticiones. Para las dos series realizadas cada día, los operadores alternaron entre dos lectores ELISA diferentes y dos lotes de reactivos diferentes. En total, se usó un total de tres lotes de reactivos en todos los centros del estudio. Se analizaron cinco extractos de muestras de heces combinadas (tablas 18 y 19).

**Límite de detección (LoD): 12,6 µg/g**

El LoD se determinó de acuerdo con la norma EP17-A2 del CLSI y con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5% y de falsos negativos (β) inferiores al 5% sobre la base de 120 determinaciones, con 60 muestras de blanco (tampón de extracción) y 60 repeticiones de valores bajos; y **un LoB de 8,3 µg/g**.

**Límite de cuantificación (LoQ): 21,3 µg/g**

El LoQ se determinó conforme a la norma EP17-A2 del CLSI sobre la base de 60 determinaciones y un objetivo de precisión del 20% CV.

**Linealidad: 30-1800 µg/g**

El intervalo de linealidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA se ha determinado conforme a la norma EP06-A del CLSI. Se permitió una desviación máxima de la linealidad de ±20%. Para valores inferiores a 75 µg/g se permitió una diferencia absoluta inferior a ±15 µg/g (tabla 20).

**Exactitud/recuperación: 96,4-102,2%**

Siete extractos de muestras de heces de restos clínicos con valores de calprotectina que abarcaban el intervalo de medición completo se enriquecieron con 180 µg/g de calprotectina del material de calibración. El enriquecimiento se realizó al 10% del volumen del extracto de la muestra. Las «muestras de referencia» se enriquecieron con el volumen correspondiente de tampón de incubación. Las muestras de referencia y las muestras enriquecidas se analizaron por triplicado con un lote de reactivo. Los valores se presentan en la tabla 21.

**Procedimientos preanalíticos**

La eficacia diagnóstica de BÜHLMANN fCAL® ELISA en lo relativo a los procedimientos preanalíticos se estableció en el intervalo de trabajo 30-1800 µg/g.

**Reproducibilidad de la extracción - extracción manual: 9,5-20,5%**

La reproducibilidad de la extracción se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 10 extracciones × 2 repeticiones. Se analizaron nueve muestras clínicas de heces, que comprendían muestras con consistencia sólida, semisólida y líquida. Los valores se presentan en la tabla 22.

**Reproducibilidad de la extracción: CALEX® Cap: 7,9-16,9%**

La reproducibilidad de la extracción se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 3 lotes de CALEX® Cap × 4 extracciones × 4 réplicas. Se analizaron cinco muestras clínicas de heces, que comprendían muestras con consistencia sólida, semisólida y líquida. Los valores se presentan en la tabla 23.

**Comparación de métodos: CALEX® Cap frente a extracción manual**

**Sesgo en 80 µg/g: 5,9% (IC del 95%:1,4-12,2%)**

**Sesgo en 160 µg/g: 12,0% (IC del 95%: 7,8-17,0%)**

**Sesgo medio: 10,1% (IC del 95%: 5,7-14,5%)**

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se extrajeron doscientas cuarenta y una (241) muestras clínicas con un lote del dispositivo CALEX® Cap. Se establecieron valores de referencia en los extractos obtenidos con el método de extracción manual. En total, se evaluaron 172 muestras en el rango de medición de BÜHLMANN fCAL® ELISA y se determinó un intervalo de referencia de concentración de calprotectina de 30,5-1496,6 µg/g. Se realizaron extracciones únicas y valoraciones para ambos métodos. El sesgo se determinó mediante regresión lineal de Passing-Bablok y el método de Bland-Altman (tablas 24 y 25).

## SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

La sensibilidad del ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA a los productos farmacéuticos orales, suplementos nutricionales, hemoglobina y microbios enteropatógenos se evaluó de acuerdo con la norma EP07-A2 del CLSI. Sesgos superiores al 10% en los resultados se consideraron interferencia. No se detectaron interferencias con las sustancias que se muestran en la tabla 26, hasta las concentraciones indicadas. No se detectó interferencia con los microbios enteropatógenos que se muestran en la tabla 27 hasta las concentraciones indicadas de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de extracto fecal.

# PORTUGUÊS

## USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN fCAL® ELISA é um teste de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas, para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DIIs; mais especificamente doença de Crohn ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7) em pacientes com dor abdominal crônica e também como auxiliar no monitoramento das DIIs (ref. 7-18).

Somente para uso laboratorial.

## PRINCÍPIO DO ENSAIO

O BÜHLMANN fCAL® ELISA permite a medição seletiva da calprotectina em extratos fecais através do método ELISA Sandwich. A placa de microtitulação do BÜHLMANN fCAL® ELISA é revestida com um anticorpo monoclonal de captura (mAb) altamente específico para os complexos heterodiméricos e poliméricos da calprotectina. Os extratos das amostras fecais dos pacientes, os controles para determinação da aceitabilidade da corrida do ELISA e os calibradores são carregados nos poços da placa de microtitulação. Depois de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e de etapas de lavagem, um anticorpo de detecção (Ab) conjugado a uma peroxidase de raiz forte (HRP) detecta as moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo de captura na placa. Depois da incubação e de etapas adicionais de lavagem, o substrato cromogênico de HRP tetrametilbenzidina (TMB) é adicionada (formação da cor azul), seguida de uma solução de interrupção (mudança para a cor amarela). A absorção é medida a 450 nm. A concentração final da calprotectina (µg/g) nas amostras fecais dos pacientes é determinada usando-se a curva de calibração gerada a partir dos valores medidos dos calibradores

## REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

| Reagentes | Quantidade | | Código | Reconstituição |
|---|---|---|---|---|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| **Tampão de extração** | 3 frascos x 125 mL | 6 frascos x 125 mL | B-CAL-EX | Pronto para utilização |
| **Placa de microtitulação** pré-revestida com mAb anticalprotectina | 12 tiras x 8 poços com suporte | 2 x 12 tiras x 8 poços com suporte | B-CAL-MP | Pronto para utilização |
| **Selador da placa** | 3 unidades | 6 unidades | - | Pronto para utilização |
| **Concentrado do tampão de lavagem (10x)** com conservantes | 1 frasco x 100 mL | 2 frascos x 100 mL | B-CAL-WB | Diluir cada um com 900 mL de água deionizada. |
| **Tampão de incubação** com conservantes | 2 frascos x 125 mL | 3 frascos x 125 mL | B-CAL-IB | Pronto para utilização |
| **Calibradores A a E**[1) 2)] Calprotectina derivada de soro em matriz-tampão com conservantes | 5 frascos x 1 mL | 5 frascos x 1 mL | B-CAL-CASET | Pronto para utilização |
| **Controle alto / baixo**[3)] Calprotectina derivada de soro em matriz-tampão com conservantes | 2 frascos x 1 mL | 2 frascos x 1 mL | B-CAL-CONSET | Pronto para utilização |
| **Marcador enzimático** Ab anticalprotectina conjugado a HRP | 1 frasco x 12 mL | 2 frascos x 12 mL | B-CAL-EL | Pronto para utilização |
| **Substrato de TMB** TMB em tampão de citrato | 1 frasco x 12 mL | 2 frascos x 12 mL | B-TMB12 | Pronto para utilização |
| **Solução de parada** Ácido sulfúrico 0,25 M | 1 frasco x 12 mL | 2 frascos x 12 mL | B-STS12 | Pronto para utilização **Agente corrosivo** |

Tabela 1

[1)] A concentração real de calprotectina nos calibradores A a E é de 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL, respectivamente. Para o procedimento ELISA de faixa mais baixa, os valores dos calibradores devem ser ajustados como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina. Esta atribuição corresponde à diluição final da amostra de 1:2500 no procedimento ELISA de faixa mais baixa.

[2)] Para o procedimento ELISA de faixa estendida, os valores nominais dos calibradores devem ser ajustados como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina. Esta atribuição corresponde à diluição final da amostra de 1:7500 no procedimento ELISA de faixa estendida.

[3)] Os controles contêm quantidades de calprotectina humana nativa específicas a cada lote. Consulte a folha de dados de CQ adicional para obter as concentrações reais.

## ARMAZENAMENTO PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

| **Reagentes selados / não abertos** | |
|---|---|
| Guarde a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nos rótulos. | |
| **Reagentes abertos / reconstituídos** | |
| Tampão de extração | Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. |
| Placa de microtitulação | Retorne imediatamente as tiras não usadas para a embalagem aluminizada contendo os sachês de dessecante e torne a selar ao longo de toda a borda do fecho tipo zip.<br>Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. |
| Tampão de lavagem diluído | Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. |
| Tampão de incubação | |
| Calibradores | |
| Controles | |
| Marcador enzimático | |
| Substrato de TMB | |
| Solução de parada | |

Tabela 2

## REAGENTES E MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

### Dispositivos de extração fecal

Os dispositivos de extração fecal descritos na Tabela 3 não são fornecidos com o kit. Os dispositivos de extração selecionados devem ser pedidos separadamente.

| Kits de dispositivos de extração | Quantidade | Código |
|---|---|---|
| **CALEX® Cap** | Pacotes de 50, 200 ou 500 tubos disponíveis, cada um preenchido com 5 mL de tampão de extração.<br>Pronto para utilização | B-CALEX-C50<br>B-CALEX-C200<br>B-CALEX-C500 |
| **Smart-Prep** | 50 tubos, espátulas e tampas de base | B-CAL-RD |
| **ScheBo® Quick-Prep™** | 50 tubos incluindo tubo, cone e ponta dosadora, cada um preenchido com 1,3 mL de tampão de extração<br>Pronto para utilização | B-CAL-SO50 |

Tabela 3

## MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

### Procedimento de extração

- Pipetas de precisão de 100 µL e 1000 µL com ponteiras descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a transferência de extratos (opcional).
- Estação de trabalho de fluxo laminar.
- Misturador tipo vórtex multitubo / misturador tipo vórtex
- Microcentrífuga (≥3000 g)
- Centrífuga (≥500 g)
- Dispositivos de extração (consulte a tabela 3 acima) ou, para o procedimento de extração manual:
  - Alças de inoculação descartáveis de 10 µL
  - Tubos de polipropileno de 15 mL com tampas rosqueadas são necessários
  - Balança de precisão (10–200 mg)

### Procedimento ELISA

- Pipetas de precisão de 10 µL, 100 µL e 1000 µL com ponteiras descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a preparação de diluições de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para a diluição do tampão de lavagem.
- Lavador automático para a placa de microtitulação (verifique as precauções técnicas) ou pisseta para o tampão de lavagem.
- Agitador para a placa de microtitulação (verifique as precauções técnicas)
- Papel mata-borrão
- Leitor de placa de microtitulação para medição da absorbância a 450 nm.

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

### Precauções de segurança

- Os calibradores e controles deste teste contêm componentes de origem humana. Embora testados negativos para o antígeno de superfície do HBV, anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e usando-se as precauções apropriadas.
- A solução de parada contém ácido sulfúrico (0,25 M). Esse composto é um irritante dos olhos, pele e membranas mucosas. Evite o contato com os olhos, a pele ou a roupa. Em caso de contato com os olhos ou a pele, lave imediatamente com água em abundância.
- Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água; caso contrário poderá ocorrer irritação/queimaduras.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

### Precauções técnicas

#### Componentes do kit

- Os resíduos nos poços da placa de microtitulação resultam do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento do ensaio) e não afetam os resultados.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.

- Não misture ou utilize componentes de kits com diferentes números de lotes.
- Todas as providências devem ser tomadas para assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Deixe os reagentes atingirem equilíbrio à temperatura ambiente. Misture bem os reagentes (vórtex) antes de usar.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

**Procedimento de extração manual**

- Para obter resultados quantitativos, é importante homogeneizar completamente a amostra fecal adicionada ao tampão de extração. Devem-se evitar contaminações na parte superior do tubo de extração. Uma pequena quantidade de partículas insolúveis poderá permanecer depois da mistura.

**Procedimento ELISA**

- No procedimento do ELISA, as etapas de lavagem são essenciais para garantir resultados reproduzíveis. Deixe o tampão de lavagem incubar nos poços por pelo menos 20 segundos antes de retirar.
- Se um lavador automático estiver sendo usado, recomenda-se enfaticamente empregar o "modo de placa", i.e., cada etapa do processo (distribuição / aspiração) é executada em todas as tiras sequencialmente, antes que o instrumento passe para o próximo ciclo de lavagem. Dessa forma, o tempo mínimo de incubação é garantido.
- O número indicado de ciclos de lavagem é essencial para assegurar a obtenção de resultados reproduzíveis.
- O agitador da placa deve ser ajustado para aproximadamente 450 rpm (7,5 Hz). Uma frequência de rotação mais elevada pode levar a uma linearidade de diluição deficiente a valores entre 300/900 e 600/1800 µg/g. Deve-se usar um movimento rotacional em vez de horizontal.
- Para assegurar que a reação antígeno/anticorpo seja completa, o tempo de incubação na etapa 5 deve ser de pelo menos 30 minutos. Períodos de incubação moderadamente mais longos (até 5 minutos a mais) não influenciam o resultado final.
- O marcador enzimático é desativado por oxigênio e é altamente sensível a azida de sódio, timerosal, ácido hipocloroso e hidrocarbonetos clorados aromáticos normalmente encontrados no suprimentos de água de laboratório. Assim, utilize somente água deionizada de alta qualidade.
- Uma nova curva padrão deverá ser gerada sempre que um novo teste for realizado (para cada placa ou placa parcial).
- Se a concentração inicial de uma amostra desconhecida indicar uma leitura acima da concentração do maior calibrador (E), a amostra deverá ser adicionalmente diluída com o tampão de incubação e testada novamente de acordo com o procedimento de teste. O fator de diluição total resultante deverá ser levado em conta no cálculo dos resultados.

## COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Para o procedimento de extração, menos de 1 g da amostra nativa de fezes será necessário. Colete as amostras de fezes em tubos comuns.

Importante: A amostra deve ser coletada sem nenhum aditivo químico ou biológico.

**Transporte das amostras**

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório para processamento até 3 dias depois da coleta. Elas devem ser transportadas à temperatura ambiente ou refrigeradas.

**Armazenamento das amostras**

As amostras de fezes devem ser armazenadas a uma temperatura na faixa de 2-8 °C e extraídas até 3 dias depois de recebidas no laboratório. Não guarde amostras a temperaturas elevadas.

## EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES E ARMAZENAMENTO DOS EXTRATOS

### 1. CALEX® Cap

#### 1.1 Procedimento de extração

Siga as instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap (Código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositivo CALEX® Cap: As amostras líquidas de fezes podem ser pipetadas diretamente no dispositivo CALEX® Cap. Desenrosque a tampa azul e pipete 10 µL da amostra de fezes no dispositivo. Recoloque a tampa no dispositivo CALEX® Cap e proceda com a etapa de mistura por vórtex de acordo com o procedimento de extração descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap.

Importante: Centrifugue o dispositivo CALEX® Cap por 5 minutos a 500 - 3000x g antes de executar o procedimento.

#### 1.2 Armazenamento dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o CALEX® Cap permanecem estáveis à temperatura ambiente por 3 dias e, na faixa de temperatura de 2–8 °C, por até 6 dias. Para armazenar por períodos de tempo mais longos, congele os extratos a -20 °C. Os extratos congelados se mantêm estáveis por um período de até 23 meses.
Os extratos do CALEX® Cap podem ser congelados diretamente e armazenados dentro do dispositivo CALEX® Cap. Os extratos podem ser submetidos a até quatro ciclos de congelamento-descongelamento. Antes da medição, deixe os extratos congelados atingirem o equilíbrio à temperatura ambiente, misture bem por agitação vórtex por 10 segundos e então centrifugue por 5 minutos a 500–3000 g.

### 2. Outros dispositivos de extração

#### 2.1 Procedimentos de extração

Siga as instruções de uso fornecidas com o dispositivo de extração usado:

- Dispositivo de extração fecal Roche (Código 10745804322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (Código: B-CAL-RD).
- ScheBo® Quick-Prep™ (Código B-CAL-SO50).

Importante: Depois da extração com o BÜHLMANN Smart-Prep e o ScheBo® Quick-Prep™, centrifugue os tubos por 5 minutos a 3000 g. Opcionalmente, transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue em uma microcentrífuga por 5 minutos a 3000 g. Decante o sobrenadante em um tubo novo rotulado e dê continuidade ao procedimento de teste.

### 2.2 Armazenamento dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o Smart-Prep ou o ScheBo® Quick-Prep™ permanecem estáveis a 2–8 °C por até 7 dias, inclusive, ou a -20 °C por até 36 meses.

## 3. Extração manual

### 3.1 Procedimento de extração

1. Rotule e pese o tubo de polipropileno vazio, incluindo a alça de inoculação. Registre o peso (tara).
2. Colete de 50 a 100 mg da amostra de fezes usando a alça de inoculação e coloque no tubo pré-pesado, pesando-o novamente em seguida (peso bruto). Evite recolher fibras dietéticas presentes na amostra durante o processo de amostragem.
3. Calcule a quantidade líquida da amostra subtraindo a tara do peso bruto, desconecte a alça de inoculação e deixe a parte inferior da alça no tubo.
4. Adicione tampão de extração ao tubo de acordo com a fórmula
   x mg fezes x 49 = y µL de tampão de extração (p. ex., 50 mg de fezes + 2450 µL de tampão) e feche o tubo.
5. Extraia as amostras da seguinte maneira:
   - Agite vigorosamente o tubo de extração que contém o tampão e a amostra de fezes usando um misturador tipo vórtex (multitubo) à velocidade mais alta por 30 segundos.
   - Em seguida, incube o tubo de extração por 25 ± 5 minutos em um agitador de placas a aproximadamente 400 rpm. A alça de inoculação no interior do tubo ajuda a acentuar o efeito da agitação.
   - Mais uma vez, agite vigorosamente o tubo de extração por vórtex por 30 segundos.
6. Transfira 1,5 mL do homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue em uma microcentrífuga por 5 minutos a 3000 g.
7. Decante o sobrenadante em um tubo rotulado novo e dê continuidade ao procedimento de teste, ou então armazene os extratos (consulte a seção sobre o armazenamento de extratos).

### 3.2 Armazenamento dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos por extração manual podem ser armazenados a 2–8 °C por até 7 dias, inclusive, ou a -20 °C por até 36 meses.

## FAIXA DE TRABALHO

Este ensaio pode ser realizado de acordo com os procedimentos a seguir: procedimento ELISA de faixa mais baixa ou estendida. O procedimento apropriado deve ser selecionado de acordo com a concentração de calprotectina esperada:

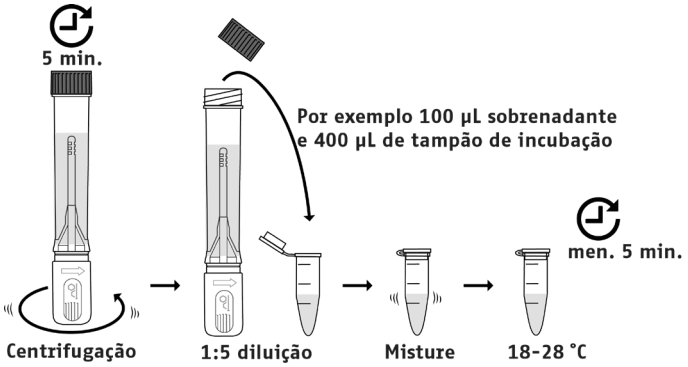
- Para amostras até 600 µg/g de calprotectina, selecione o procedimento de faixa mais baixa (faixa de trabalho de 10–600 µg/g).
- Se as amostras tenderem a ultrapassar 600 µg/g, selecione o procedimento de faixa estendida (faixa de trabalho de 30–1800 µg/g)

## PROCEDIMENTO

Importante: Deixe todos os reagentes atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 30 minutos antes de usar. Somente dilua os extratos fecais. Os calibradores e controles estão prontos para utilização.

**1. Opção de diluição de amostra 1:**
**Faixa de trabalho de 10–600 µg/g**

1.1. Dispositivo CALEX® Cap: Dilua os extratos fecais a 1:5 usando o tampão de incubação (p. ex., 100 µL de extrato e 400 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c

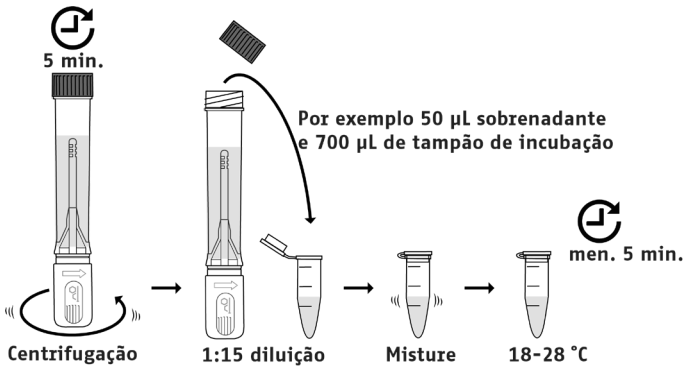



1.2 Extração manual, Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™: Dilua os extratos fecais a 1:50 usando o tampão de incubação (p. ex., 20 µL de extrato e 980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.

**1.` Opção de diluição de amostra 2:**
**Faixa de trabalho de 30–1800 µg/g**

A faixa de trabalho pode ser estendida em um fator de 3 se as amostras forem diluídas a 1:7500 em vez de 1:2500. Este procedimento é recomendado se forem esperadas concentrações elevadas de calprotectina.

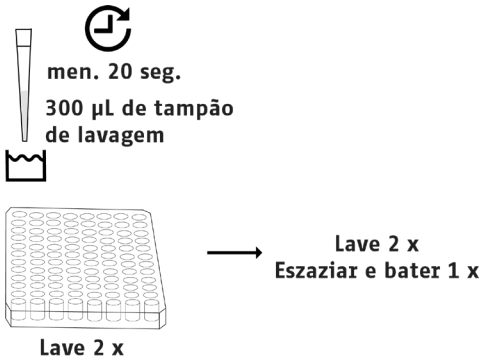
1.1` Dispositivo CALEX® Cap: Dilua os extratos fecais a 1:15 usando o tampão de incubação (p. ex., 50 µL de extrato e 700 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.



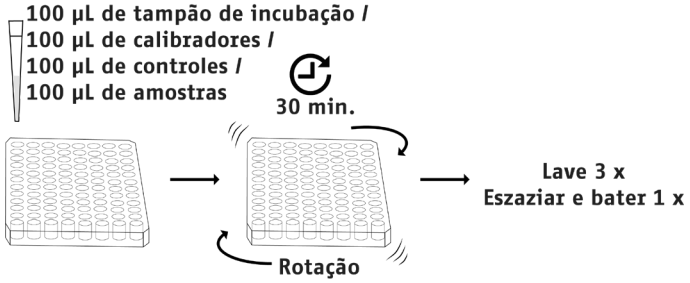
1.2` Extração manual, Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™: Dilua os extratos fecais a 1:150 usando o tampão de incubação (p. ex., 20 µL de extrato e 2980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.

2. Prepare um suporte de placa com tiras suficientes para testar a quantidade requerida de calibradores, controles e amostras diluídas. Remova o excesso de tiras do suporte e torne a selá-las sem demora na embalagem aluminizada, juntamente com os sachês de dessecante. Mantenha sob refrigeração.
3. Lave os poços revestidos duas vezes, usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

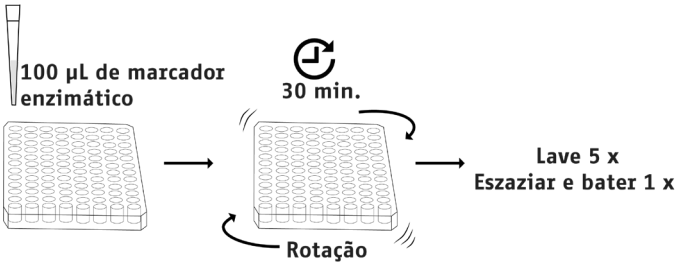
Importante: Deixe o tampão de lavagem nos poços por pelo menos 20 segundos durante cada etapa de lavagem.




4a. Pipete 100 µL do tampão de incubação (branco), e
Pipete 100 µL dos calibradores A – E nos respectivos poços.
4b. Pipete 100 µL dos controles baixo e alto nos respectivos poços.
4c. Pipete 100 µL de cada amostra diluída nos poços subsequentes.
5. Cubra a placa com um selador e incube por 30 + 5 min (máx.) em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C (consulte as Precauções técnicas – Procedimento ELISA).
6. Remova e descarte o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço (consulte as Precauções técnicas – Procedimento ELISA). Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

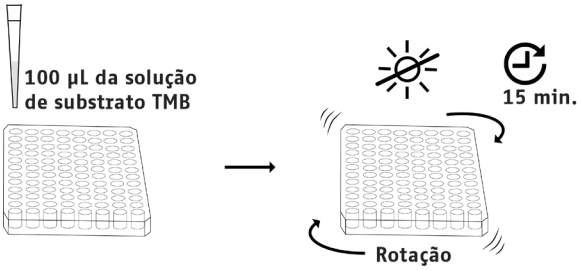



7. Adicione 100 µL do marcador enzimático em todos os poços.
8. Cubra a placa com um selador e incube por 30 ±5 min em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C.
9. Remova e descarte o selador da placa. Esvazie os poços e lave cinco vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.




Importante: Deixe a solução do substrato de TMB atingir o equilíbrio a 18–28 °C.

10. Pipete 100 µL da solução do substrato de TMB em todos os poços.
11. Cubra a placa com um selador, proteja a placa contra luz direta e incube por 15 ±2 min em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C.




12. Pipete 100 µL da solução de parada em todos os poços. Remova bolhas de ar com a ponta de uma pipeta. Execute a etapa 13 dentro de até 30 minutos.
13. Leia a absorbância a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação.

## CONTROLE DE QUALIDADE

Para que se possa utilizar o produto com sucesso, é necessário compreender bem estas instruções de uso. Somente serão obtidos resultados confiáveis se técnicas laboratoriais precisas forem empregadas, seguindo-se estas instruções de uso à risca.

O kit BÜHLMANN fCAL® ELISA é fornecido com dois controles: alto e baixo. Os valores de referência correspondentes dos controles estão indicados na folha de dados de CQ fornecida com cada kit. Os valores e faixas indicados na folha de dados de CQ sempre se referem ao lote do kit em questão e devem ser usados para comparação direta dos resultados. Se os resultados dos controles baixo e/ou alto ficarem fora da faixa

indicada na folha de dados de CQ, recomenda-se considerar toda a corrida como inválida.

Recomenda-se também usar as amostras de controle em adição aos controles do kit, de acordo com as regulamentações locais e nacionais. O uso de amostras de controle interno é recomendado para assegurar a validação diária dos resultados. Uma vez que não existe controle comercialmente disponível para calprotectina fecal, sugerimos utilizar um pool de extratos fecais com níveis normais e patológicos como controle de qualidade interno.

A reprodutibilidade de parâmetros da curva padrão e dos valores de controle deve se manter dentro dos limites estabelecidos da aceitabilidade do laboratório. Se o desempenho do ensaio não atender aos limites estabelecidos e a repetição excluir erros de técnica, verifique os seguintes pontos: i) pipetagem, controle de temperatura e dispositivos de cronometragem; ii) os ajustes do leitor ELISA; iii) as datas de validade dos reagentes; iv) as condições de armazenamento e incubação; v) a solução do substrato de TMB (que deve ser incolor); vi) a pureza da água; e, vii) os métodos de aspiração e lavagem.

## ESTANDARDIZAÇÃO

Os valores dos calibradores do BÜHLMANN fCAL® ELISA são determinados em corridas de medições múltiplas usando-se material de referência interno com base em soro humano, e no procedimento de medição do BÜHLMANN fCAL® ELISA. A concentração de calprotectina do material de referência interno foi determinada usando-se MRP8/14 purificado de granulócitos humanos como material de referência primário.

## CÁLCULOS E RESULTADOS

### Curva padrão

Recomenda-se usar um programa de software capaz de executar os seguintes cálculos: subtrair o valor da densidade óptica (DO) dos brancos de cada poço de calibrador para calcular o valor do calibrador. Gerar uma curva padrão usando ajuste por regressão logística de 4 parâmetros (4 PL).

### Controles e amostras

Recomenda-se usar um programa de software capaz de executar os seguintes cálculos: subtrair o valor da densidade óptica (DO) dos brancos de cada poço de controle/amostra. Calcular a concentração de calprotectina do controle/amostra em cada poço, em µg/g, usando a curva padrão gerada.

### Faixa de trabalho de 10–600 µg/g

Se o procedimento ELISA de faixa mais baixa for selecionado, as concentrações dos calibradores deverão ser ajustadas como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:2500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 12 e a figura 1 para verificar dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e a curva padrão são fornecidos somente a título de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a ser analisado.

### Faixa de trabalho de 30–1800 µg/g

Se o procedimento ELISA de faixa estendida for selecionado, os valores nominais de calibradores a seguir devem ser ajustados como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:7500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 15 e a figura 4 para verificar dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e a curva padrão são fornecidos somente a título de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a ser analisado.

## LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit BÜHLMANN fCAL® ELISA se destinam somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras de fezes humanas.
- Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e de outros procedimentos de diagnóstico.
- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 19-20).
- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) poderão apresentar aumentos nos níveis de calprotectina fecal.
- Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 21-24).

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### I. Como distinguir doenças gastrointestinais orgânicas de funcionais

As categorias de resultados baseiam-se nos dados de estudos clínicos realizados pela BÜHLMANN e são recomendações da BÜHLMANN. Todos os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos sintomas clínicos do paciente, seu histórico médico e outros resultados clínicos e laboratoriais.

#### Limiar clínico

Os resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DIIs (provenientes de um estudo clínico internacional) foram analisadas para se obter os valores descritos na tabela 4.

| Concentração de calprotectina | Interpretação | Acompanhamento |
|---|---|---|
| < 80 µg/g | Normal | Nenhum |
| 80 – 160 µg/g | Zona cinzenta/limítrofe | Retorno dentro de 4-6 semanas |
| > 160 µg/g | Elevada | Repetir conforme necessário |

Tabela 4

**Valores de calprotectina abaixo de 80 µg/g**

Valores de calprotectina fecal abaixo de 80 µg/g não são indicativos de inflamação do trato gastrointestinal. Os pacientes com baixos níveis de calprotectina fecal provavelmente não requerem procedimentos invasivos para determinação da causa da inflamação.

**Valores de calprotectina entre 80 e 160 µg/g**

Os níveis intermediários de calprotectina (entre 80 e 160 µg/g, inclusive), também conhecidos como níveis da zona cinzenta, não são diretamente indicativos de inflamação ativa que necessite de acompanhamento imediato com testes invasivos. Todavia, a presença de inflamação não pode ser descartada. A reavaliação dos níveis de calprotectina fecal depois de 4 a 6 semanas é recomendada para determinação do status inflamatório

**Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g**

Valores de calprotectina acima de 160 µg/g são indicativos de infiltrado de neutrófilos no trato gastrointestinal e, portanto, podem significar a presença de doença inflamatória ativa. Sugere-se a execução de procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas, para se obter um diagnóstico clínico completo.

**Avaliação clínica**

A capacidade do BÜHLMANN fCAL® ELISA de fazer a distinção entre pacientes com DIIs e outros distúrbios não inflamatórios gastrointestinais, incluindo a SII, foi testada em um estudo clínico com um total de 337 pacientes adultos e pediátricos. Cento e trinta e cinco (135) pacientes apresentaram um diagnóstico final de DIIs (doença de Crohn, colite ulcerativa ou colite indeterminada), 130 pacientes sofriam de SII e 72 apresentavam dor abdominal e/ou diarreia ou outras condições não inflamatórias associadas ao trato gastrointestinal (GI) (consulte a tabela 5). O diagnóstico final foi corroborado por resultados endoscópicos e outros resultados clínicos.

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 83,7% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e condições não inflamatórias associadas ao trato GI, incluindo a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,923 (consulte a tabela 6).

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 85,4% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,933 (consulte a tabela 8).

A combinação ótima de ponto de corte para esses grupos de pacientes pôde ser definida por análise de ROC a 80 µg/g e 160 µg/g de calprotectina, valores ligeiramente mais restritivos que uma combinação de um ponto de corte inferior **mais sensível de 50 µg/g** com um desempenho mais baixo em especificidade, e um ponto de corte superior de **200 µg/g, com uma sensibilidade ligeiramente mais baixa** (tabelas 7 e 9).

### II. Monitoramento de DII

**Limiares e avaliação clínica**

A determinação da calprotectina fecal também é uma forma confiável e simples de auxiliar no monitoramento de pacientes com DII (ref. 7-18).
A correlação entre os níveis de calprotectina e o status inflamatório da mucosa intestinal do paciente, de acordo com avaliações endoscópicas, foi determinada em três estudos independentes usando testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 10). Determinou-se o valor do diagnóstico da calprotectina na predição da remissão e recidiva clínicas em três estudos usando-se testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 11), de acordo com os sintomas dos pacientes, os índices de atividade clínica, e a necessidade não planejada de intensificação de terapia, hospitalização ou emergência.
As categorias de resultados mostradas são recomendações e sua determinação se baseia no conhecimento condensado de valores de corte e estudos de desempenho clínico publicados. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limiares individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença.

**Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g:**

Níveis de calprotectina fecal abaixo de 100 µg/g podem indicar confiavelmente pacientes com baixo risco de recidiva clínica que estão em remissão endoscópica e para os quais procedimentos endoscópicos invasivos podem ser evitados (ref. 7-18).

**Valores de calprotectina entre 100 e 300 µg/g**

Níveis de calprotectina fecal entre 100 e 300 µg/g podem indicar a necessidade de um controle mais rigoroso no período seguinte para avaliar as tendências de desenvolvimento da doença.

**Valores de calprotectina acima de 300 µg/g**

Níveis de calprotectina fecal acima de 300 µg/g requerem a repetição do teste e, se confirmados os níveis elevados, indicam a necessidade execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 7-18).

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As características de desempenho do BÜHLMANN fCAL® ELISA foram estabelecidas usando-se o método de extração manual, exceto se indicado de outra forma.

**Faixa de trabalho: 10–600 µg/g**

**Repetibilidade (precisão intraensaio):**
**1,9 - 8,0% do CV**

**Precisão intralaboratorial: 5,5 - 14,0% do CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 22 dias x 2 replicatas. Dez amostras de fezes extraídas foram testadas. Os valores podem ser encontrados na tabela 13.

**Limite de detecção (LoD): 4,2 µg/g**

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI, com proporções de falsos positivos (α) inferiores a 5% e de falsos negativos (β) inferiores a 5%, com base em 240 determinações com 80 brancos (tampão de extração) e 160 replicatas de baixo nível; e um **LoB de 0,29 µg/g**. Uma função paramétrica cúbica foi usada para extrapolar os valores de DO das amostras de branco para concentrações de calprotectina em µg/g.

**Limite de quantificação (LoQ): 9,8 µg/g**

Quarenta determinações de 10 amostras fecais com valores entre 5,2 e 1254 µg/g foram executadas para gerar um perfil de precisão não linear e determinar um LoQ com base em uma meta de precisão de 20 % do CV. Medições precisas abaixo de 15% do CV foram obtidas dentro da faixa padrão total entre 10 e 600 µg/g. Os resultados podem ser vistos na figura 2.

**Linearidade: 10–600 µg/g**

A faixa linear do BÜHLMANN fCAL® ELISA foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Um desvio máximo de ± 20% da linearidade foi permitido. Para valores abaixo de 75 µg/g, uma diferença absoluta inferior a ±15 µg/g foi permitida (tabela 14).

**Precisão / recuperação**

**Desvio total: -1,1%,**

**Limite Inferior de Concordância: -17,5%,**

**Limite superior de concordância: 15,4%**

Quatro amostras fecais extraídas negativas foram fortificadas com quantidades crescentes de calprotectina provenientes de amostras de soro. Os resultados podem ser vistos na figura 3.

**Efeito gancho com dose elevada**

Amostras com concentrações teóricas de até 60'000 µg/g podem ser medidas sem limitar a faixa de medição do ensaio.

**Faixa de trabalho: 30–1800 µg/g**

**Repetibilidade (precisão intraensaio):**
**1,7 - 5,8% do CV**

**Precisão intralaboratorial: 3,1 - 9,4% do CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 10 dias x 2 corridas x 4 replicatas. Sete extratos de amostras fecais agrupados foram testados (tabela 16).

**Precisão entre lotes: 4,2–9,7% do CV**

A reprodutibilidade lote a lote foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 3 lotes x 5 dias x 5 replicatas. Seis amostras de fezes extraídas foram analisadas. Um modelo de componentes de variância de efeito aleatório foi empregado na análise de dados. Os valores podem ser encontrados na tabela 17.

**Reprodutibilidade (estudo multicêntrico de avaliação da precisão): 6,4 - 19,0% do CV**

A reprodutibilidade foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de 3 centros de estudo x 2 operadores x 5 dias x 2 corridas x 4 replicatas. Para as duas corridas realizadas a cada dia, os operadores alternaram entre dois leitores ELISA diferentes e dois lotes de reagentes diferentes. Três lotes de reagentes foram usados no total em todos os centros de estudo. Cinco extratos de amostras fecais agrupados foram testados (tabelas 18 e 19).

**Limite de detecção (LoD): 12,6 µg/g**

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com proporções de falsos positivos (α) inferiores a 5% e de falsos negativos (β) inferiores a 5%, com base em 120 determinações com 60 brancos (tampão de extração) e 60 replicatas de baixo nível; e um **LoB de 8,3 µg/g**.

**Limite de quantificação (LoQ): 21,3 µg/g**

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com base em 60 determinações e uma meta de precisão de 20% do CV.

**Linearidade: 30–1800 µg/g**

A faixa linear do BÜHLMANN fCAL® ELISA foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Um desvio máximo de ± 20% da linearidade foi permitido. Para valores abaixo de 75 µg/g, uma diferença absoluta inferior a ±15 µg/g foi permitida (tabela 20).

**Precisão / recuperação: 96,4–102,2%**

Sete extratos de amostras fecais com níveis de calprotectina abrangendo toda a faixa de medição do teste foram fortificados com 180 µg/g de calprotectina no material do calibrador. A fortificação foi realizada a 10% do volume do extrato da amostra. As amostras de "referência" foram fortificadas com a quantidade correspondente de tampão de incubação. As amostras de "referência" e as de "referência + fortificante" foram medidas em três replicatas com um único lote de reagente. Os valores podem ser encontrados na tabela 21.

**Fase pré-analítica**

As características de desempenho do BÜHLMANN fCAL® ELISA em termos de procedimentos pré-analíticos foram estabelecidas usando-se a faixa de trabalho de 30–1800 µg/g.

**Reprodutibilidade da extração – extração manual: 9,5–20,5%**

A reprodutibilidade da extração foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 10 extrações x 2 replicatas. Nove amostras fecais clínicas foram testadas, incluindo consistências sólida, semissólida e líquida. Os valores podem ser encontrados na tabela 22.

**Reprodutibilidade da extração – CALEX® Cap: 7,9–16,9%**

A reprodutibilidade da extração foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo com 3 lotes de CALEX® Cap x 4 extrações x 4 replicatas. Cinco amostras fecais clínicas foram testadas, incluindo consistências sólida, semissólida e líquida. Os valores podem ser encontrados na tabela 23.

**Comparação de métodos CALEX® Cap vs. extração manual**

**Desvio a 80 µg/mL: 5,9% (intervalo de confiança de 95%: 1,4–12,2%)**

**Desvio a 160 µg/g: 12,0% (intervalo de confiança de 95%: 7,8–17,0%)**

**Desvio médio: 10,1% (intervalo de confiança de 95%: 5,7–14,5%)**

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Duzentas e quarenta e uma (241) amostras clínicas foram extraídas com o auxílio de um único lote do dispositivo CALEX® Cap. Os valores de referência foram determinados nos extratos obtidos usando-se o método de extração manual. No total, foram avaliadas 172 amostras dentro da faixa de medição do BÜHLMANN fCAL® ELISA e de um intervalo de concentrações de calprotectina de referência de 30,5 – 1496,6 µg/g. Extrações e determinações de teste individuais foram executadas para ambos os métodos. O desvio foi determinando usando-se análise de regressão linear de Passing-Bablok e análise de Bland-Altman (tabelas 24 e 25).

## SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do BÜHLMANN fCAL® ELISA a produtos farmacêuticos orais, suplementos nutricionais, hemoglobina e micro-organismos enteropatológicos, foi avaliada de acordo com a diretriz EP07-A2 do CLSI, usando-se a faixa de trabalho estendida. Desvios superiores a 10% nos resultados foram considerados como interferências. Nenhuma interferência foi detectada com as substâncias listadas na tabela 26 até as concentrações indicadas. Nenhuma interferência foi detectada com os micro-organismos enteropatológicos listados na tabela 27 até os valores listados de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de extrato fecal.

## APPENDIX I

## TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABELAS E FIGURAS

### Clinical studies

### Clinical study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

| Final diagnosis | Distribution of patients' results in numbers (percent) within BÜHLMANN fCAL® ELISA diagnostic ranges. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | < 80 µg/g | 80 - 160 µg/g | > 160 µg/g | Total |
| IBD | 9 (6.7%) | 12 (8.9%) | 114 (84.4%) | 135 (100%) |
| IBS | 94 (72.3%) | 17 (13.1%) | 19 (14.6%) | 130 (100%) |
| Other GI | 48 (66.7%) | 10 (13.9%) | 14 (19.4%) | 72 (100%) |

Table 5

| IBD vs. non-IBD | Clinical decision point | |
|---|---|---|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Sensitivity (95% CI) | 93.3% (87.7%, 96.9%) | 84.4% (77.2%, 90.1%) |
| Specificity (95% CI) | 70.3% (63.5%, 76.5%) | 83.7% (77.8%, 88.5%) |
| PPV (95% CI) | 67.7% (60.5%, 74.4%) | 77.6% (69.9%, 84.0%) |
| NPV (95% CI) | 94.0% (89.0%, 97.2%) | 88.9% (83.6%, 93.0%) |
| ROC AUC (95% CI) | 0.923 (0.893, 0.953) | |

Table 6

| IBD vs. non-IBD | Clinical decision point | |
|---|---|---|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Sensitivity (95% CI) | 96.3% (91.6%, 98.8%) | 80.7% (73.1%, 87.0%) |
| Specificity (95% CI) | 59.9% (52.8%, 66.7%) | 87.1% (81.7%, 91.4%) |
| PPV (95% CI) | 61.6% (54.7%, 68.2%) | 80.7% (73.1%, 87.0%) |
| NPV (95% CI) | 96.0% (91.0%, 98.7%) | 87.1% (81.7%, 91.4%) |

Table 7

| IBD vs. IBS | Clinical decision point | |
|---|---|---|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Sensitivity (95% CI) | 93.3% (87.7%, 96.9%) | 84.4% (77.2%, 90.1%) |
| Specificity (95% CI) | 72.3% (63.8%, 79.8%) | 85.4% (78.1%, 91.0%) |
| PPV (95% CI) | 77.8% (70.6%, 83.9%) | 85.7% (78.6%, 91.2%) |
| NPV (95% CI) | 91.3% (84.1%, 95.9%) | 84.1% (76.7%, 89.9%) |
| ROC AUC (95% CI) | 0.933 (0.902, 0.963) | |

Table 8

| IBD vs. IBS | Clinical decision point | |
|---|---|---|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Sensitivity (95% CI) | 96.3% (91.6%, 98.8%) | 80.7% (73.1%, 87.0%) |
| Specificity (95% CI) | 59.2% (50.3% ,67.8%) | 90.0% (83.5%, 94.6%) |
| PPV (95% CI) | 71.0% (63.9%, 77.5%) | 89.3% (82.5%, 94.2%) |
| NPV (95% CI) | 93.9% (86.3%, 98.0%) | 81.8% (74.5%, 87.8%) |

Table 9

non-IBD – IBS + other GI
CI – confidence interval
PPV – positive predictive value
NPV – negative predictive value
ROC AUC – area under receiver operating characteristic curve

### Clinical studies – IBD monitoring

| Calprotectin[1] vs IBD activity determined by endoscopic findings | Study 1 Spain (ref. 9) | Study 2 Spain (ref. 10) | Study 3 Australia, New Zealand (ref.11) |
|---|---|---|---|
| Patient number and demographics | 89 (CD[2])<br>Ages: 32-58<br>44% male | 123 (UC[3])<br>Ages: 18-85<br>66.4% male | 99 (CD[2] after resection)<br>Ages: 29-47<br>46.5% male |
| Cut-off | 272 µg/g | 280 µg/g | 100 µg/g |
| NPV | 98% | 86% | 91% |
| PPV | 76% | 80.3% | 53% |

Table 10

[1] Study 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range
Study 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
[2] CD = Crohn`s disease patients
[3] UC = Ulcerative Colitis patients

### Clinical studies – IBD monitoring

| Calprotectin[1] vs future clinical remission or relapse | Study 4 UK (ref. 12) | Study 5 Spain (ref. 13) | Study 6 Spain (ref. 14) |
|---|---|---|---|
| Patient number and demographics | 92 (CD[2])<br>38% male | 30 (CD[3])<br>adalimumab therapy<br>Ages: 24-64<br>43.3% male | 33 (CD[2])<br>20 (UC[3])<br>infliximab therapy<br>Ages: 18-68<br>47.2% male |
| Follow-up time after calprotectin measurement | 12 months | 4 months | 12 months |
| Patients in clinical relapse after follow-up | 11% | 30% | 23% |
| Cut-off | 240 µg/g | 204 µg/g | 160 µg/g |
| NPV | 96.8% | 100% | 96.1% |
| PPV | 27.6% | 75% | 68.7% |

Table 11

[1] Study 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA
Study 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range
[2] CD = Crohn`s disease patients
[3] UC = Ulcerative Colitis patients

## APPENDIX I

## TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABELAS E FIGURAS

### LOWER RANGE PROCEDURE 10-600 µg/g

#### Example of results

| | Conc. [µg/g] | Absorb. [OD] | Calc. Conc. [µg/g] | CV Conc [%] |
|---|---|---|---|---|
| **Blank Avg.** | | **0.096** | | |
| Cal A | 10 | 0.073 | | |
| Cal A | 10 | 0.066 | | |
| **Cal A Avg.** | **10** | **0.069** | | **7.2** |
| Cal B | 30 | 0.143 | | |
| Cal B | 30 | 0.153 | | |
| **Cal B Avg.** | **30** | **0.148** | | **4.8** |
| Cal C | 100 | 0.465 | | |
| Cal C | 100 | 0.456 | | |
| **Cal C Avg.** | **100** | **0.460** | | **1.4** |
| Cal D | 300 | 1.121 | | |
| Cal D | 300 | 1.135 | | |
| **Cal D Avg.** | **300** | **1.128** | | **0.9** |
| Cal E | 600 | 1.658 | | |
| Cal E | 600 | 1.671 | | |
| **Cal E Avg.** | **600** | **1.664** | | **0.6** |
| Ctrl Low | | 0.201 | 41 | |
| Ctrl Low | | 0.189 | 39 | |
| **Ctrl Low Avg.** | | **0.195** | **40** | **4.4** |
| Ctrl High | | 0.598 | 134 | |
| Ctrl High | | 0.583 | 130 | |
| **Ctrl High Avg.** | | **0.590** | **132** | **1.8** |

Table 12

#### Example of a standard curve

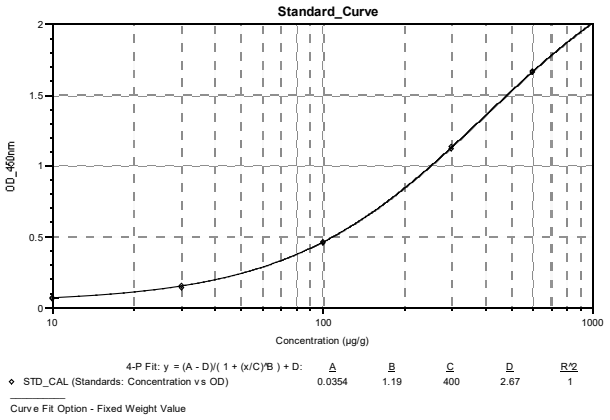



Figure 1

#### Within-laboratory precision

| Sample No. | n | Mean [µg/g] | Repeatability | | Between-day | | Total Precision | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| #1957 | 44 | 13.2 | 1.0 | 8.0% | 1.5 | 11.6% | 1.8 | 14.0% |
| #1933 | 42 | 20.5 | 0.9 | 4.2% | 1.6 | 7.7% | 1.8 | 8.8% |
| #1934 | 44 | 19.7 | 1.2 | 6.0% | 1.6 | 8.4% | 2.0 | 10.3% |
| #1935 | 44 | 37.1 | 1.2 | 3.2% | 2.1 | 5.8% | 2.4 | 6.7% |
| #1936 | 44 | 35.4 | 0.9 | 2.7% | 2.5 | 7.4% | 2.7 | 7.8% |
| #1937 | 44 | 58.6 | 1.6 | 2.9% | 3.6 | 6.4% | 3.9 | 7.0% |
| #1938 | 44 | 83.9 | 2.6 | 3.1% | 4.3 | 5.2% | 5.0 | 6.0% |
| #1939 | 44 | 141.4 | 2.6 | 1.9% | 7.1 | 5.2% | 7.5 | 5.5% |
| #1956 | 44 | 294.1 | 14.0 | 4.8% | 18.0 | 6.2% | 22.8 | 7.8% |
| #1940 | 44 | 501.4 | 27.7 | 5.7% | 20.9 | 4.3% | 34.7 | 7.1% |

Table 13

#### Precision profile

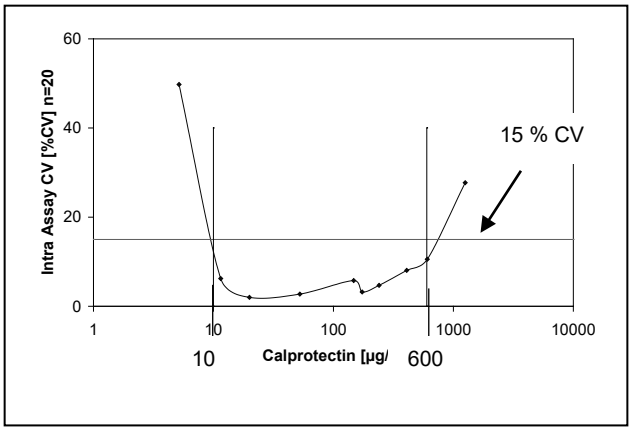



Figure 2

#### Linearity

| ID | Measuring range tested | $R^2$ | p-value for non-linear coefficient | Linear range |
|---|---|---|---|---|
| S1 | 2.3 - 740.0 | 0.972 | p >0.05 | 3.1 - 602.8 |
| S2 | 5.1 - 999.5 | 0.988 | p <0.05 | 5.1 – 654.0 |
| S3 | 1.3 – 690.2 | 0.994 | p <0.05 | 3.9 – 690.2 |
| S4 | 9.6 – 827 | 0.940 | p <0.05 | 9.6 – 658.7 |

Table 14

#### Spiking recovery

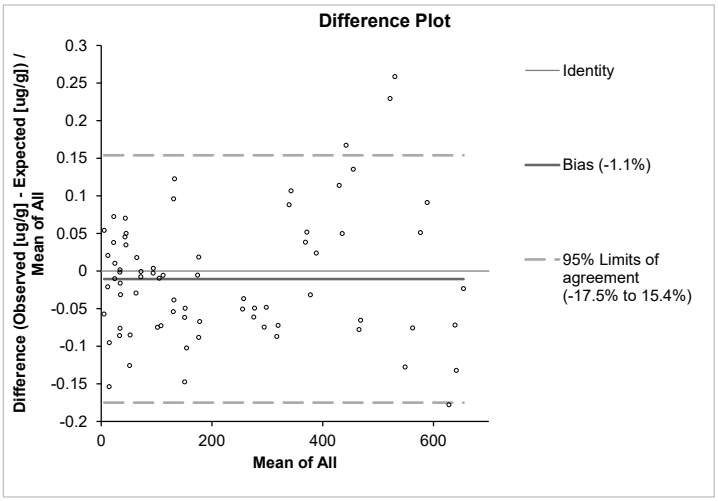



Figure 3

## APPENDIX I

## TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABELAS E FIGURAS

### EXTENDED RANGE PROCEDURE 30-1800 µg/g

### Example of results

| | Concentration [µg/g] | Absorbtion [OD] |
|---|---|---|
| Calibrator A | 30<br>30 | 0.047<br>0.046 |
| Calibrator B | 90<br>90 | 0.138<br>0.140 |
| Calibrator C | 300<br>300 | 0.464<br>0.452 |
| Calibrator D | 900<br>900 | 1.207<br>1.192 |
| Calibrator E | 1800<br>1800 | 1.627<br>1.630 |
| Blank avg. | | 0.057 |
| | | |
| Control low | | 0.147<br>0.162 |
| Control high | | 0.618<br>0.618 |

Table 15

### Example of a standard curve

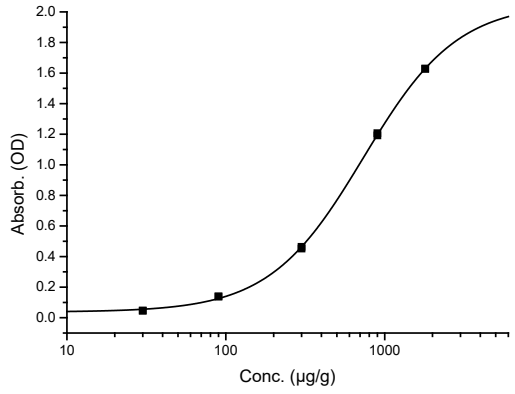



Figure 4

### Within-laboratory precision

| ID | Mean [µg/g] | n | Repeatability SD | Repeatability %CV | Between-run SD | Between-run %CV | Between-day SD | Between-day %CV | Within-laboratory SD | Within-laboratory %CV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 38.5 | 80 | 2.3 | 5.8% | 1.8 | 4.8% | 2.2 | 5.6% | 3.6 | 9.4% |
| P2 | 67.0 | 80 | 2.0 | 3.0% | 3.5 | 5.2% | 1.6 | 2.4% | 4.3 | 6.4% |
| P3 | 135.7 | 80 | 2.3 | 1.7% | 5.6 | 4.1% | 0.0 | 0.0% | 6.0 | 4.4% |
| P4 | 207.1 | 80 | 4.1 | 2.0% | 12.5 | 6.0% | 0.0 | 0.0% | 13.2 | 6.4% |
| P5 | 337.1 | 80 | 5.9 | 1.8% | 18.3 | 5.4% | 0.0 | 0.0% | 19.3 | 5.7% |
| P6 | 562.6 | 80 | 11.0 | 2.0% | 13.6 | 2.4% | 2.5 | 0.4% | 17.7 | 3.1% |
| P7 | 918.0 | 80 | 18.6 | 2.0% | 62.1 | 6.8% | 20.8 | 2.3% | 68.1 | 7.4% |

Table 16

### Between-lot precision

| ID | Mean [µg/g] | n | Within-run SD | Within-run %CV | Between-day SD | Between-day %CV | Between-lot SD | Between-lot %CV | Total SD | Total %CV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 46.4 | 74 | 2.5 | 5.5% | 0.5 | 1.1% | 2.4 | 5.3% | 4.5 | 9.7% |
| 3 | 105.5 | 75 | 2.5 | 2.4% | 1.4 | 1.4% | 2.1 | 2.0% | 4.5 | 4.2% |
| 4 | 133.6 | 75 | 5.0 | 3.8% | 1.9 | 1.4% | 4.2 | 3.2% | 7.2 | 5.4% |
| 5 | 178.5 | 75 | 6.3 | 3.5% | 0.0 | 0.0% | 6.3 | 3.5% | 9.2 | 5.2% |
| 6 | 435.2 | 75 | 12.4 | 2.9% | 7.5 | 1.7% | 18.1 | 4.2% | 23.2 | 5.3% |
| 7 | 1476.1 | 75 | 48.4 | 3.3% | 88.6 | 6.0% | 31.4 | 2.1% | 110.6 | 7.5% |

Table 17

### Reproducibility - Multisite Precision Evaluation Study

| ID | Mean [µg/g] | n | Within-run SD | Within-run %CV | Between-run SD | Between-run %CV | Between-day SD | Between-day %CV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S01 | 42.1 | 236 | 3.1 | 7.3% | 5.9 | 13.9% | 1.0 | 2.3% |
| S02 | 67.4 | 238 | 3.0 | 4.4% | 6.8 | 10.1% | 0.0 | 0.0% |
| S03 | 142.3 | 238 | 5.6 | 3.9% | 15.2 | 10.7% | 0.0 | 0.0% |
| S04 | 379.8 | 240 | 10.8 | 2.9% | 16.4 | 4.3% | 3.2 | 0.9% |
| S05 | 1053.3 | 238 | 37.7 | 3.6% | 48.3 | 4.6% | 0.0 | 0.0% |

Table 18

### Reproducibility - Multisite Precision Evaluation Study

| ID | Mean [µg/g] | n | Between-operator SD | Between-operator %CV | Between-site SD | Between-site %CV | Total (Reproducibility) SD | Total (Reproducibility) %CV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S01 | 42.1 | 236 | 0.0 | 0.0% | 4.4 | 10.4% | 8.0 | 19.0% |
| S02 | 67.4 | 238 | 1.7 | 2.6% | 3.9 | 5.7% | 8.6 | 12.7% |
| S03 | 142.3 | 238 | 2.4 | 1.7% | 4.0 | 2.8% | 16.8 | 11.8% |
| S04 | 379.8 | 240 | 0.0 | 0.0% | 13.7 | 3.6% | 24.2 | 6.4% |
| S05 | 1053.3 | 238 | 39.5 | 3.8% | 64.4 | 6.1% | 97.3 | 9.2% |

Table 19

### Linearity

| ID | Measuring range tested [µg/g] | $R^2$ | p-value for non-linear coefficient | Linear range [µg/g] |
|---|---|---|---|---|
| FRB | 22.8 – 1932.0 | 0.998 | $p < 0.05$ | 24.6 – 1932.0 |
| FRC | 26.2 – 2096.2 | 0.997 | $p < 0.05$ | 26.2 – 2096.2 |

Table 20

### Accuracy / Recovery

| ID | Mean baseline [µg/g] | Expected baseline + spike [µg/g] | Observed baseline + spike [µg/g] | Recovery rate [%] |
|---|---|---|---|---|
| #1 | 46.5 | 226.5 | 224.5 | 99.1% |
| #2 | 63.7 | 243.7 | 247.7 | 101.6% |
| #3 | 89.0 | 269.0 | 274.9 | 102.2% |
| #4 | 111.6 | 291.6 | 292.0 | 100.1% |
| #5 | 163.5 | 343.5 | 331.1 | 96.4% |
| #6 | 304.0 | 484.0 | 475.0 | 98.1% |
| #7 | 990.2 | 1170.2 | 1166.6 | 99.7% |

Table 21

## APPENDIX I

## TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABELAS E FIGURAS

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS - PREANALYTICS

#### Extraction reproducibility- manual weighing extraction

| ID | Mean [µg/g] | n | Within-extraction | | Between-extraction | | Total precision | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| S01 | 51.2 | 20 | 4.5 | 8.9% | 7.8 | 15.2% | 9.0 | 17.6% |
| S03 | 88.3 | 20 | 6.6 | 7.5% | 13.3 | 15.0% | 14.8 | 16.8% |
| S05 | 66.8 | 20 | 10.6 | 15.8% | 3.7 | 5.5% | 11.2 | 16.7% |
| S06 | 179.3 | 20 | 16.8 | 9.4% | 32.8 | 18.3% | 36.8 | 20.5% |
| S07 | 366.1 | 20 | 22.4 | 6.1% | 32.3 | 8.8% | 39.3 | 10.7% |
| S08 | 327.4 | 20 | 15.4 | 4.7% | 26.9 | 8.2% | 31.0 | 9.5% |
| S09 | 1783.7 | 20 | 198.3 | 11.1% | 262.0 | 14.7% | 328.6 | 18.4% |

Table 22

#### Extraction reproducibility – CALEX® Cap

| ID | Mean [µg/g] | Within-extraction | | Between-extraction | | Between -Lot | | Total precision | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| A | 42.5 | 1.6 | 3.9% | 5.2 | 12.1% | 0.0 | 0.0% | 5.4 | 12.7% |
| B | 126.5 | 3.2 | 2.5% | 9.6 | 7.6% | 9.3 | 7.4% | 13.8 | 10.9% |
| C | 207.4 | 5.1 | 2.4% | 34.8 | 16.8% | 0.0 | 0.0% | 35.1 | 16.9% |
| D | 515.5 | 13.9 | 2.7% | 38.2 | 7.4% | 0.0 | 0.0% | 40.7 | 7.9% |
| E | 2949.9 | 93.0 | 3.2% | 214.6 | 7.3% | 47.0 | 1.6% | 238.6 | 8.1% |

Table 23

#### Method comparison – CALEX® Cap extraction and manual extraction

| Bland-Altman Analysis | | |
|---|---|---|
| **Mean Bias (95%)** | **Lower LoA (95% CI)** | **Upper LoA (95% CI)** |
| 10.1% (5.7%, 14.5%) | -47.4% (-54.9%, -39.8%) | 67.5% (60.1%, 75,1%) |

Table 24

| Passing-Bablok Regression Analysis | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Slope (95% CI)** | **Intercept (µg/g) (95% CI)** | **Bias at 80 µg/g (95% CI)** | **Bias at 160 µg/g (95% CI)** | **r** |
| 1.181 (1.120, 1.235) | -9.7 (-16.0, -2.4) | 5.9% (1.4%, 12.2%) | 12.0% (7.8%,16.9%) | 0.948 |

Table 25

### INTERFERING SUBSTANCES

#### Oral pharmaceuticals, nutritional supplements and hemoglobin

| Trade Name | Active Component | Concentration mg/50 mg stool |
|---|---|---|
| gyno-Tardyferon | Iron (II) sulfate (contains 0.35 mg folic acid) | 0.11 |
| Prednisone | Prednisone | 0.31 |
| Imurek | Azathioprine | 0.19 |
| Salofalk | Mesalamine; 5-ASA | 5.21 |
| Agopton | Lansoprazole | 0.18 |
| Asacol | Mesalamine; 5-ASA | 2.50 |
| Vancocin | Vancomycin | 2.00 |
| Sulfamethoxazole | Sulfamethoxazole | 1.60 |
| Trimethoprim | Trimethoprim lactate | 0.35 |
| Ciproxine | Ciprofloxacin | 1.25 |
| Vitamin E | DL-α-Tocopherol Acetate | 0.30 |
| Bion 3 | 3 probiotics (107 CFU): *lactobacillus gasseri* PA16 / 8, *bifidobacterium bifidum* MF 20/5, *bifidobacterium longum* SP07 / 3, 12 vitamins: A (800 µg), B1 (1.4 mg), B2 (1.6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 µg), C (60 mg), D (5 µg), E (10 mg), Biotin (150 µg), folic acid (200 µg), niacin (18 mg), pantothenic acid (6 mg) and 7 minerals: iodine (100 µg), iron (5 mg), zinc (5 mg), selenium (30 µg), chromium (25 µg), manganese (1.2 mg), molybdenum (25 µg) | 1.06 |
| Hemoglobin | Hemoglobin | 1.25 |

Table 26

#### Enteropathological microorganisms

| Name | Final Concentration (CFU/mL stool extract) |
|---|---|
| *Escherichia coli* | $9.5 \times 10^7$ |
| *Salmonella enterica subsp. enterica* | $1 \times 10^9$ |
| *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia* | $5.4 \times 10^7$ |
| *Citrobacter freundii* | $9.7 \times 10^7$ |
| *Shigella flexneri* | $1.5 \times 10^8$ |
| *Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica* | $1.6 \times 10^8$ |

Table 27

## APPENDIX II

## REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

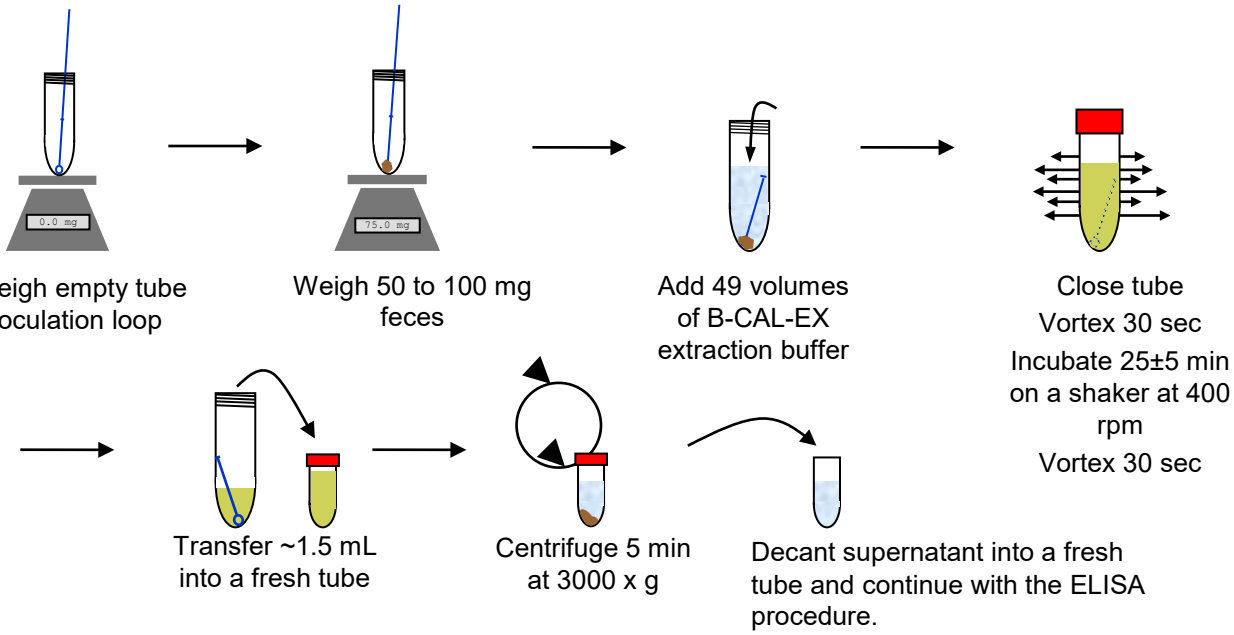

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease.* Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E*. Measurement of calprotectin in faeces*.: Tidsskr Nor Legeforen 128, 743–5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study.* BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care.* Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity.* Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease.* J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery.* Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreiro-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab.* Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreiro-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy.* J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission.* Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasson A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study.* United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease.* Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target.* Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy.* Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months.* PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years.* PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

## APPENDIX III

## SHORT PROTOCOL

### CALPROTECTIN EXTRACTION

**Manual extraction procedure**




## APPENDIX IV

## SHORT PROTOCOL

### CALPROTECTIN ELISA

**Precoated microtiter plate**

↓ ↺ *wash 2x with ≥300 µL wash buffer*

**100 µL incubation buffer, calibrators, controls or diluted samples**

↓ ↺ *incubate 30 (+ 5) minutes at 18-28 °C on a plate shaker ~450 rpm*

↺ *wash 3x with ≥300 µL wash buffer*

**add 100 µL enzyme label**

↓ ↺ *incubate 30 +/-5 minutes at 18-28 °C on a plate shaker ~450 rpm*

↺ ***wash 5x*** *with ≥300 µL wash buffer*

**add 100 µL TMB substrate solution**

↓ ↺ *incubate 15 +/-2 minutes at 18-28 °C on a plate shaker ~450 rpm*

**add 100 µL stop solution**

→ **Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)**

TIME TO RESULT: 75 MINUTES

## APPENDIX V

### INCIDENT REPORTING IN EU MEMBER STATES

If any serious incident in relation to this device has occurred, please report without delay to the manufacturer and competent authority of your Member State.

### MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

Falls sich ein ernsthafter Zwischenfall in Zusammenhang mit diesem Gerät ereignet hat, bitte melden Sie dies umgehend dem Hersteller und der zuständigen Behörde Ihres Mitgliedsstaates.

### RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE

En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

### SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

### NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE

Si se ha producido algún incidente grave en relación con este dispositivo, informe inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente de su Estado miembro.

### NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

## APPENDIX VI

## NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS

## APPENDIX VI

## NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS

## APPENDIX VII

## SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

| Symbol | Explanation |
|---|---|
| | Use by<br>Verwendbar bis<br>Utiliser jusqu'au<br>Utilizzare entro<br>Fecha de caducidad<br>Data de expiração |
| REF | Order code<br>Bestellnummer<br>Référence du catalogue<br>Numero di catalogo<br>Número de catálogo<br>Código de encomenda |
| LOT | Batch code<br>Lotbezeichnung<br>Code du lot<br>Codice del lotto<br>Código de lote<br>Código lote |
| IVD | *In vitro* diagnostic medical device<br>*In Vitro* Diagnostikum<br>Dispositif médical de diagnostic *in vitro*<br>Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*<br>Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*<br>Producto sánitario para diagnóstico *in vitro* |
| | Contains sufficient for <n> tests<br>Ausreichend für "n" Ansätze<br>Contenu suffisant pour „n" tests<br>Contenuto sufficiente per „n" saggi<br>Contenudo sufficiente para <n> ensayos<br>Contenudo sufficiente para <n> tests |
| | Consult instructions for use<br>Gebrauchsanweisung beachten<br>Consulter le mode d'emploi<br>Consultare le istruzioni per l'uso<br>Consulte las instrucciones de uso<br>Leia cuidadosamente as instruções |
| | Temperature limitation<br>Zulässiger Temperaturbereich<br>Limites de température<br>Limiti di temperatura<br>Limite de temperatura<br>Límite de temperatura |
| MP | Microtiter plate<br>Mikrotiterplatte<br>Microplaque<br>Micropiastra<br>Microplaca<br>Placa de microtitulação |

| Symbol | Explanation |
|---|---|
| BUF WASH 10X | Wash buffer concentrate (10x)<br>Waschpuffer-Konzentrat (10x)<br>Tampon de lavage concentré (10x)<br>Tampone di lavaggio concentrato (10x)<br>Tampón de lavado concentrado (10x)<br>Tampão de lavagem concentrado (10x) |
| BUF INC | Incubation buffer<br>Inkubationspuffer<br>Tampon d'incubation<br>Tampone di incubazione<br>Tampón de incubación<br>Tampão de incubação |
| CAL A - CAL E | Calibrator A -E<br>Kalibrator A -E<br>Calibrateur A -E<br>Calibratore A - E<br>Calibrador A – E<br>Calibrador A – E |
| CONTROL L | Control low<br>Kontrolle tief<br>Contrôle bas<br>Controllo basso<br>Control bajo<br>Controle baixo |
| CONTROL H | Control high<br>Kontrolle hoch<br>Contrôle élevé<br>Controllo alto<br>Control alto<br>Controle alto |
| EL | Enzyme label<br>Enzymmarker<br>Marqueur enzymatique<br>Marcatore enzimatico<br>Marcador enzimático<br>Marcador enzimático |
| SUBS TMB | TMB substrate<br>TMB-Substrat<br>Substrat TMB<br>Substrato di TMB<br>Substrato de TMB<br>Substrato de TMB |
| SOLN STOP | Stop solution<br>Stopp-Lösung<br>Solution stop<br>Soluzione di stop<br>Solución de parada<br>Solução de parada |

CE

IVD