

BÜHLMANN fCAL[®] turbo

Calprotectin turbidimetrischer Test
für den Laborgebrauch

Reagenzien Kit

B-KCAL-RSET
Version A4

Für den Gebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik



Hersteller

BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch
Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN fCAL[®] turbo ist ein automatisierter *in-vitro*-Diagnostetest für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben, der als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Darmschleimhautentzündungen dient (Ref. 1-3). Die Testergebnisse dienen bei der Diagnose als Hilfsmittel zur Unterscheidung zwischen organischen, entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen, CED, speziell Morbus Crohn (CD) oder Colitis ulcerosa (UC)) und funktionellen Erkrankungen (Reizdarmsyndrom, RDS) (Ref. 4-10) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen und als Hilfsmittel bei der Überwachung der CED (Ref. 10-22).

Nur für den Laborgebrauch.

TESTPRINZIP

Der BÜHLMANN fCAL[®] turbo Test ist ein partikelverstärkter turbimetrischer Immuntest (PETIA) und ermöglicht die automatisierte Quantifizierung von Calprotectin in extrahierten Stuhlproben auf Analysegeräten für die klinische Chemie. Stuhlproben werden mit dem Extraktionspuffer (B-CAL-EX) mithilfe des CALEX[®] Cap Extraktionsröhrchen (B-CALEX-Cx) oder mittels einer manuellen Methode extrahiert und in einer Endverdünnung von 1:500 verwendet. Die Extrakte werden mit Reaktionspuffer inkubiert und mit Polystyrol-Nanopartikeln, die mit Calprotectin-spezifischen Antikörpern (Immunpartikel) beschichtet sind, vermischt. Das in den Proben verfügbare Calprotectin vermittelt die Verklumpung der Immunpartikel. Die Trübheit der Probe, die mittels Lichtabsorption gemessen wird, erhöht sich mit der Bildung des Calprotectin-Immunpartikel-Komplexes und ist proportional zur Calprotectinkonzentration. Mit der gemessenen Lichtabsorption kann die Calprotectinkonzentration über Interpolation mit einer erstellten Kalibrierkurve quantifiziert werden.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	Menge	Code	Vorbereitung
Reaktionspuffer (R1) MOPS-gepufferte Kochsalzlösung	1 Fläschchen 35 mL	B-KCAL-R1	Gebrauchsfertig
Immunpartikel (R2) Polystyrolkügelchen, beschichtet mit aviären Antikörpern gegen humanes Calprotectin	1 Fläschchen 7 mL	B-KCAL-R2	Gebrauchsfertig

Tabelle 1: Mitgelieferte Reagenzien

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Nicht geöffnete Reagenzien
Bei 2-8 °C aufbewahren. Das Kit nicht über das Verfallsdatum (siehe Etikett) hinaus verwenden.
Stabilität auf dem Analysegerät für die klinische Chemie
Bis zu 3 Monate bei 5-12 °C aufbewahren

Tabelle 2: Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Reagenzien nicht einfrieren!

ERFORDERLICHE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Reagenzien	Menge	Code
BÜHLMANN fCAL® turbo Kalibrator-Kit Kalibratoren 1-6 zum Erstellen einer 6-Punkt-Kalibrierkurve	1 x 6 Fläschchen 1 mL/Fläschchen	B-KCAL-CASET
BÜHLMANN fCAL® turbo Kontroll-Kit Kontrollen, Niedrig und Hoch	3 x 2 Fläschchen 1 mL/Fläschchen	B-KCAL-CONSET
CALEX® Cap Extraktionsröhrchen, gefüllt mit Extraktionspuffer	50 Röhrchen 200 Röhrchen 500 Röhrchen	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Extraktions-Kit Extraktionspuffer	3 Flaschen 12 Flaschen 125 mL/Flasche	B-CAL-EX3 B-CAL-EX12

Tabelle 3: Erforderliche Materialien, nicht im Lieferumfang enthalten

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Dieser Test ist nur für den *In-vitro*-diagnostischen Gebrauch.
- Die Immunpartikel enthalten potenziell infektiöse Substanzen tierischer Herkunft und sollten gemäss Guter Laborpraxis (GLP) unter Verwendung geeigneter Vorsichtsmassnahmen gehandhabt werden.
- R2 enthält Polystyrol-Nanopartikel.
- Dieses Kit enthält Komponenten, die gemäss Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 klassifiziert sind: 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on-hydrochlorid (Konz. $\geq 0,0015\%$). Folglich könnten die Reagenzien allergische Hautreaktionen verursachen (H317).
- 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.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Bitte die Reagenzien, Kontrollen, Kalibratoren und Proben gemäss der Beschreibung im Applikationsprotokolläquilibrieren.
- Die Verdunstung der Kalibratoren und Kontrollen auf dem Analysegerät kann zu falschen Ergebnissen führen. Der Test muss unmittelbar nach dem Beladen des Analysegeräts durchgeführt werden.

- Reagenzien R1 und R2 verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt werden. Die Deckel der Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Einmal eingefrorenes Reagenz R2 kann nicht mehr verwendet werden.
- Der Test ist für Stuhlprobenextrakte konzipiert, die mithilfe des speziellen BÜHLMANN Extraktionspuffers vorbereitet wurden.
- Vor der Durchführung des Tests muss sichergestellt werden, dass die Proben keine Blasen enthalten.
- Das Ausmass der Probenverschleppung hängt vom klinisch-chemischen Analysegerät ab. Für weitere Informationen siehe spezifisches Applikationsprotokoll für das Analysegerät.

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 STABILITÄT DER EXTRAKTE

CALEX[®] Cap

Die Gebrauchsanweisung beachten, die dem CALEX[®] Cap Kit beigelegt ist. Stuhlprobenextrakte, die mithilfe des CALEX[®] Cap vorbereitet werden, sind 1:500 endverdünnt und gebrauchsfertig.

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

Wichtiger Hinweis: Vor der Durchführung des BÜHLMANN fCAL® turbo Verfahrens wird das CALEX® Cap 10 Minuten bei 1000 – 3000 g zentrifugiert.

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem BÜHLMANN CALEX® Cap gewonnen wurden, ist bei Raumtemperatur (23 °C) 7 Tage, bei 2-8°C 15 Tage und bei -20°C mindestens 23 Monate 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, für 10 Sekunden gründlich vortexen und gemäss der Gebrauchsanweisung des Tests zentrifugieren.

Extraktions-Kit

Für die manuelle Extraktion die Gebrauchsanweisung befolgen, die dem Extraktions-Kit beigelegt ist. Stuhlprobenextrakte, die mit dem Extraktions-Kit vorbereitet werden, sind 1:50 endverdünnt. Vor der Durchführung des BÜHLMANN fCAL® turbo Verfahrens die Stuhlextrakte 1:10 im mit dem Extraktions-Kit gelieferten BÜHLMANN Extraktionspuffer verdünnen (z. B. 50 µL Extrakt und 450 µL Extraktionspuffer).

Fäkales Calprotectin in Extrakten (1:50), die durch manuelle Extraktion gewonnen wurden, ist bei 2-8 °C 7 Tage und bei -20 °C 36 Monate stabil.

TESTDURCHFÜHRUNG

Applikationsprotokolle / Installation des Tests

Testdurchführungen für den BÜHLMANN fCAL® turbo werden auf mehreren klinisch-chemischen Analysegeräten etabliert. Validierte Applikationsprotokolle, die die Installation und Analyse auf den jeweiligen Geräten beschreiben, sind bei BÜHLMANN auf Anfrage erhältlich. Entsprechende Gerätehandbücher müssen zum Einrichten des Geräts, der Wartung, der Bedienung und für Vorsichtsmassnahmen herangezogen werden.

Vorbereiten der Reagenzien

Die bereitgestellten Reagenzien sind gebrauchsfertig. Vor dem Beladen des Geräts die Reagenzien vorsichtig mischen. Die Reagenzienflaschen passen in das Gerät, wenn im Applikationsprotokoll nichts anderes angegeben ist.

Erstellung der Kalibrierkurve

Der BÜHLMANN fCAL® turbo Kalibrator-Kit wird zum Erstellen einer 6-Punkt-Kalibrierkurve gemäss dem Gerätehandbuch verwendet. Kalibratorwerte sind chargenspezifisch. Für jede neue Kalibrator- und Reagenzcharge muss erneut eine Kalibrierung durchgeführt werden. Ansonsten sollte die Kalibrierung alle 1 bis 2 Monate gemäss des gerätespezifischen

Applikationsprotokolls vorgenommen werden. Die Kalibratorwerte können Sie dem QC-Datenblatt entnehmen. Falls die Kalibrierung nicht fehlerfrei durchgeführt werden kann, wenden Sie sich bitte an den Support von BÜHLMANN.

QC-Kontrollen

Das BÜHLMANN fCAL® turbo Kontrollen-Kit muss zur Validierung der Kalibrierkurve täglich vor der Messung der extrahierten Stuhlproben der Patienten geprüft werden. Die Kontrollen haben festgelegte Wertebereiche, die auf dem mit jeder Charge des BÜHLMANN fCAL® turbo Kontrollen-Kits mitgelieferten QC-Datenblatt angegeben sind. Die Kontrollmessungen müssen innerhalb des angegebenen Wertebereichs liegen, um gültige Ergebnisse für die Stuhlprobenextrakte der Patienten zu erhalten.

Wenn die Kontrollwerte nicht valide sind, ist die Messung mit frischen Kontrollen zu wiederholen. Wenn die Kontrollwerte weiterhin nicht valide sind, bitte den Test erneut kalibrieren. Nehmen Sie Kontakt mit dem Support von BÜHLMANN auf, falls gültige Kontrollwerte nicht reproduzierbar sind.

Messung der Stuhlprobenextrakten von Patienten

Nachdem die Kalibrierkurve erstellt und mit den Kontrollen validiert ist, können die Stuhlprobenextrakte der Patienten gemessen werden. Die Messung der Stuhlprobenextrakte ist gemäss dem Applikationsprotokoll und dem Gerätehandbuch durchzuführen.

Ergebnisse

Das Analysegerät berechnet die Ergebnisse automatisch und gibt sie in µg/g an, sofern im entsprechenden Applikationsprotokoll des klinisch-chemischen Analysegeräts nicht anders angegeben.

STANDARDISIERUNG UND MESSTECHNISCHE RÜCKVERFOLGBARKEIT

Es existieren keine international oder national anerkannten Referenzmaterialien oder Referenzmessverfahren für den Calprotectin-Analyt in Stuhlproben. Der BÜHLMANN fCAL® turbo ist gegen ein intern ermitteltes Referenzmaterial standardisiert und die Werte der Kontrollen und Kalibratoren werden gemäss einem Werteübertragungsprotokoll zugewiesen (Ref. 23, 24), um eine messtechnische Rückverfolgbarkeit zu gewährleisten. Der ermittelte 95%-Konfidenzintervall der kombinierten Abweichung der Produktkalibratoren war unterhalb von 3,7% und die kombinierte Abweichung der Kontrollen unterhalb von 6,9%.

EINSCHRÄNKUNGEN

- 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. 25-26).
- Die Einnahme von nichtsteroidalen Entzündungshemmern (non-steroidal anti-inflammatory drugs = NSAID) kann zu erhöhten Calprotectinspiegeln im Stuhl führen.
- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinspiegel im Stuhl aufweisen (Ref. 27-30).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

I. Unterscheiden einer organischen Erkrankung von einer funktionellen gastrointestinalen Erkrankung

Die Bestimmung des Calprotectinspiegels in Stuhlproben kann als zuverlässige und einfache Hilfe bei der Unterscheidung zwischen organischen und funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen verwendet werden (Ref. 4-10). BÜHLMANN empfiehlt die Verwendung der gleichen Toleranzgrenzwerte wie für den BÜHLMANN fCAL[®] ELISA:

Klinische Schwellenwerte

Calprotectinkonzentration	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: Diagnostische Bereiche des BÜHLMANN fCAL[®] turbo

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:

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 (Ref. 4).

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[®] turbo zwischen Patienten mit CED und anderen nichtentzündlichen GI-Erkrankungen einschliesslich RDS zu unterscheiden, wurde mit von 295 Patienten gesammelten klinischen Proben, die mithilfe des CALEX[®] Cap extrahiert wurden, untersucht. Einhundertsiebenundzwanzig (127) Patienten hatten die endgültige Diagnose einer CED (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder unbestimmte Colitis), 103 Patienten hatten RDS und 65 Patienten stellten sich mit Bauchschmerzen und/oder Durchfall bzw. anderen GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen vor. Die endgültige Diagnose wurde durch Endoskopie sowie andere klinische Befunde gestützt.

Die durch ROC-Analyse definierte optimale Kombination von Toleranzgrenzen für diese Patientenpopulationen betrug 80 µg/g und 160 µg/g Calprotectin (Tabelle 6 und 8), 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).

Endgültige Diagnose	Zahlenmässige Verteilung der Patientenergebnisse (Prozent) innerhalb der diagnostischen Bereiche des BÜHLMANN fCAL[®] turbo.
----------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Gesamt
CED	11 (8.7%)	8 (6.3%)	108 (85.0%)	127 (100%)
RDS	75 (72.8%)	11 (10.7%)	17 (16.5%)	103 (100%)
Sonstige GI	42 (64.6%)	8 (12.3%)	15 (23.1%)	65 (100%)

Tabelle 5: Verteilung der Patientenergebnisse innerhalb der diagnostischen Bereiche des BÜHLMANN fCAL® turbo

CED vs. nicht-CED	Klinischer Entscheidungspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Empfindlichkeit (95 % KI)	91.3% (85.0%, 95.6%)	85.0% (77.6%, 90.7%)
Spezifität (95 % KI)	69.6% (62.1%, 76.5%)	81.0% (74.2%, 86.6%)
PPV (95 % KI)	69.5% (61.9%, 76.3%)	77.1% (69.3%, 83.8%)
NPV (95 % KI)	91.4% (85.1%, 95.6%)	87.7% (81.5%, 92.5%)
ROC AUC (95 % KI)	0.912 (0.878, 0.946)	

Tabelle 6: Klinische Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® turbo bei der Unterscheidung einer CED von einer nicht-CED – RDS und sonstigen GI-assoziierten Erkrankungen bei den klinischen Entscheidungspunkten 80 µg/g und 160 µg/g

CED vs. nicht-CED	Klinischer Entscheidungspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Empfindlichkeit (95 % KI)	94.5% (89.0%, 97.8%)	80.3% (72.3%, 86.8%)
Spezifität (95 % KI)	62.5% (54.7%, 69.8%)	85.7% (79.5%, 90.6%)
PPV (95 % KI)	65.6% (58.2%, 72.4%)	81.0% (73.0%, 87.4%)
NPV (95 % KI)	93.8% (87.5%, 97.5%)	85.2% (78.9%, 90.2%)

Tabelle 7: Klinische Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® turbo bei der Unterscheidung einer CED von einer nicht-CED – RDS und sonstigen GI-assoziierten Erkrankungen bei den klinischen Entscheidungspunkten 50 µg/g und 200 µg/g

CED vs. RDS	Klinischer Entscheidungspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Empfindlichkeit (95 % KI)	91.3% (85.0%, 95.6%)	85.0% (77.6%, 90.7%)
Spezifität (95 % KI)	72.8% (63.2%, 81.1%)	83.5% (74.9%, 90.1%)
PPV (95 % KI)	80.6% (73.1%, 86.7%)	86.4% (79.1%, 91.9%)
NPV (95 % KI)	87.2% (78.3%, 93.4%)	81.9% (73.2%, 88.7%)
ROC AUC (95 % KI)	0.925 (0.892, 0.958)	

Tabelle 8: Klinische Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® turbo bei der Unterscheidung einer CED von einer RDS bei den klinischen Entscheidungspunkten 80 µg/g und 160 µg/g

CED vs. RDS	Klinischer Entscheidungspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Empfindlichkeit (95 % KI)	94.5% (89.0%, 97.8%)	80.3% (72.3%, 86.8%)
Spezifität (95 % KI)	67.0% (57.0%, 75.9%)	88.3% (80.5%, 93.8%)
PPV (95 % KI)	77.9% (70.5%, 84.2%)	89.5% (82.3%, 94.4%)
NPV (95 % KI)	90.8% (81.9%, 96.2%)	78.4% (69.9%, 85.5%)

Tabelle 9: Klinische Leistungsmerkmale des BÜHLMANN fCAL® turbo bei der Unterscheidung einer CED von einer RDS bei den klinischen Entscheidungspunkten 50 µg/g und 200 µg/g

KI – Konfidenzintervall

PPV – positiver Vorhersagewert

NPV – negativer Vorhersagewert

ROC AUC – Fläche unter der Kurve der Operationscharakteristik eines Beobachters

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. 10-22).

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).

Durch endoskopische Befunde bestimmte Calprotectin ¹ - vs CED-Aktivität	Studie 1 Spanien: (Ref. 12)	Studie 2 Spanien: (Ref. 13)	Studie 3 Australien, Neuseeland (Ref.14)
Patientenanzahl und demographische Informationen	89 (CD ²) Alter: 32-58 44 % männlich	123 (UC ³) Alter: 18-85 66,4 % männlich	99 (CD ² nach Resektion) Alter: 29-47 46,5 % männlich
Toleranzgrenze	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80.3%	53%

Tabelle 10: Korrelation der Calprotectin-Spiegel mit der CED-Krankheitsaktivität, die durch endoskopische Untersuchungen bestimmt wurde.

¹ Die Ergebnisse für Studie 1 und 2 wurden mit den BÜHLMANN Lateral Flow Assays (Quantum Blue[®] fCAL and Quantum Blue[®] fCAL high range) erzielt. Die Ergebnisse in Studie 3 wurden mit dem BÜHLMANN fCAL[®] ELISA erzielt.

² CD = Morbus-Crohn-Patienten

³ UC = Colitis-ulcerosa-Patienten

Calprotectin ¹ vs zukünftige klinische Remissionen oder Rezidive	Studie 4 Vereinigtes Königreich (Ref. 15)	Studie 5 Spanien: (Ref. 16)	Studie 6 Spanien: (Ref. 17)
Patientenanzahl und demographische Informationen	92 (CD ²)	30 (CD ²) Adalimumab-	33 (CD ²) 20 (UC ³) Infliximab-

	38% männlich	Therapie Alter: 24-64 43,3% männlich	Therapie Alter: 18-68 47,2% männlich
Nachbeobachtungszeit nach Calprotectin-Messung	12 Monate	4 Monate	12 Monate
Patienten mit klinischem Rezidiv nach Nachbeobachtung	11%	30%	23%
Toleranzgrenze	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96.8%	100%	96.1%
PPV	27.6%	75%	68.7%

Tabelle 11: Bestimmung der diagnostischen Aussagekraft von Calprotectin bei der Vorhersage von klinischen Remissionen und Rezidiven bei CED.

¹ Die Ergebnisse der Studie 4 wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA erzielt. Die Ergebnisse für Studie 5 und 6 wurden mit den BÜHLMANN Lateral Flow Assays (Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range) erzielt.

² CD = Morbus-Crohn-Patienten

³ UC = Colitis-ulcerosa-Patienten

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.

Calprotectin-Werte 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. 10-22).

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. 10-22).

LEISTUNGSMERKMALE

Die dargestellten Leistungsmerkmale wurden auf einem Roche cobas® 6000 c501 Gerät ermittelt. Für die Leistungsmerkmale auf anderen klinisch-chemischen Analysegeräten, siehe das Applikationsprotokoll für das jeweilige klinisch-chemische Analysegerät.

Methodenvergleich – fCAL® turbo CALEX® Cap vs fCAL® ELISA CALEX® Cap

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertneunundneunzig (199) klinische Proben wurden mit einer Charge BÜHLMANN fCAL® turbo über 18 Tage in einem Kalibrierzyklus gemessen. Referenzwerte mit einem Calprotectin-Endkonzentrationsintervall von 30,3 – 1672,5 µg/g wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA ermittelt. Die Proben wurden mit dem CALEX® Cap extrahiert. Einzelbestimmungen aus CALEX® Cap Extrakten wurden in beiden Methoden durchgeführt. Die Abweichung wurde mithilfe der linearen Regression nach Passing-Bablok und der Bland-Altman-Analyse bestimmt.

Bland-Altman-Analyse			Regressionsanalyse nach Passing-Bablok				r
Durchschnittliche Abweichung (95% KI)	Untere LoA (95% KI)	Obere LoA (95% KI)	Steigung (95% KI)	Schnittpunkt (µg/g) (95% KI)	Abweichung bei 80 µg/g (95% KI)	Abweichung bei 160 µg/g (95% KI)	
0.68% (-2.6%, 4.0%)	-46.0% (-51.6%, -40.3%)	47.3% (41.6%, 53.0%)	1.139 (1.104, 1.172)	-18.3 (-24.4, -13.2)	-9.0% (-15.1%, -3.1%)	2.4% (-1.2%, 5.4%)	0.982

Methodenvergleich – fCAL® turbo CALEX® Cap vs fCAL® ELISA manuelle Extraktion

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertachtundsechzig (168) klinische Proben wurden mit drei Chargen des CALEX® Cap extrahiert und mit einer Charge BÜHLMANN fCAL® turbo über 18 Tage in einem Kalibrierzyklus gemessen. Referenzwerte mit einem Calprotectin-Endkonzentrationsintervall von 30,5 – 1573,8 µg/g wurden für manuell extrahierte Proben ermittelt und mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA gemessen. Die Extrakte wurden in beiden Methoden als Einzelbestimmungen gemessen. Die Abweichung wurde mithilfe der linearen Regression nach Passing-Bablok und der Bland-Altman-Analyse bestimmt.

Bland-Altman-Analyse			Regressionsanalyse nach Passing-Bablok				r
Durchschnittliche Abweichung (95% KI)	Untere LoA (95% KI)	Obere LoA (95% KI)	Steigung (95% KI)	Schnittpunkt (µg/g) (95% KI)	Abweichung bei 80 µg/g (95% KI)	Abweichung bei 160 µg/g (95% KI)	

11.1% (5.5%, 16.6%)	-60.7% (-70.3%, -51.2%)	82.8% (73.3%, 92.4%)	1.336 (1.265, 1.429)	-31.7 (-44.1, -19.4)	-6% (-16.4%, 7.1%)	13.8% (8.1%, 23.2%)	0.955
---------------------------	-------------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	--------------------------	---------------------------	-------

Reproduzierbarkeit (Präzisionsbeurteilungsstudie an mehreren Standorten): 3,2 – 9,1% VK

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Laborstandorte x 5 Tage x 5 Replikate ermittelt. Es wurden acht gepoolte Stuhlprobenextrakte mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 47,2 - 5475,6 µg/g untersucht.

Präzision zwischen verschiedenen Chargen: 2,4 – 8,2% VK

Die Lot zu Lot-Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Chargen x 5 Tage x 5 Replikate ermittelt. Es wurden acht gepoolte Stuhlprobenextrakte mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 45,2 - 5303,1 µg/g untersucht.

Wiederholbarkeit: 0,7 – 8,3% VK

Laborinterne Präzision: 1,4 – 9,1% VK

Die Wiederholbarkeit und laborinterne Präzision wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem standardisierten Studiendesign 20 Tage x 2 Läufe x 2 Replikate ermittelt. Es wurden acht gepoolte Stuhlprobenextrakte mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 42,9 – 5405,6 µg/g untersucht.

Reproduzierbarkeit der Extraktion – CALEX® Cap: 8,1 – 19,7% VK

Die Reproduzierbarkeit der Extraktion wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 2 Tage x 2 Bediener x 3 CALEX® Cap Chargen x 2 Extraktionen x 3 Replikate ermittelt. Es wurden zwölf klinische Stuhlproben, einschliesslich Proben mit fester, halbfester und flüssiger Konsistenz, mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 42,7 – 3440,0 µg/g untersucht.

Genauigkeit / Wiederfindung: 93,6 – 102% VK

Sieben Stuhlprobenextrakte von klinischen Proben mit Calprotectinspiegel im Bereich zwischen 44,1 und 1076,3 µg/g wurden mit 56,9 µg/g oder 227,8 µg/g Calprotectin in Kalibriermaterial gespikt. Das Spiking wurde mit 10 % des Probenextraktvolumens durchgeführt. Die „Baseline“ Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen der analytfreien Probe gespikt. Die „Baseline“ und „Baseline + Spike“ Proben wurden in vier Replikaten gemessen.

Probenverschleppung

Die Probenverschleppung wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP10-A2 ermittelt. Auf dem Roche cobas® 6000 c501 Gerät wurde mit dem BÜHLMANN fCAL®

turbo Test keine statistisch signifikante Probenverschleppung nachgewiesen.

Nachweisgrenze (LoD): 23,7 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- und 60 Niedrigspiegel-Replikaten; und einem **LoB von 16,7 µg/g**.

Bestimmungsgrenze (LoQ): 23,7 µg/g

Die LoQ wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP17-A2 basierend auf 90 Bestimmungen und einem Präzisionsziel von 20% VK ermittelt. Die LoQ-Schätzung war unterhalb der Schätzung von LoD und ist daher als gleich dem geschätzten LoD anzusehen.

Linearitätsbereich: 9,13 – 13339 µg/g

Der Linearitätsbereich des BÜHLMANN fCAL[®] turbo wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Proben mit einer Konzentration von über 2000 µg/g wurden automatisch 1:10 vom Analysegerät verdünnt. Eine maximale Linearitätsabweichung von 10% war zugelassen. Bei Werten unterhalb 75 µg/g war eine absolute Differenz von weniger als 7,5 µg/g zugelassen.

Hochdosis Hook-Effekt

Proben mit theoretischen Konzentrationen bis zu 45715 µg/g können ohne Einschränkung des Messbereichs des Tests gemessen werden.

Störsubstanzen

Die Anfälligkeit des BÜHLMANN fCAL[®] turbo Tests für orale Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel, Hämoglobin sowie enteropathologische Mikroorganismen wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP07-A2 beurteilt. Eine Abweichung der Ergebnisse höher als 10% wurde als Störeinfluss betrachtet.

Bei den folgenden Substanzen wurde kein Störeinfluss nachgewiesen [Konzentration in mg/ 50 mg Stuhl]; gyno-Tardyferon (0,11), Prednison (0,31), Imurek (0,19); Salofalk (5,21), Asacol (2,50), Agopton (0,18), Vancocin (2,00), Sulfamethoxazol (1,6), Trimethoprim (0,35), Ciproxin (1,25), Vitamin E (0,30), Bion 3 (1,06), Hämoglobin (1,25).

Bei den folgenden enteropathologischen Mikroorganismen wurde kein Störeinfluss nachgewiesen [Konzentration in koloniebildenden Einheiten (KBE)/ mL Stuhlextrakt]; *Escherichia coli* ($3,3 \times 10^7$), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* ($9,0 \times 10^7$), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* ($5,3 \times 10^7$), *Citrobacter freundii* ($12,9 \times 10^7$), *Shigella flexneri* ($5,0 \times 10^7$), *Yersinia enterocolitica* subsp. *Enterocolitica* ($9,8 \times 10^7$).

REFERENZEN

1. Nilsen T et al.: J Clin Lab Anal 2017 ; 31(4). doi: 10.1002/jcla.22061
2. Mandic-Havelka A et al.: Clin Lab. 2017 ; 63(5):907-913.
3. Noebauer B et al. : Biochem Med (Zagreb) 2017 ; 27(3):030710.
4. Fagerhol MK: Lancet 2000; 356, 1783-4.
5. Tibble JA et al.: Gut 2000; 47, 506-13.
6. Tibble JA et al.: Gastroenterol 2002; 123, 450-60.
7. Jahnsen J et al.: Tidsskr Nor Legeforen 2009; 129(8), 743-5.
8. Manz M. et al.: BMC Gastroenterology 2012; 12, 5.
9. Pavlidis P. et al. Scand J Gastroenterol. 2013; 48(9), 1048-54.
10. Konikoff MR and Denson LA: Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6), 524-34.
11. Lin et al.: Inflamm Bowel Dis 2014; 20: 1407-15.
12. Lobatón T et al.: J Crohns Colitis 2013, 641-51.
13. Lobatón T et al.: Inflamm Bowel Dis 2013; 19(5), 1034-42.
14. Wright et al.: Gastroenterology 2015; 148(5), 938-947.
15. Naismith GD et al.: J Crohns Colitis 2014; 8, 1022-9.
16. Ferreiro-Iglesias R et al.: Scand J Gastroenterol 2015, 23, 1-6.
17. Ferreiro-Iglesias R1 et al. : J Clin Gastroenterol 2015; 50(2),147-51.
18. Guardiola J. et al. Clinical Gastroenterology & Hepatology 2014; 12(11) 1865-70.
19. Lason A et al.: United European Gastroenterol J 2015, 3(1) 72-9.
20. Bressler B et al.: Can J Gastroenterol Hepatol 2015, 29(7), 369-72.
21. Peyrin-BL et al.: Am J Gastroenterol 2015, 110, 1324-38.
22. Ricciuto A et al.: Crit Rev Clin Lab Sci. 2019; 56(5):307-320.
23. Blirup-Jensen et al.: Clin Chem Lab Med 2001; 39, 1110-22
24. Blirup-Jensen et al.: Clin Chem Lab Med 2008; 46, 1470-9
25. Molander P et al.: Journal of Crohn's and Colitis 2015, 33-40.
26. De Vos M et al.: Inflamm Bowel Dis. 2013; 19, 2111-2117.
27. Fagerberg UL et al.: J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40, 450-5.
28. Li F. et al.: PLoS ONE 10(3) (2015).
29. Zhu Q. et al. PLoS ONE 11 (3) (2016).
30. Peura S. et al.: Scand J Clin Lab Invest 2018; 78(1-2): 120-124.

ÄNDERUNGSLOG

Datum	Version	Änderung
2022-02-28	A4	Aktualisierung des Kapitels „Warnhinweise und Vorsichtsmassnahmen“, Überarbeitung des Kapitels „Symbole“, Einführung des Kapitels „Standardisierung und messtechnische Rückverfolgbarkeit“, Aufnahme der Nummer der benannten Stelle zur CE-Kennzeichnung – Konformitätsbewertungsverfahren gemäss IVDR 2017/746

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

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

SCHÄDEN BEIM VERSAND

Bitte informieren Sie Ihren Vertriebspartner, falls dieses Produkt beim Empfang beschädigt war.

SYMBOLE

BÜHLMANN verwendet Symbole und Zeichen, die in ISO 15223-1 aufgeführt und beschrieben sind.

