



BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Calprotectin-ELISA

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

EK-CAL 96 tests

EK-CAL2 192 tests

Freigabedatum: 2020-11-16
Version A3

 **Hersteller**

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

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN fCAL® ELISA ist ein *in-vitro*-Diagnostest 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 Calprotectinmoleküle, die wiederum an die Fängerantikörper auf der Platte gebunden sind. Nach der Inkubation und weiteren Waschschrritten 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 ₂ O verdünnen
Inkubationspuffer mit Konservierungsmittel	2 Flaschen x 125 mL	3 Flaschen x 125 mL	B-CAL-IB	Gebrauchsfertig

Reagenzien	Menge		Code	Rekonstitution
	EK-CAL	EK-CAL2		
Kalibratoren A-E^{1) 2)} Aus Serum gewonnenes Calprotectin in einer Puffer- matrix mit Konservierungs- mittel	5 Fläsch- chen x 1 mL	5 Fläsch- chen x 1 mL	B-CAL- CASET	Gebrauchs- fertig
Kontrolle tief / hoch³⁾ Aus Serum gewonnenes Calprotectin in einer Puffer- matrix mit Konservierungs- mittel	2 Fläsch- chen x 1 mL	2 Fläsch- chen x 1 mL	B-CAL- CONSET	Gebrauchs- fertig
Enzymmarker anti-Calprotectin Ak konjugiert mit HRP	1 Fläsch- chen x 12 mL	2 Fläsch- chen x 12 ml	B-CAL-EL	Gebrauchs- fertig
TMB-Substrat TMB in Citratpuffer	1 Fläsch- chen x 12 mL	2 Fläsch- chen x 12 mL	B-TMB12	Gebrauchs- fertig
Stopp-Lösung 0,25 M Schwefelsäure	1 Fläsch- chen x 12 mL	2 Fläsch- chen x 12 mL	B-ST512	Gebrauchs- fertig korrosives Agens

Tabelle 1

- Die tatsächlichen 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.
- 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.
- 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 Druckleistenschluss entlang der ganzen Leiste wieder verschliessen. 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 ERHÄLTICHE 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.

Extraktionsprodukt Kits	Menge	Code
CALEX® Cap	Packungen zu 50, 200 oder 500 Röhrchen, jedes mit 5 mL Extraktionspuffer gefüllt Gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 Röhrchen, Spateln und Böden	B-CAL-RD

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 Einwegimpfeschlingen
 - 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 Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

- Dieses Kit enthält Komponenten, die gemäss Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 klassifiziert sind:
2-Methyl-4-isothiazolin-3-on-hydrochlorid (Konz. ≥ 0,0015%), folglich können die Reagenzien allergische Hautreaktionen verursachen (H317).
Schwefelsäure (Konz. ≥ 2,5 - <5%). Folglich können die Reagenzien Hautreizungen (H315) und schwere Augenreizungen (H319.) verursachen.
- 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 / 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 Waschschrift (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 Extraktionsröhrchens sollten vermieden werden. Eine kleine Menge an unlöslichen Partikeln können auch nach dem Mischen vorhanden sein.

ELISA

- Bei der Durchführung des ELISA sind die Waschschriffe 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 Waschschrift fortgefahren wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.
- Die angegebene Anzahl von Waschschriffen muss dringend eingehalten werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Der Plattenschüttler muss auf ca. 450 U/min (7,5 Hz) eingestellt sein. Eine höhere Rotationsgeschwindigkeit

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 unbekannt 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.

PROBENTNAHME 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

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 Stabilität der Extrakte

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem CALEX® Cap gewonnen wurden, ist bei Raumtemperatur (23 °C) 7 Tage und bei 2-8 °C bis zu 15 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).

Wichtiger Hinweis: Nach der Extraktion mit BÜHLMANN Smart-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 Stabilität der Extrakte

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem Smart-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 $x \text{ mg Stuhl} \times 49 = y \text{ µL Extraktionspuffer}$ (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.

- Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen dekantieren und mit der Testdurchführung fortfahren oder die Extrakte lagern (siehe hierzu Lagerung der Extrakte).

3.2 Stabilität 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:

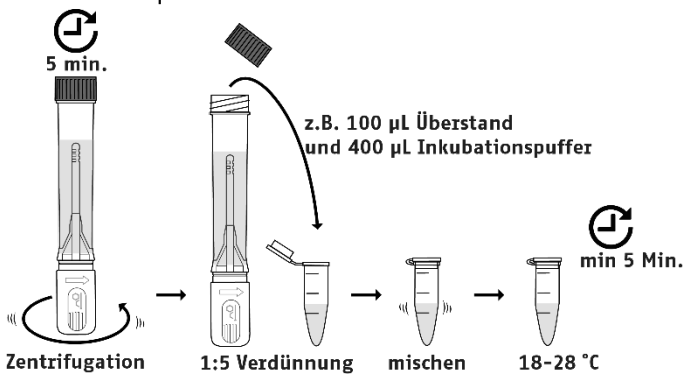
- Bei Proben bis zu 600 µg/g Calprotectin sollte die „Lower Range“ Variante (Messbereich 10-600 µg/g) ausgewählt werden.
- Falls die Proben 600 µg/g häufig überschreiten, sollte die „Extended Range“ Variante (Messbereich 30-1800 µg/g) ausgewählt werden.

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 Inkubations-puffer 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.

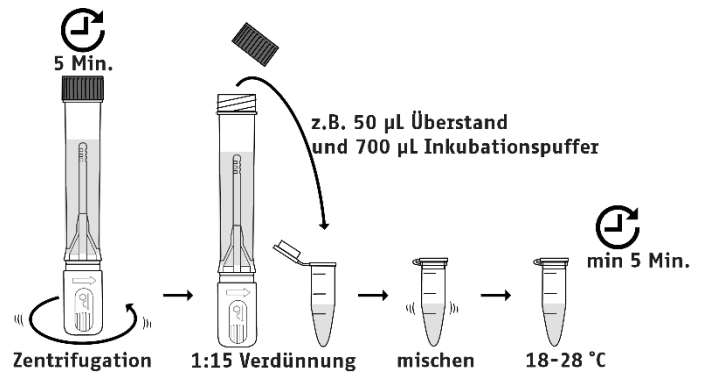


1.2 Manuelle Extraktion oder Smart-Prep: Die Stuhlextrakte mit Inkubations-puffer 1:50 verdünnen (z. B. 20 µL Extrakt und 980 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

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.

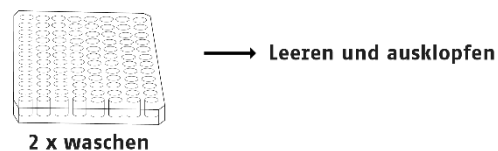
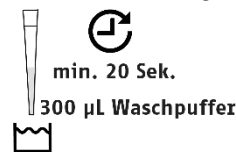
1.1' CALEX® Cap: Die Stuhlextrakte mit Inkubations-puffer 1:15 verdünnen (z. B. 50 µL Extrakt und 700 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.



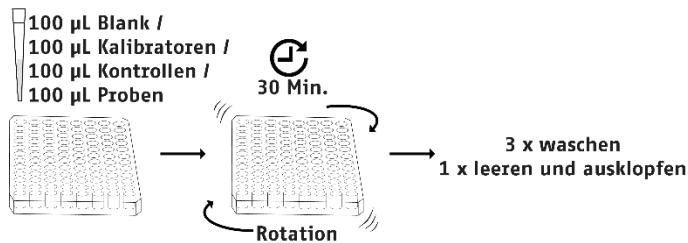
1.2' Manuelle Extraktion oder Smart-Prep: Die Stuhlextrakte mit Inkubations-puffer 1:150 verdünnen (z. B. 20 µL Extrakt und 2980 µL Inkubationspuffer) und gut mischen. Vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C äquilibrieren lassen.

- 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.
- Die beschichteten Wells zweimal mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen.

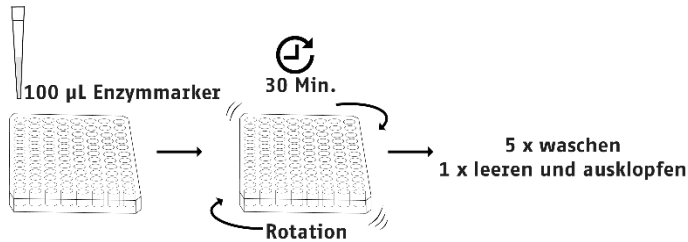
Wichtiger Hinweis: Eine minimale Inkubationszeit des Waschpuffers im Well von 20 Sekunden muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.



- 100 µL Inkubationspuffer (Leerprobe) und Je 100 µL Kalibrator A-E in die entsprechenden Wells pipettieren.
- Je 100 µL der Kontrollen tief und hoch in die entsprechenden Wells pipettieren.
- Je 100 µL der verdünnten Proben in die nächsten Wells pipettieren.
- 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).
- 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.

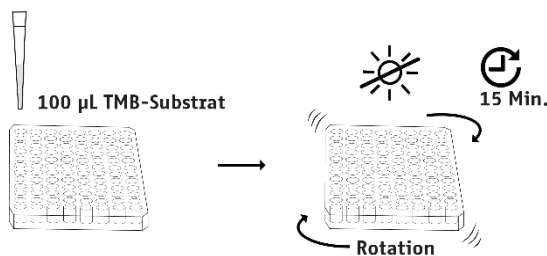


7. 100 µL des Enzymmarkers in jedes Well pipettieren.
8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei ~450 U/min 30 ±5 Minuten bei 18-28 °C inkubieren.
9. Abdeckfolie entfernen und entsorgen. Die Wells entleeren und 5 x mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer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

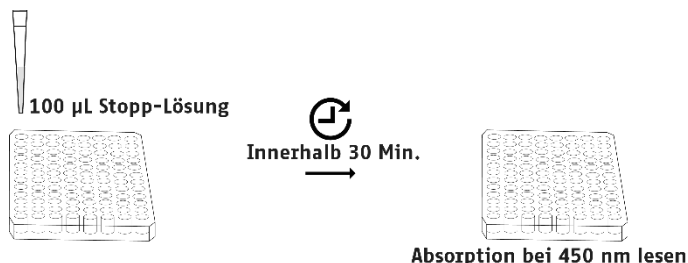


Wichtiger Hinweis: TMB-Substrat vor dem Gebrauch auf 18-28 °C äquilibrieren lassen.

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 UND MESSTECHNISCHE RÜCKVERFOLGBARKEIT

Es existieren keine international oder national anerkannten Referenzmaterialien oder Referenzmessverfahren fürs Calprotectin in Stuhlproben. 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.

Das ermittelte 95%-Konfidenzintervall der kombinierten Unsicherheit der Produktkalibratoren lag unter 13,3% und die der Kontrollen unter 16,4%.

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 3 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).
- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinspiegel im Stuhl aufweisen (Ref. 21-24).
- Patienten, die nichtsteroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) einnehmen, haben möglicherweise erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl.

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, 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 klinischen 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. Es wurden zehn Stuhlprobenextrakte mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 13,2 – 501,4 µg/g untersucht (Tabelle 13).

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**.

Bestimmungsgrenze (LoQ): 9,8 µg/g

Die LoQ wurde anhand von Daten aus der Studie der laborinternen Präzision ermittelt, einschliesslich einer zusätzlichen Stuhlprobe mit einer Konzentration von 7,4 µg/g. Die LoQ wurde als die Calprotectin-Konzentration bestimmt, bei der das Präzisionsprofil einen VK von über 20% überschreitet.

Linearität 10-600 µg/g

Der Linearitätsbereich des BÜHLMANN fCAL® ELISA wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Eine maximale Linearitätsabweichung von $\pm 20\%$ 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 2 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 mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 38,5 – 918,0 µg/g untersucht (Tabelle 16).

Präzision zwischen verschiedenen Chargen:

4,2 – 9,7% VK

Die Präzision zwischen verschiedenen Chargen wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Chargen x 5 Tage x 5 Replikate und einem Random-Effects-Varianzkomponenten-Modell ermittelt. Es wurden sechs Stuhlprobenextrakte mit Calprotectin-konzentrationen im Bereich von 46,4 – 1476,1 µg/g untersucht (Tabelle 17).

Reproduzierbarkeit (Präzisionsbeurteilungsstudie an mehreren Standorten): 6,4 – 19,0% VK

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 mit dem Studiendesign 3 Laborex 2 Bediener x 5 Tage x 2 Läufe pro Tag x 4 Replikate ermittelt. In der Studie wurden drei Reagenzchargen verwendet. Es wurden fünf gepoolte Stuhlprobenextrakte mit Calprotectin-konzentrationen im Bereich von 42,1 – 1053,3 µg/g untersucht (Tabelle 18).

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 19).

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

Sieben Stuhlprobenextrakte mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich zwischen 46,5 und 990,2 µg/g wurden mit 180 µg/g Calprotectin in Kalibriermaterial versetzt („Spike“). Es wurden jeweils 10% des Probenextraktvolumens zugegeben. Die „Basislinie“-Proben wurden mit der entsprechenden Menge von Inkubationspuffer versetzt. Die „Basislinie“- und „Basislinie + Spike“-Proben wurden in drei Replikaten gemessen (Tabelle 20).

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. Es wurden neun klinische Stuhlproben, einschliesslich Proben mit fester, halbfester und flüssiger Konsistenz, mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 51,2 – 1783,7 µg/g untersucht (Tabelle 21).

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.

Es wurden fünf klinische Stuhlproben, einschliesslich Proben mit fester, halbfester und flüssiger Konsistenz, mit Calprotectinkonzentrationen im Bereich von 42,5 – 2949,9 µg/g untersucht (Tabelle 22).

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. Zweihunderteinundvierzig (241) klinische Proben wurden unter Verwendung einer Charge des CALEX® Cap extrahiert. Referenzwerte mit einem Calprotectin-Endkonzentrationsintervall von 30,5 – 1496,6 µg/g wurden mit der manuellen Extraktionsmethode ermittelt. 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 (Tabellen 23 und 24).

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 25 aufgeführten Substanzen bis zu den angegebenen Konzentrationen nachgewiesen. Es wurde kein Störeinfluss der in Tabelle 26 aufgeführten enteropathologischen Mikroorganismen bis zu den angegebenen Mengen an koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL Stuhlprobenextrakt nachgewiesen.

TABELLEN UND ZAHLEN

Klinische Studien

Klinische Studie – Unterscheidung einer organischen Erkrankung von einer funktionellen gastro-intestinalen Erkrankung

Endgültige Diagnose	Zahlenmäßige Verteilung der Patientenergebnisse (Prozent) innerhalb der diagnostischen Bereiche des BÜHLMANN fCAL® ELISA.			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
CED	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
RDS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Andere GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabelle 5

CED vs. nicht-CED	Klinischer Entscheidungspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Empfindlichkeit (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Spezifität (95% KI)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
PPV (95% KI)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
NPV (95% KI)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
ROC AUC (95% KI)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabelle 6

CED vs. nicht-CED	Klinischer Entscheidungspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Empfindlichkeit (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Spezifität (95% KI)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
PPV (95% KI)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
NPV (95% KI)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabelle 7

CED vs. RDS	Klinischer Entscheidungspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Empfindlichkeit (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Spezifität (95% KI)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
PPV (95% KI)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
NPV (95% KI)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
ROC AUC (95% KI)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabelle 8

CED vs. RDS	Klinischer Entscheidungspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Empfindlichkeit (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Spezifität (95% KI)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
PPV (95% KI)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
NPV (95% KI)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabelle 9

nicht-IBD – IBS + andere GI

KI – Konfidenzintervall

PPV – positiver Vorhersagewert

NPV – negativer Vorhersagewert

ROC AUC – Fläche unter der Kurve der Operationscharakteristik eines Beobachters

Klinische Studien – CED-Überwachung

Durch endoskopische Befunde bestimmte Calprotectin ¹ - vs CED-Aktivität	Studie 1 Spanien (Ref. 9)	Studie 2 Spanien (Ref. 10)	Studie 3 Australien, Neuseeland (Ref. 11)
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

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

Klinische Studien – CED-Überwachung

Calprotectin ¹ vs zukünftige klinische Remissionen oder Rezidive	Studie 4 Vereinigtes Königreich (ref. 12)	Studie 5 Spanien (ref. 13)	Studie 6 Spanien (ref. 14)
Patientenanzahl und demographische Informationen	92 (CD ²) 38% männlich	30 (CD ²) Adalimumab-Therapie Alter: 24-64 43,3% männlich	33 (CD ²) 20 (UC ³) Infliximab-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

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

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

TESTDURCHFÜHRUNG MIT „LOWER RANGE“ VARIANTE, 10–600 µg/g

Exemplarische Ergebnisse

	Konz. [µg/g]	Extinktion [OD]	Berechnete Konz. [µg/g]	VK Konz. [%]
Leerwert-Durchschnitt		0,096		
Kal. A	10	0,073		
Kal. A	10	0,066		
Durchschnitt Kal. A	10	0,069		7,2
Kal. B	30	0,143		
Kal. B	30	0,153		
Durchschnitt Kal. B	30	0,148		4,8
Kal. C	100	0,465		
Kal. C	100	0,456		
Durchschnitt Kal. C	100	0,460		1,4
Kal. D	300	1,121		
Kal. D	300	1,135		
Durchschnitt Kal. D	300	1,128		0,9
Kal. E	600	1,658		
Kal. E	600	1,671		
Durchschnitt Kal. E	600	1,664		0,6
Kontrolle tief		0,201	41	
Kontrolle tief		0,189	39	
Durchschnitt Kontrolle tief		0,195	40	4,4
Kontrolle hoch		0,598	134	
Kontrolle hoch		0,583	130	
Durchschnitt Kontrolle hoch		0,590	132	1,8

Tabelle 12

Exemplarische Standardkurve

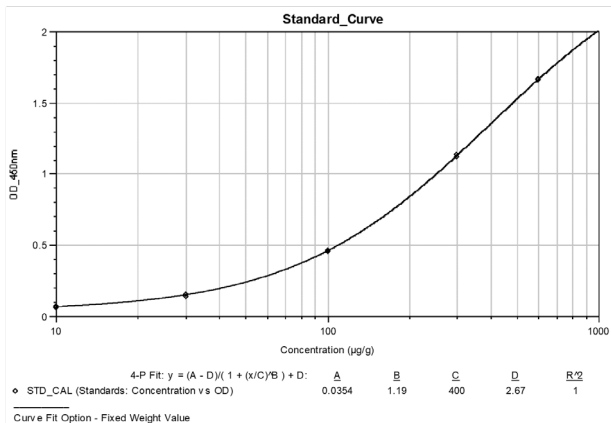


Abbildung 1

Laborinterne Präzision

Proben-Nr.	n	Mittelwert [µg/g]	Wiederholbarkeit		Zwischen verschiedenen Tagen		Gesamtpräzision	
			SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
#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%

Tabelle 11

Linearität

ID	Getesteter Messbereich	R ²	p-Wert für nicht-linearen Koeffizienten	Linearer Bereich
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

Tabelle 14

Wiederfindung bei Spiking

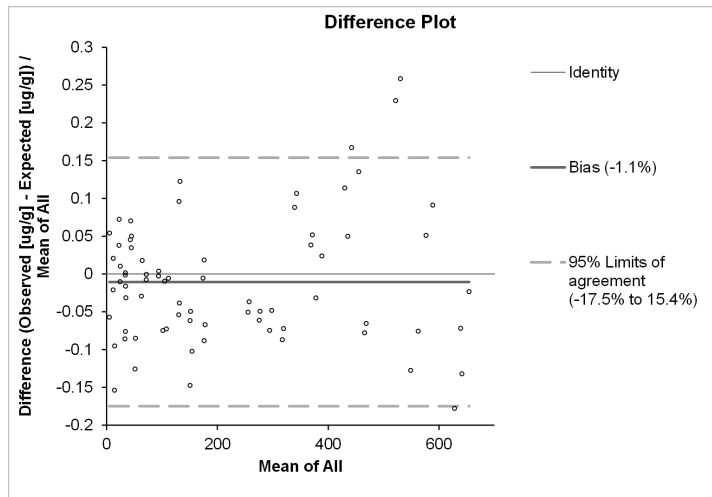


Abbildung 2

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

TESTDURCHFÜHRUNG MIT „EXTENDED RANGE“-VARIANTE, 30–1800 µg/g

Exemplarische Ergebnisse

	Konzentration [µg/g]	Extinktion [OD]
Kalibrator A	30	0,047
	30	0,046
Kalibrator B	90	0,138
	90	0,140
Kalibrator C	300	0,464
	300	0,452
Kalibrator D	900	1,207
	900	1,192
Kalibrator E	1800	1,627
	1800	1,630
Leerwert-Durchschnitt		0,057
Kontrolle tief		0,147
		0,162
Kontrolle hoch		0,618
		0,618

Tabelle 15

Exemplarische Standardkurve

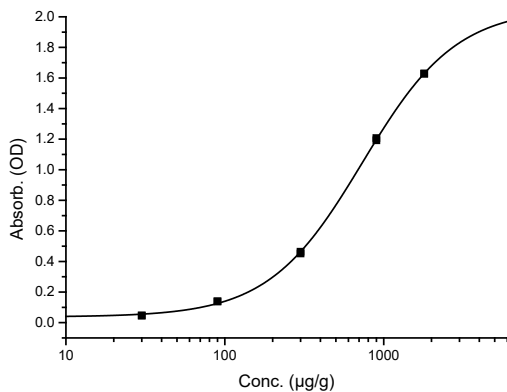


Abbildung 3

Laborinterne Präzision

ID	Mittelwert [µg/g]	n	Wiederholbarkeit		Zwischen verschiedenen Tests		Zwischen verschiedenen Tagen		Laborintern	
			SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
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%

Tabelle 16

Präzision zwischen verschiedenen Chargen

ID	Mittelwert [µg/g]	n	Intra-Test		Zwischen verschiedenen Tagen		Zwischen verschiedenen Chargen		Gesamt-	
			SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
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%

Tabelle 17

Reproduzierbarkeit – Präzisionsbeurteilungsstudie an mehreren Standorten

ID	Mittelwert [µg/g]	n	Zwischen verschiedenen Bedienern		Zwischen verschiedenen Standorten		Gesamt (Reproduzierbarkeit)	
			SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
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%

Tabelle 18

Linearität

ID	Getesteter Messbereich [µg/g]	R ²	p-Wert für nicht-linearen Koeffizienten	Linearer Bereich [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

Tabelle 19

Genauigkeit / Wiederfindung

ID	Mittlere Basislinie [µg/g]	Erwartete Basislinie + Spike [µg/g]	Gemessene Basislinie + Spike [µg/g]	Wiederfindungs-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%

Tabelle 20

TABELLEN UND ZAHLEN

LEISTUNGSMERKMALE - PRÄANALYTIK

Reproduzierbarkeit der Extraktion – Extraktion mit manuellem Einwiegen

ID	Mittelwert [µg/g]	n	Intra-Extraktion		Zwischen verschiedenen Extraktionen		Gesamtpräzision	
			SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
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%

Tabelle 21

Reproduzierbarkeit der Extraktion – CALEX® Cap

ID	Mittelwert [µg/g]	Intra-Extraktion		Zwischen verschiedenen Extraktionen		Zwischen verschiedenen Chargen		Gesamtpräzision	
		SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
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%

Tabelle 22

Methodenvergleich – CALEX® Cap Extraktion und manuelle Extraktion

Bland-Altman-Analyse		
Durchschnittliche Abweichung (95%)	Untere LoA (95% KI)	Obere LoA (95% KI)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabelle 23

Regressionsanalyse nach Passing-Bablok				
Steigung (95% KI)	Schnittpunkt (µg/g) (95% KI)	Abweichung bei 80 µg/g (95% KI)	Abweichung bei 160 µg/g (95% KI)	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

Tabelle 24

STÖRSUBSTANZEN

Orale Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel und Hämoglobin

Markenname	Wirkstoff	Konzentration mg/50 mg Stuhl
gyno-Tardyferon	Eisen(II)-sulfat (enthält 0,35 mg Folsäure)	0,11
Prednison	Prednison	0,31
Imurek	Azathioprin	0,19
Salofalk	Mesalamin; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalamin; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomycin	2,00
Sulfamethoxazol	Sulfamethoxazol	1,60
Trimethoprim	Trimethoprimlactat	0,35
Ciproxin	Ciprofloxacin	1,25
Vitamin E	DL-α-Tocopherolacetat	0,30
Bion 3	3 Probiotika (107 KBE): <i>Lactobacillus gasseri</i> PA16/8, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>Bifidobacterium longum</i> SP07/3, 12 Vitamine: 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), Folsäure (200 µg), Niacin (18 mg), Pantothenensäure (6 mg) und 7 Mineralstoffe: Iod (100 µg), Eisen (5 mg), Zink (5 mg), Selen (30 µg), Chrom (25 µg), Mangan (1,2 mg), Molybdän (25 µg)	1,06
Hämoglobin	Hämoglobin	1,25

Tabelle 25

Enteropathologische Mikroorganismen

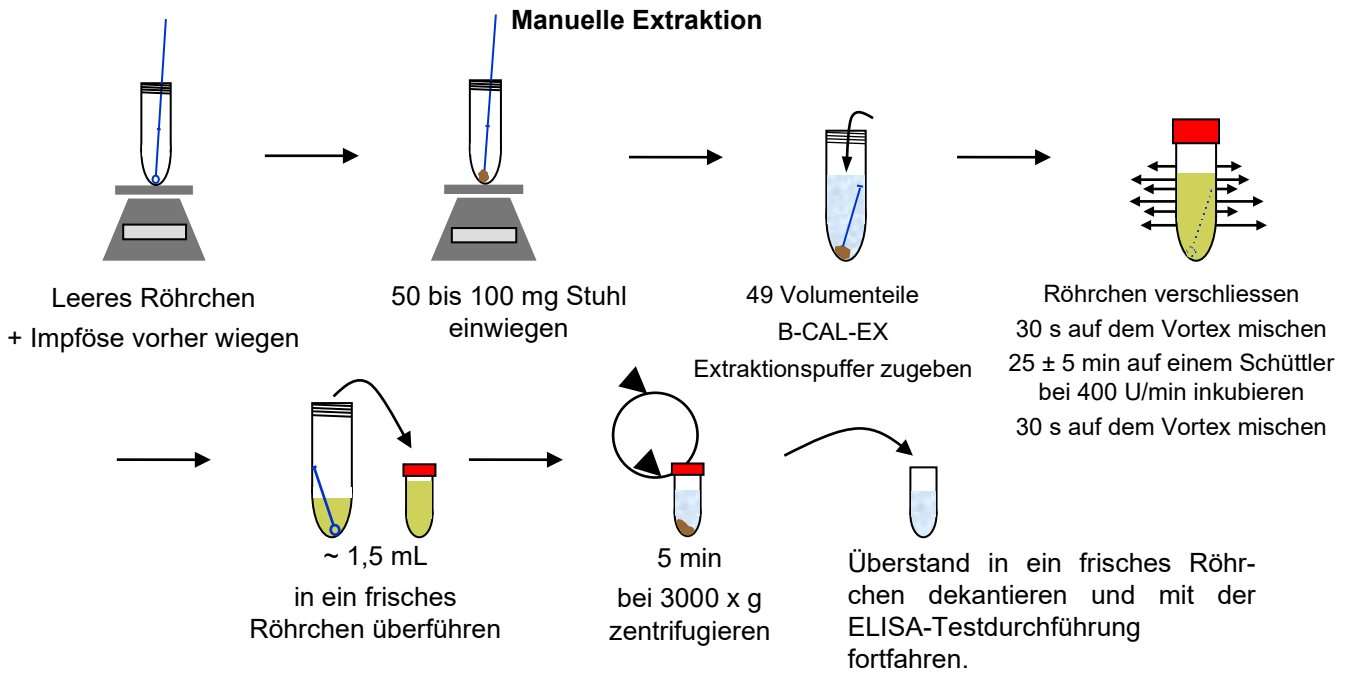
Name	Endkonzentration (KBE/ml Stuhlextrakt)
<i>Escherichia coli</i>	9.5 x 10 ⁷
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1 x 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia</i>	5.4 x 10 ⁷
<i>Citrobacter freundii</i>	9.7 x 10 ⁷
<i>Shigella flexneri</i>	1.5 x 10 ⁸
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	1.6 x 10 ⁸

Tabelle 26

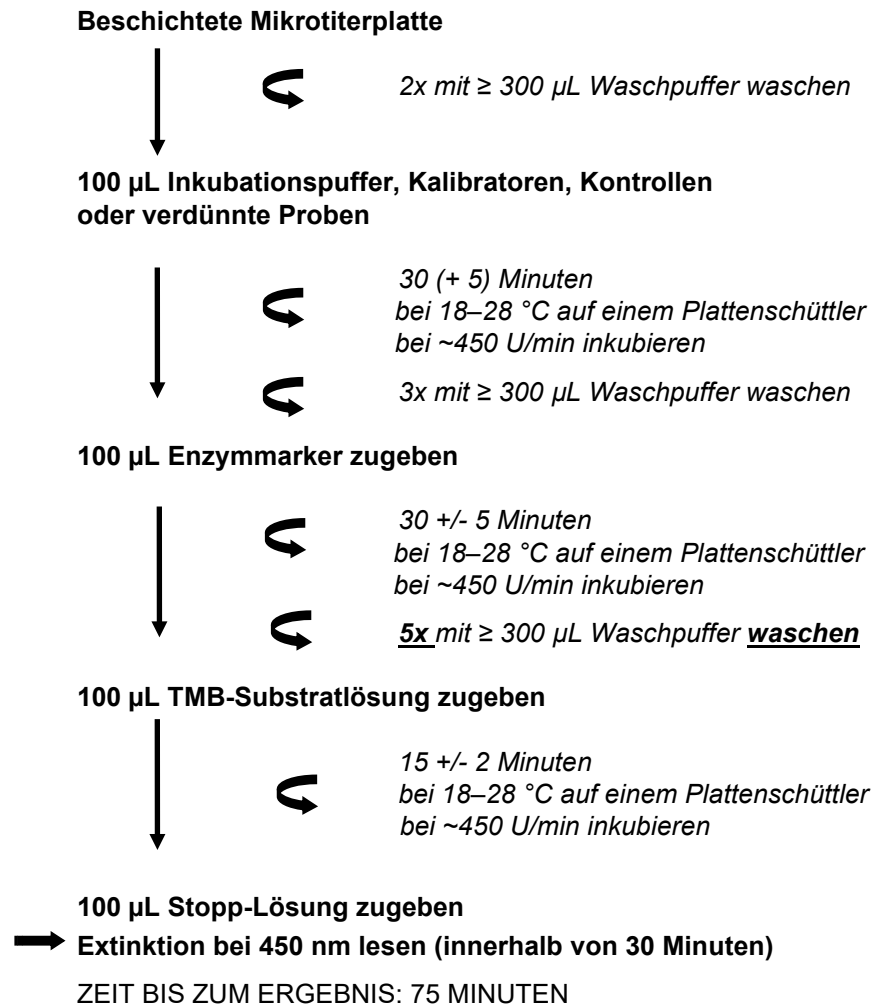
REFERENZEN

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)

CALPROTECTIN-EXTRAKTION



CALPROTECTIN-ELISA



ÄNDERUNGSLOG

Datum	Version	Änderung
2022-11-16	A3	Aktualisierung des Kapitels <i>Warnhinweise und Vorsichtsmassnahmen</i> Aufnahme der Kalibratorquantifizierung und Begründung der internen Standardisierung im Kapitel <i>Standardisierung</i> Aktualisierung des Wortlauts und Vereinfachung des Kapitels „Leistungsmerkmale“, Überarbeitung des Kapitels <i>Symbole</i> Einfügen der Patente 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. Darüber hinaus werden die folgenden Symbole und Zeichen verwendet:

Symbol	Erklärung
	Mikrotiterplatte
	Extraktionspuffer
	Waschpuffer-Konzentrat (10x)
	Inkubationspuffer
	Kalibrator A -E
	Kontrolle tief
	Kontrolle hoch
	Enzymmarker
	TMB-Substrat
	Stoplösung

Teile des Testkits sind patentrechtlich geschützt durch: EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2)

