



Quantum Blue[®] fCAL high range

**Quantitative
Lateral Flow Assay**

LF-CHR25

25 tests

Revision date: 2018-02-22

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid in the assessment of intestinal mucosal inflammation. The test results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, e.g. Crohn's disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-7), in patients with chronic abdominal pain, above the age of four (ref. 8-9), and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 10-20).

For professional use only*.

*Canada, Taiwan: For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cassette	25 pieces	B-CAL-TC	Vacuum-sealed in a foil pouch
Extraction Buffer	1 bottle 125 mL	B-CAL-EX	Ready to use
Controls Low* / High*	2 vials, 0.5 mL	B-CHR- CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	B-CHR-RCC	Red plastic card

Table 1

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal extraction devices

Fecal extraction devices described below are not delivered with the kit and either of them has to be ordered with the kit.

Extraction Devices	Quantity	Code
CALEX® Cap Device	50, 200 or 500 tubes filled with 5 mL extraction buffer / ready to use	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 tubes consisting of spatulas and base caps	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip. Filled with 1.3 mL extraction buffer / ready to use	B-CAL-SO50

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-100 µL, 100-1000 µL and 250-2500 µL
- Centrifuge
- 5 mL polypropylene or polystyrene tubes for dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Soft tissues or blotting paper

PRECAUTIONS

Safety precautions

- The 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.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- Reagents: Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation can occur.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

Technical precautions

Kit components

- All reagents and test samples must be equilibrated to room temperature (18-28 °C) before starting the test.
- Components must not be used after the expiration date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Test cassettes cannot be re-used.

Test procedure

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL high range test (CHR_0 or CHR_900) before starting the test (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the red RFID chip card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device.
- If not used directly, diluted samples should be stored at 2-8 °C and should be used within twelve hours.
- With BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube. The extracts can be stored directly in the CALEX® Cap Device. For re-use/ re-measurement of the extracts see step 2 under the chapter assay procedure.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

If the extraction devices are used, less than 1 g of native stool specimen is needed for the extraction procedure.

Stool specimens should be collected into plain tubes.

Important: The specimen must be collected without any chemical or biological additions in the collection device.

Specimen transport

Stool specimens should be received by the laboratory within 3 days of collection. The specimens may be transported at room temperature (23 °C).

Specimen storage

Received stool specimens should be stored at 2-8 °C and extracted within 3 days.

Extract storage

Calprotectin in extracts obtained by the CALEX® Cap Device is stable at room temperature (18-28 °C) for 3 days, at 2-8 °C for 6 days and at -20 °C for 18 months.

Calprotectin in extracts obtained by manual weighing method, by BÜHLMANN Smart-Prep or by ScheBo® Quick-Prep™ is stable at 2-8 °C for 6 days or at -20 °C for 18 months.

ASSAY PROCEDURE

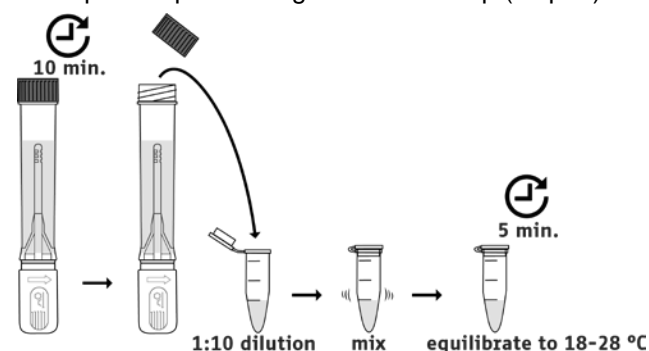
The assay procedure consists of three steps:

1. Extraction of stool samples

The extraction is described in the instruction for use delivered with the respective extraction devices.

2. Sample processing

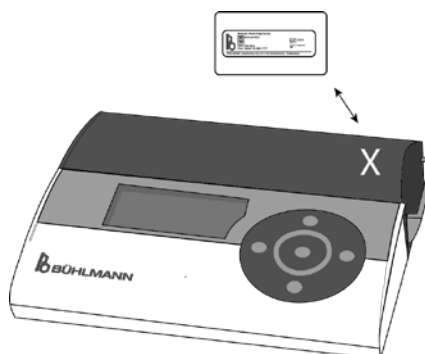
- Smart Prep or ScheBo® Quick Prep™: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes. Dilute the supernatant 1:100 with extraction buffer (e.g. 20 µL extract and 1980 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step. 3).
- CALEX® Cap Device: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down. Unscrew the blue cap and dilute the supernatant 1:10 with extraction buffer (e.g. 50 µL extract and 450 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step. 3).



3. Lateral flow assay procedure and readout

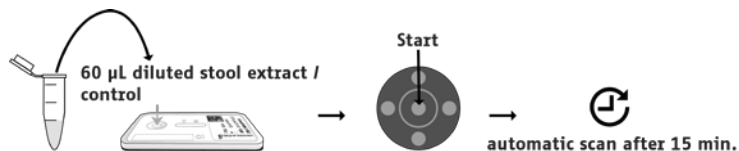
There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CHR_900> and <CHR_0>. Select one of these methods before starting the experiments.

Load the lot specific parameters from the red RFID chip card.



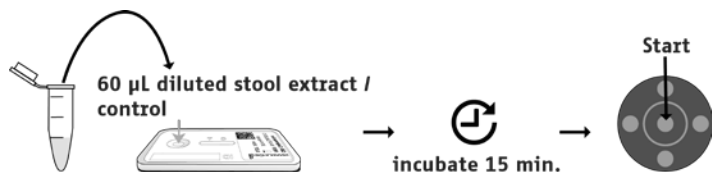
3.1 Method <CHR_900> with internal timer

- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Close the cassette holder and start the measurement by pressing the start button.
- The scan starts automatically after 15 minutes (900 seconds).
- For low / high controls: Repeat step 3.1 using 60 µL of control instead of diluted stool extract.



3.2 Method <CHR_0> without internal timer

- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Incubate for 15 minutes ± 1 minute (set a timer manually).
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Scan the cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start button immediately.
- For low / high controls: Repeat step 3.2 using 60 µL of control instead of diluted stool extract.



Remark: Please refer to the Quantum Blue® Reader Manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Quantum Blue® Reader, especially how to select test methods, and how to load lot specific parameters from the RFID chip card in order to get the samples measured.

QUALITY CONTROL

- If the performance of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature and the timing ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.
- Result of the self-test of the Quantum Blue® Reader performed at startup of the instrument has to be valid.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1A), the concentration of calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test

Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1B), the calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.

- If only the Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1C), the test result is invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1D), the test result is invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the Test (T) and Control (C) Lines, an additional validity check of the Control Line (C) is undertaken. If the signal intensity of the Control Line (C) is below a threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.

STANDARDIZATION

- The Quantum Blue® fCAL high range is standardized against the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL).
- The Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the calprotectin concentration. This lot-specific standard curve is generated with the mean values ($n \geq 20$ measurements each) from 13 calibration points obtained from different stool samples with known calprotectin concentrations. The test range is between 100 and 1800 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 1800 µg/g can be further diluted 1:10 with extraction buffer and assayed again according to the procedure. The resulting dilution factor must be multiplied by the measured concentration to obtain the final results.
- For quantitative measurements, unknown samples reading below 100 µg/g can be re-tested in the Quantum Blue® fCAL (order codes: LF-CAL25).

LIMITATIONS

- Reagents delivered with the Quantum Blue® fCAL high range kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values are intended as an aid to diagnosis in distinguishing organic disease from functional disease and as an aid to IBD monitoring. Results should always be interpreted in combination with other clinical and laboratory findings.
- 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. 21-22).
- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevated fecal calprotectin levels.

INTERPRETATION OF RESULTS

DISTINGUISHING ORGANIC DISEASE FROM FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISEASE

Determination of fecal calprotectin levels can be used as a reliable and simple aid in distinguishing organic from functional gastrointestinal diseases (ref. 1-7).

The following data were established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). In a clinical study, fecal calprotectin values of 344 symptomatic patients were compared with endoscopic findings. Endoscopy examination showed 264 patients with functional diseases, whereas 80 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulceration, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases) (ref. 5).

ROC curve analysis (AUC: 0.962) resulted in an optimal clinical cut-off at 50 µg/g for the differentiation between organic and functional diseases, with a clinical sensitivity and specificity of 88.8 % and 93.6 %, respectively (refer to table 3). Fecal calprotectin levels from adults and children are comparable, whereas levels of newborns can be significantly increased (ref. 8).

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Values below 100 µg/g:

Calprotectin values below 100 µg/g are indicative of either non-inflammatory situation or mild inflammation in the gut. Further investigations and retesting the sample with EK-CAL or LF-CAL25 can be taken into consideration.

Elevated values between 100 and 200 µg/g:

Calprotectin values between 100 and 200 µg/g can represent mild organic disease such as inflammation caused by NSAIDs, mild diverticulitis and IBD in remission phase. The low inflammatory response shown within this range may suggest repeating the measurement and performing further investigations.

Elevated values above 200 µg/g:

Calprotectin values above 200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested.

INTERPRETATION OF RESULTS

IBD MONITORING

The determination of fecal calprotectin is also a reliable and simple way to assist the monitoring of IBD patients (ref. 10-20).

Correlation of calprotectin levels and the inflammatory status of patient's intestinal mucosa, according to endoscopic evaluations, were determined in three independent studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 4). 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 5).

Condensed knowledge of published cut-offs and the above clinical performance studies support the following result categories:

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. 10-20).

Values between 100-300 µg/g:

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

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. 10-20).

The above result categories are recommendations. It is advised that healthcare practitioners establish individual patient thresholds by determining the patient's baseline calprotectin level during disease remission.

A false negative result that is a calprotectin result below 100 µg/g category that should show a value above 300 µg/g, for a patient with endoscopic inflammation, although unlikely, may delay appropriate clinical decisions and patient treatment. Therefore, it is important that the patient remains under the care of a healthcare practitioner and reports any clinical symptoms.

Studies have shown that high calprotectin levels, above 300 µg/g, will not always indicate development of a clinical relapse (ref. 10-20). High calprotectin levels should be treated as a red flag signal and repeated. Confirmation of raised levels should prompt further investigative procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Method comparison

Bias at clinical decision point (200 µg/g): -1.6 % (95 % confidence interval: -12.0 to 15.2)

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. 103 clinical samples were measured according to the instruction for use with the Quantum Blue® fCAL high range test and with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. Measurements were performed over three days using two Quantum Blue® fCAL high range test cassette lots. The correlation data is illustrated in figure 2.

Repeatability: 20.0-22.7 % CV

Within-laboratory precision: 22.4-28.1 % CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to CLSI guideline EP05-A3. Five extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 180 and 1224 µg/g, were evaluated by one operator over 20 days, in two independent runs per day with two replicates per run. The test results are summarized in table 6.

Reproducibility: 19.2-28.9 % CV

Reproducibility was established according to CLSI guideline EP05-A3 by performing measurements on three different Quantum Blue® Reader instruments with three different test cassette lots. Five extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 202 and 1328 µg/g, were tested over 5 days, in one run with five replicates per run. Each Quantum Blue® Reader instrument was operated by a different operator on three different sites. The results are summarized in table 7.

Limit of Blank (LoB): 60 µg/g calprotectin

The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four stool samples diluted to a target concentration below 10 µg/g calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 blank values. The study was performed on two different test cassette lots. The LoB was evaluated by using non-parametric analysis.

Limit of Detection (LoD): 100 µg/g calprotectin

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with five clinical samples with concentrations of 59, 70, 82, 117 and 148 µg/g calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 75 values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoD was calculated using parametric analysis.

Limit of Quantification (LoQ): 100 µg/g calprotectin

The LoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with six clinical samples with reference concentrations of 59, 70, 82, 117, 148 and 166 µg/g calprotectin established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 90 values. The study was performed with two different test cassette lots. The relative total error was calculated using the RMS model from precision and bias estimates for each sample. The relative total error values were log transformed and plotted against the reference calprotectin concentration of the samples. The LoQ was defined as the intersection of the linear regression model obtained for the plot and the acceptance criterion of 30 % relative total error. The results are summarized in table 8.

Linear range: 67-2153 µg/g calprotectin

The linear range of the Quantum Blue® fCAL high range test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Two sample pools, low and high, were blended to obtain 17 concentration levels covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in 10 replicates on two test cassette lots. The linear range was defined as the interval of concentration levels in which coefficients of the second and third order fits were determined as not significant. Results for one test cassette lot are shown in figure 3.

Dilution linearity: 1:10-1:100

A clinical sample with an estimated concentration of 18 000 µg/g calprotectin was diluted in extraction buffer to obtain target concentrations of 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 and 1700 µg/g calprotectin. The samples were further diluted 1:10 to obtain calprotectin concentrations covering the measuring range of the assay. The dilutions were measured in five replicates in the Quantum Blue® fCAL high range test on two test cassette lots. The linearity of the obtained dilutions was assessed according to CLSI guideline EP6-A. Where coefficients of second or third order fits were determined to be significant, a maximum deviation from linearity of 20 % was allowed, with no deviation above 10 % observed. Results for one test cassette lot are shown in figure 4.

High Dose Hook Effect

A high dose hook effect was not observed for samples with calprotectin concentrations of up to 18 931 µg/g.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range ist ein *in-vitro*-diagnostischer Test für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben als Hilfsmittel bei der Einschätzung von Entzündungen der Darmschleimhaut. Die Testresultate können als Diagnose-Hilfsmittel verwendet werden zur Unterscheidung zwischen organisch-, entzündlichen Magen-Darm-Trakt Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (CD) oder Colitis ulcerosa (UC) und einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (Ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (Ref. 8-9). Der Quantum Blue® fCAL high range Test dient auch als Hilfsmittel bei der Überwachung von CEDs (Ref. 10-20).

Nur zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal geeignet.*

*Canada, Taiwan: Nur für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

Das Testprinzip beruht auf der selektiven Messung von Calprotectin mittels eines Sandwich Immunassays. Ein monoklonaler Fangantikörper (mAk), der hoch spezifisch für Calprotectin ist, wird auf eine Testmembran gebunden. Ein zweiter monoklonaler Nachweisantikörper, welcher mit Goldkolloiden konjugiert ist, wird auf dem „Conjugate Release Pad“ aufgebracht. Nach der Zugabe der extrahierten und verdünnten Stuhlprobe wird er in das Reaktions-System freigesetzt. Der Calprotectin/Anti-Calprotectin-Goldkonjugat Komplex bindet an den auf der Membran gebundenen Anti-Calprotectin-Antikörper Testbande (T). Das verbleibende nicht gebundene Anti-Calprotectin-Goldkonjugat wird von einem Ziege-Anti-Maus Antikörper gebunden, welcher ebenfalls auf die Membran auf der Kontrollbande (C) gebunden wurde. Die Signalintensität der Testbande (T) und der Kontrollbande (C) wird durch den Quantum Blue® Reader quantifiziert.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Testkassette	25 Stück	B-CAL-TC	Vakuumdicht in einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen, 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	B-CHR-RCC	Rote Chipkarte

Tabelle 1

* Die Kontrollen enthalten lotspezifische Konzentrationen von nativem, humanem Calprotectin. Die genauen Konzentrationen werden auf dem QC Datenblatt angegeben.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Sämtliche Kitkomponenten sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum haltbar.

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTlich

Stuhlextraktionsprodukte

Extraktionsröhrchen werden zur Stuhlextraktion benötigt, aber nicht mitgeliefert und müssen zusätzlich zum Kit bestellt werden.

Extraktionsprodukte	Menge	Produkt Code
CALEX® Cap	50, 200 oder 500 Röhrchen gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer / gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 Röhrchen bestehend aus Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, gefüllt mit 1,3 mL Extraktionspuffer / gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Tabelle 2

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-100 µL, 100-1000 µL und 250-2500 µL
- Zentrifuge
- 5 mL Polypropylen oder Polystyrol Einwegröhrchen zur Durchführung von Extraktverdünnung
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Papiertücher und Fliesspapier

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Die Kontrollen 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.
- Alle Patientenproben sollten gemäß Gute Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Reagenzien: 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 auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kit Komponenten

- Sämtliche Reagenzien und Proben müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18-28 °C) gebracht werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht die Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Die Testkassetten dürfen nicht wiederverwendet werden.

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Quantum Blue® fCAL high range (CHR_0 bzw. CHR_900) muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die rote RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemässe Handhabungen der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen befindliche Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Wenn die verdünnten Proben nicht direkt verwendet werden, sollten sie bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von zwölf Stunden verwendet werden.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden. Beim CALEX® Cap Device können die Extrakte direkt im Extraktionsröhrchen gelagert werden. Zur Weiterverwendung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Arbeitsanleitung.

GEWINNUNG UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Wenn Extraktionsröhrchen für die Extraktion verwendet werden, wird weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden.

Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit Röhrchen, die chemische oder biologische Zusätze enthalten, gesammelt werden.

Transport der Proben

Innerhalb von 3 Tagen nach Gewinnung des Untersuchungsmaterials sollte es vom Labor erhalten werden. Die Proben können bei Raumtemperatur transportiert werden (23 °C).

Lagerung der Proben

Erhaltene Stuhlproben sollten bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen extrahiert werden.

Lagerung des Extraktes

Calprotectin in Extrakten, die mit den CALEX® Cap Device gewonnen wurden, sind bei Raumtemperatur (18-28 °C) 3 Tage, bei 2-8 °C für 6 Tage und bei -20 °C für 18 Monate stabil.

Calprotectin in Extrakten, die mit manuellen Wiegemethoden, wie BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™, gewonnen wurden, ist bei 2-8 °C für 6 Tage oder bei -20 °C für 18 Monate stabil.

TESTDURCHFÜHRUNG

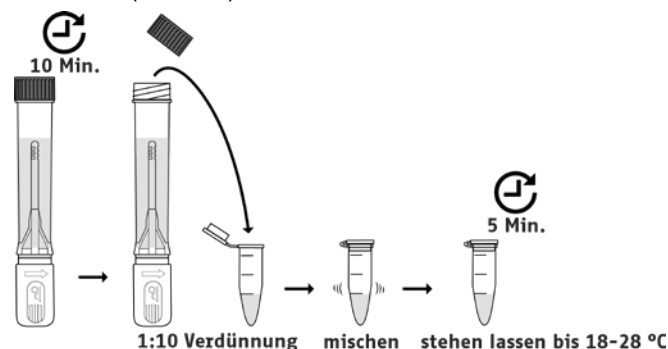
Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritte:

1. Extraktion der Stuhlproben:

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchen beschrieben.

2. Verarbeitung des Extraktes:

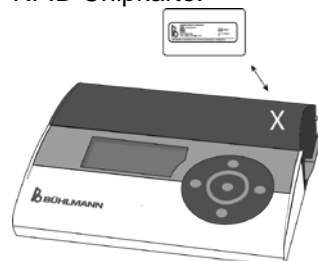
- Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Der Überstand mit Extraktionspuffer 1:100 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 1980 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für 5 Minuten bei 18-28 °C equilibrieren lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (3).
- CALEX® Cap: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten mit dem weissen Verschluss nach unten sedimentieren lassen. Aufschrauben der blaue Kappe um die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:10 (z.B. 50 µL Extrakt + 450 µL Extraktionspuffer) zu verdünnen. Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C equilibrieren lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (Punkt 3).



3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung:

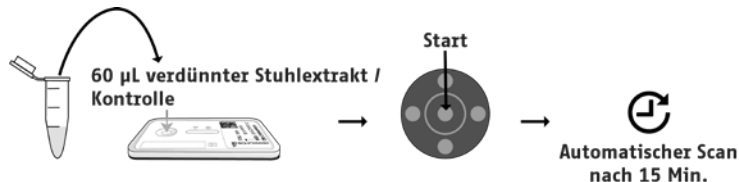
Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CHR_900> und <CHR_0>. Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Test starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der roten RFID Chipkarte.



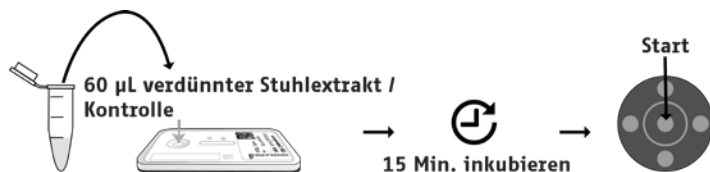
3.1 Methode <CHR_900> mit internem Zeitmesser

- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® Readers laden.
- 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probeauftragsstelle der Kassette aufbringen.
- Den Kassettenhalter schliessen und den Startknopf drücken.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 15 Minuten (900 Sek.).
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



3.2 Methode <CHR_0> ohne internen Zeitmesser

- 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probeauftragsstelle der Testkassette aufbringen.
- Die Testkassette für 15 ± 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® Readers laden.
- Lesevorgang durch sofortiges Drücken auf den Startknopf starten.
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie die den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



Hinweis: Nehmen Sie das Quantum Blue® Reader Manual zu Hilfe, wenn Sie mehr über die Basisfunktionen (Inbetriebnahme und Bedienung) erfahren wollen, insbesondere wie Testmethoden ausgewählt werden und wie lotspezifische Parameter von der RFID Chipkarte geladen werden, um die Proben messen zu können.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Tests nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und Zeitmessung, ii) Haltbarkeitsdatum der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubationsbedingungen.
- Der Selbsttest, der beim Einschalten des Quantum Blue® Readers durchgeführt wird, muss gültig sein.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Abbildungen 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 15 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Abbildung 1A), bedeutet dies, dass die Calprotectinkonzentration im Stuhl nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach 15 Minuten Inkubation nachweisbar ist (Abbildung 1B), wird die Calprotectinkonzentration in der Stuhlprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation von 15 Minuten nur die Testbande (T) sichtbar ist (Abbildung 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation von 15 Minuten nachweisbar sind (Abbildung 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Testbande (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG

- Der Quantum Blue® fCAL high range wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL® ELISA standardisiert (Art.-Nr.: EK-CAL).
- Der Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectinkonzentration eine Lot-abhängige Standardkurve. Diese Standardkurve wird über den Median ($n \geq 20$ Messungen) von 13 Kalibrationspunkten und unterschiedlichen Stuhlproben mit einer bekannten Calprotectinkonzentration berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 100 und 1800 µg/g.
- Für die quantitative Bestimmung von Proben mit Konzentrationen von über 1800 µg/g kann zusätzliche eine 1:10 Verdünnung mit Extraktionspuffer hergestellt werden. Der Gesamt-Verdünnungsfaktor muss mit dem Testergebnis multipliziert werden.
- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, können Proben unter 100 µg/g mit dem Quantum Blue® fCAL (Bestellcode: LF-CAL25) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in dem Quantum Blue® fCAL high range Kit gelieferten Reagenzien sind nur zur Bestimmung der Calprotectinkonzentration in menschlichen Stuhlproben bestimmt.
- Fäkale Calprotectinwerte sind als Hilfe bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen Erkrankung von einer funktionellen Erkrankung und zur IBD-

Überwachung vorgesehen. Die Interpretation der Resultate sollte stets in Kombination mit anderen klinischen Ergebnissen und Laborergebnissen erfolgen.

- Um bei der IBD-Überwachung die beste diagnostische Genauigkeit zu erzielen, einen klinischen Rückfall vorherzusehen, wurde empfohlen mehrere Messungen des Stuhlcalprotectins in bis zu 4 Wochen Intervallen durchzuführen (Ref. 21-22).
- Patienten, die regelmässig NSAIDs einnehmen, könnten erhöhte Calprotectinwerte aufweisen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

UNTERSCHIEDEN 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. 1-7).

Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA erhoben (Bestellcode: EK-CAL). In einer klinischen Studie wurden die Calprotectinwerte von 344 symptomatischen Patienten mit den Ergebnissen einer endoskopischen Untersuchung verglichen.

Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 264 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 80 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen) (Ref. 5).

Die ROC Analyse (AUC: 0,962) ergab einen optimalen klinischen Grenzwert von 50 µg/g für die Differenzierung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen mit einer klinischen Spezifität von 88,8 % und einer Sensitivität von 93,6 % (Tabelle 3). Calprotectinwerte von Erwachsenen und Kindern sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 8).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Werte unter 100 µg/g:

Calprotectinwerte unter 100 µg/g deuten entweder auf eine nicht entzündliche Erkrankung oder eine milde Entzündung des Darms hin. Weitere Untersuchungen und erneutes Testen der Probe mit EK-CAL oder LF-CAL können berücksichtigt werden.

Erhöhte Werte zwischen 100 und 200 µg/g:

Calprotectinwerte zwischen 100 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Die geringe Entzündungsaktivität innerhalb dieses Bereiches, empfiehlt eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectinwerte oberhalb von 200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung mit Entzündung des gastrointestinalen Trakts hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch einen Gastroenterologen werden empfohlen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

IBD-ÜBERWACHUNG

Die Bestimmung von fäkalem Calprotectin ist auch eine zuverlässige und einfache Methode, um die Überwachung von IBD-Patienten zu unterstützen (Ref. 10-20).

Die Korrelation der Calprotectinkonzentrationen und dem Entzündungsstatus der Darmschleimhaut von Patienten mit endoskopischen Bewertungen wurde in drei voneinander unabhängigen Studien mit den BÜHLMANN Calprotectintests (Tabelle 4) ermittelt.

Der diagnostische Wert von Calprotectin zur Vorhersage einer klinischen Remission und eines Rückfalls anhand von Symptomen des Patienten, Anzeichen einer klinischen Wirksamkeit, anhand eines ungeplanten Bedarfs einer Therapieeskalation, eine Krankenseinweisung oder anhand von Notfällen wurden in drei Studien mit den BÜHLMANN Calprotectintests (Tabelle 5) ermittelt.

Verdichtete Kenntnisse der publizierten Grenzwerte und die oben genannten klinischen Leistungsstudien, unterstützen die folgenden Ergebniskategorien:

Werte unterhalb von 100 µg/g:

Fäkale Calprotectinkonzentrationen unter 100 µg/g machen zuverlässig auf Patienten aufmerksam, die sich in der endoskopischen Remission befinden und bei denen die invasiven endoskopischen Untersuchungen vermieden werden können, da ein geringes Risiko eines klinischen Rückfalls besteht (Ref. 10-20).

Werte zwischen 100-300 µg/g:

Fäkale Calprotectinkonzentrationen zwischen 100 und 300 µg/g können auf den Bedarf einer engmaschigeren Kontrolle in den folgenden Perioden hinweisen, um Entwicklungstendenzen der Krankheit beurteilen zu können.

Werte oberhalb von 300 µg/g:

Messungen von fäkalen Calprotectinkonzentrationen oberhalb von 300 µg/g sollten wiederholt werden. Falls die erhöhten Werte bestätigt werden, sollten unverzüglich weitere Untersuchungen erfolgen (Ref. 10-20).

Die oben genannten Ergebniskategorien sind als Empfehlungen zu betrachten. Es wird empfohlen, dass der jeweilige Arzt die Grenzwerte für den einzelnen Patienten festlegen, indem Sie den Ausgangswert für Calprotectin während der Remission bestimmen.

Ein falsch-negatives Resultat bei Patienten mit einer endoskopisch nachweisbaren Entzündung, das ein Calprotectinergebnis in der Kategorie mit Werten unter 100 µg/g anzeigt, aber einen Wert oberhalb von 300 µg/g zeigen sollte, kann - obwohl unwahrscheinlich - geeignete klinische Entscheidungen und die Behandlung des Patienten verzögern. Daher ist es wichtig, dass der Patient weiterhin von einem Arzt betreut wird und mögliche klinische Symptome meldet.

Studien haben gezeigt, dass hohe Calprotectinwerte, oberhalb von 300 µg/g, nicht immer auf die Entwicklung eines klinischen Rückfalls hindeuten (Ref. 10-20). Hohe Calprotectinwerte müssen als Warnsignal betrachtet und die Messung muss wiederholt werden. Bei einer Bestätigung erhöhter Werte sind unverzüglich weitere Untersuchungen vorzunehmen.

LEISTUNGSMERKMALE

Methodenvergleich:

Bias am klinischen Entscheidungspunkt (200 µg/g): -1,6 % (95 % Konfidenz Intervall: -12,0-15,2)

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. 103 klinische Proben wurden mit dem Quantum Blue® fCAL high range und dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Test gemäss der Gebrauchsanweisung evaluiert. Messungen wurden über drei Tage auf zwei verschiedenen Quantum Blue® fCAL high range Testkassetten-Lots durchgeführt. Die Korrelationsdaten sind in der Abbildung 2 illustriert.

Wiederholbarkeit: 20,0-22,7 % CV

Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 22,4-28,1 % CV

Die Wiederholbarkeit und die Präzision innerhalb des Labors wurden gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 durchgeführt. Fünf extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 180 und 1224 µg/g, wurden über 20 Tage in zwei unabhängigen Testläufen mit zwei Replikaten pro Testlauf durchgeführt. Die Resultate sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit: 19,2-28,9 % CV

Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde auf drei verschiedenen Quantum Blue® Reader Instrumenten mit drei verschiedenen Testkassetten-Lots gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 bestimmt. Fünf extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 202 und 1328 µg/g, wurden über 5 Tage in einem Testlauf mit fünf Replikaten pro Testlauf durchgeführt. Jeder Quantum Blue® Reader wurde von je einem Operateur an drei verschiedenen Standorten bedient. Die Resultate sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Die Leerwert-Obergrenze (LoB): 60 µg/g Calprotectin

Der LoB-Wert wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier Stuhlproben, die verdünnt wurden um eine Zielkonzentration unter 10 µg/g Calprotectin zu erhalten, durchgeführt. Um 60 Blankwerte zu erhalten, wurden die Stuhlproben über drei Tage in drei unabhängigen Testläufen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer non-parametrischen Analyse wurde der LoB berechnet.

Nachweisgrenze (LoD): 100 µg/g Calprotectin

Der LoD wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit fünf Proben mit Konzentrationen von 59, 70, 82, 117 und 148 µg/g Calprotectin bestimmt. Um 75 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Testläufen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer parametrischen Analyse wurde der LoD berechnet.

Quantifizierungsgrenze (LoQ): 100 µg/g Calprotectin

Der LoQ wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP 17-A2 mit sechs klinischen Proben mit Konzentrationen von 59, 70, 82, 117, 148 und 166 µg/g Calprotectin evaluiert auf dem BÜHLMANN fCAL® ELISA, bestimmt. Um 90 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Testläufen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Unter Verwendung des RMS-Modells, das aus den Präzisions- und Abweichungsschätzungen für jede Probe hervorging, wurde der relative Gesamtfehler berechnet. Die Werte des relativen Gesamtfehlers wurden logarithmisch transformiert und gegen die Referenz Calprotectinkonzentration der Proben aufgetragen. Der LoQ wurde als der Schnittpunkt des linearen Regressionsmodells definiert, das für den Plot und das Akzeptanzkriterium von 30 % relativen Gesamtfehlers erhalten wurde. Resultate, die mit einem Testkassetten-Lot gemessen wurden, sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Linearer Bereich: 67-2153 µg/g Calprotectin

Der lineare Bereich des Quantum Blue® fCAL high range Tests wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP06-A durchgeführt. Um mindestens 17 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und höher sind, wurden zwei Probenpools, niedrig und hoch, gemischt. Die Mischungen wurden mit jeweils 10 Replikaten auf zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Der lineare Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen Koeffizienten der zweiten und dritten Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. Resultate für ein Testkassetten-Lot sind in Abbildung 3 abgebildet.

Verdünnungslinearität: 1:10-1:100

Eine klinische Probe mit einer geschätzten Konzentration von 18 000 µg/g Calprotectin wurde in Extraktionspuffer verdünnt, um Zielkonzentrationen von 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 und 1700 µg/g Calprotectin zu erhalten. Die Proben wurden weiter 1:10 verdünnt, um Calprotectinkonzentration zu erhalten, die den erwarteten Messbereich des Tests abdecken. Die Verdünnungen wurden mit jeweils fünf Replikaten auf dem Quantum Blue® fCAL high range Test mit zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Die Linearität der erhaltenen Verdünnungen wurde nach der CLSI-Richtlinie EP6-A bestimmt. Wurden Koeffizienten der zweiten oder dritten Ordnung als signifikant deklariert, wurde eine maximale Abweichung von der Linearität von 20 % erlaubt, wobei keine Abweichung über 10 % beobachtet wurde. Resultate für ein Testkassetten Lot sind in Abbildung 4 abgebildet.

High-Dose-Hook Effekt

Bis zu einer Konzentration von 18 931 µg/g Calprotectin wurde kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet.

UTILISATION PREVUE

Le test BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range est un test diagnostique *in vitro* de dosage quantitatif de la calprotectine dans les échantillons de selles humaines, conçu pour aider à évaluer l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale. Les résultats du test peuvent contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer – chez les patients de plus de quatre ans (réf. 8-9) souffrant de douleurs abdominales chroniques – une maladie inflammatoire du tractus gastro-intestinal de type organique (maladie inflammatoire chronique de l'intestin MICI, par ex. maladie de Crohn ou recto-colite hémorragique, RCH) (réf. 1-7) d'une maladie fonctionnelle (syndrome de l'intestin irritable, SII) et, d'autre part, à la surveillance d'une MICI (réf. 10-20).

Uniquement pour utilisation professionnelle*.

*Canada, Taiwan : Utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'antigène de la calprotectine par un dosage immunologique de type sandwich. Un anticorps monoclonal de capture (mAb) hautement spécifique de la calprotectine est déposé sur la membrane test. Un second anticorps monoclonal, conjugué à de l'or colloïdal permettant la détection, est présent sur la bande de libération du conjugué. Il est libéré dans le système après ajout de l'échantillon de selle extrait et dilué. Le conjugué calprotectine/anti-calprotectine-or se lie à l'anticorps anti-calprotectine déposé sur la membrane test (ligne test) et le restant du conjugué anti-calprotectine-or qui n'a pas réagi se lie à l'anticorps de chèvre anti-souris déposé sur la membrane test (ligne contrôle). Les intensités de signal de la ligne de test et de la ligne de contrôle sont mesurées quantitativement par le Quantum Blue® Reader.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cassette test	25 pièces	B-CAL-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon d'extraction	1 flacon 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons, 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CHR-RCC	Carte en plastique rouge

Tableau 1

*Les concentrations en calprotectine humaine native des contrôles varient en fonction des lots. Vous référer à la fiche de contrôle qualité pour les concentrations effectives.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les composants du kit sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

Dispositifs d'extraction de selles

Les tubes d'extraction de selles décrits ci-après ne sont pas inclus dans le kit. Ils peuvent être commandés en même temps que le kit.

Dispositifs d'extraction	Quantité	Code
CALEX® Cap Device	50, 200 ou 500 dispositifs pré-remplis avec 5 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 tubes, comprenant chacun spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes comprenant chacun cône & embout du doseur, pré-remplis avec 1,3 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CAL-SO50

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à pointes jetables : 10-100 µL, 100-1000 µL et 250-2500 µL
- Centrifugeuse
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène de 5 mL pour la préparation des dilutions d'échantillons
- Minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Papier absorbant

PRECAUTIONS

Précautions de sécurité

- Les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), en prenant les précautions appropriées.
- Les échantillons des patients doivent être manipulés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- **Réactifs** : Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau pour éviter tout risque d'irritation.
- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

Précautions techniques

Composants du kit

- Tous les réactifs et échantillons à tester doivent être équilibrés à température ambiante (18-28 °C) avant de commencer l'essai.
- Les constituants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Les cassettes test sont à usage unique.

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le dosage de la Quantum Blue® fCAL high range (CHR_0 ou CHR_900) avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID rouge pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Si elle n'est pas utilisée directement, les échantillons dilués doivent être conservés à 2-8 °C et doivent être utilisés dans douze heures.
- Il est important de centrifuger les extraits avec BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ avant de les conserver, 5 min à 3000 x g. Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation. Avec les tubes CALEX® Cap, les extraits peuvent être stockés directement dans le dispositif d'extraction. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l'étape 2 dans le chapitre procédure de dosage.

RELEVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

La mise en œuvre de la procédure nécessite moins que 1 g d'échantillon natif de selles pour chaque extraction.

Les échantillons de selles doivent être recueillis dans des tubes lisses.

Important: Les échantillons doivent être prélevés sans aucune addition chimique ou biologique.

Transport des échantillons

Les échantillons de selles doivent être réceptionnés au laboratoire jusqu'à 3 jours après leur recueil. Le transport peut être réalisé à température ambiante (23 °C).

Conservation des échantillons

Les échantillons de selles réceptionnés doivent être conservés entre 2 et 8 °C et extraits dans les 3 jours.

Conservation des extraits

La calprotectine présente dans les extraits obtenus à l'aide du dispositif d'extraction CALEX® Cap Device est stable à température ambiante (18-28 °C) pendant 3 jours, entre 2 et 8 °C pendant 6 jours ou à -20 °C pendant 18 mois.

La calprotectine présente dans les extraits obtenus par méthode de pesée ou à l'aide des dispositifs d'extraction BÜHLMANN Smart-Prep ou Schebo® Quick-Prep™, est stable entre 2 et 8 °C pendant 6 jours ou à -20 °C pendant 18 mois.

PROCEDURE DE DOSAGE

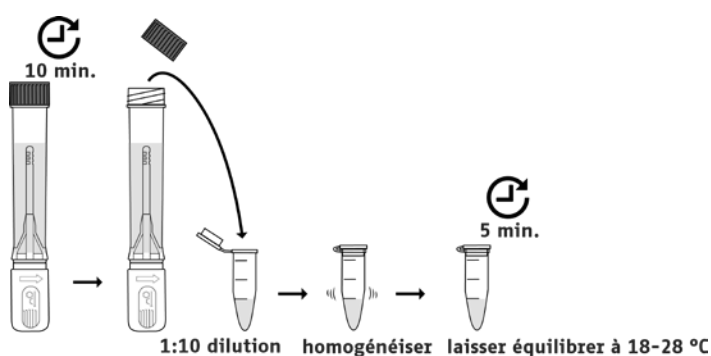
La procédure de dosage se déroule en 3 étapes :

1. Extraction des échantillons de selles :

La procédure d'extraction est décrite dans le manuel d'utilisation fourni avec les tubes d'extraction respectifs.

2. Préparation des extraits :

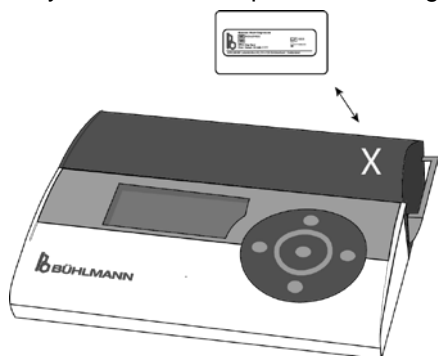
- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : après extraction, laisser les extraits sédimenter pendant 10 minutes. Diluer l'extrait au 1/100ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 20 µL d'extrait et 1980 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons équilibrer pendant 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).
- Tube d'extraction CALEX® Cap : après extraction, laisser sédimenter les extraits pendant 10 minutes, embout blanc vers le bas. Dévissez le bouchon bleu et diluer l'extrait au 1/10ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 50 µL d'extrait et 450 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons équilibrer pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).



3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat :

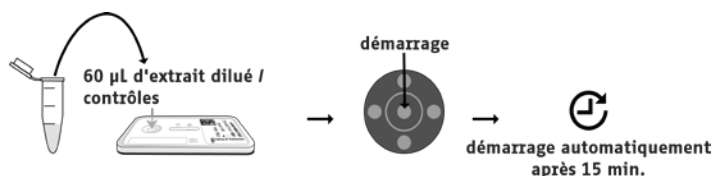
Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective <CHR_900> et <CHR_0>. Sélectionner l'une des méthodes avant de procéder au test.

Charger les paramètres spécifiques au lot de réactif au moyen de la carte à puce RFID rouge.



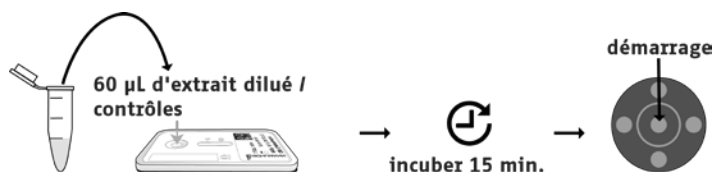
3.1. Méthode <CHR_900> avec minuteur interne

- Déposer la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Ajouter 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Fermer le tiroir et lancer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 15 minutes (900 seconds).
- Pour les Contrôles bas / élevé : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.



3.2. Méthode <CHR_0> sans minuteur interne

- Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incuber pendant 15 ± 1 minutes en démarrant un minuteur manuellement.
- Charger la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette en appuyant sur le bouton de démarrage du lecteur Quantum Blue® Reader.
- Pour les Contrôles bas / élevé : Répéter l'étape 3.2 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.



Remarque : Consulter le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader pour plus de détails concernant les fonctions de base, l'initialisation et l'utilisation du lecteur, en particulier comment choisir la méthode de test et charger les paramètres de lot de la carte à puce RFID en vue de mesurer des échantillons.

CONTROLE DE QUALITE

- Si la performance du dosage n'est pas corrélée avec les limites établies et que la répétition exclut toute erreur technique, veuillez vérifier les paramètres suivants : i) pipetage, contrôle de la température et du temps, ii) date d'expiration des réactifs et iii) conditions de conservation et d'incubation.
- L'auto-vérification effectuée lors de la mise en marche du lecteur Quantum Blue® Reader doit être valide.

VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir figures 1A et 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable de calprotectine n'est présente dans l'échantillon de selle. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1B), la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon de selle est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 15 minutes de temps d'incubation (figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 15 minutes de temps d'incubation (figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil au bout de 15 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

STANDARDISATION

- Le dosage de Quantum Blue® fCAL high range est standardisé contre le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe est générée avec les valeurs moyennes ($n \geq 20$ mesures à chaque fois) provenant de 13 points de calibrage et d'échantillons de selles différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de mesure se situe entre 100 et 1'800 $\mu\text{g/g}$.
- Pour des mesures quantitatives, la lecture d'échantillons inconnus au-dessus de 1800 $\mu\text{g/g}$ pourrait s'accompagner d'une dilution 1/10 supplémentaire avec le tampon d'extraction et le dosage devrait être effectué à nouveau selon la procédure. Le facteur de dilution résultant doit être pris en compte pour les calculs finaux.
- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs inférieures à 100 $\mu\text{g/g}$ peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage Quantum Blue® fCAL (code de commande respectifs: LF-CAL25).

LIMITES

- Réactifs fournis avec le kit Quantum Blue® fCAL high range sont destinés à la détermination des niveaux de calprotectine dans les échantillons de selles humaines seulement.
- Les dosages de la calprotectine fécale visent à contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer une maladie organique d'une maladie fonctionnelle et, d'autre part, au suivi d'une MICI. Les résultats devraient toujours être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire.
- Pour le suivi d'une MICI, il a été suggéré que de multiples dosages de la calprotectine fécale, effectués à des intervalles allant jusqu'à 4 semaines, permettent une meilleure exactitude diagnostique pour anticiper une rechute clinique chez les patients (réf. 21-22).
- Les patients prenant régulièrement des AINS peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés.

INTERPRETATION DES RESULTATS

DISTINGUER UNE MALADIE ORGANIQUE D'UNE MALADIE GASTRO-INTESTINALE FONCTIONNELLE

La détermination des taux de calprotectine fécale peut aider de manière simple et fiable dans la distinction entre les maladies gastro-intestinales organiques et fonctionnelles (réf. 1-7).

Les données suivantes ont été établies au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA (réf. de commande : EK-CAL). Au cours d'une étude clinique, les taux de calprotectine fécale de 344 patients symptomatiques ont été comparés aux résultats des investigations endoscopiques.

L'examen endoscopique a montré que 264 patients présentent des maladies fonctionnelles alors que 80 patients présentent des maladies organiques diverses (colites, maladie de Crohn, ulcères, diverticules, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses) (réf. 5).

L'analyse de la courbe ROC (AUC : 0,962) a conclu à un seuil optimal clinique de 50 $\mu\text{g/g}$ pour la différenciation entre les maladies fonctionnelles et organiques, avec une sensibilité et une spécificité cliniques de 88,8 % et 93,6 % respectivement (voir tableau 3).

La concentration de calprotectine dans les selles est comparable chez les adultes et les enfants, tandis qu'elle peut augmenter de façon significative chez les nouveau-nés (réf. 8).

Ces données confortent les recommandations suivantes pour l'interprétation des résultats :

Valeurs inférieures à 100 $\mu\text{g/g}$:

Les valeurs de calprotectine inférieures à 100 $\mu\text{g/g}$ indiquent soit une situation non inflammatoire, soit une inflammation de l'intestin. Des examens complémentaires, ainsi que des mesures complémentaires à l'aide des références EK-CAL ou LF-CAL25 pourraient être prises en considération.

Valeurs élevées entre 100 et 200 $\mu\text{g/g}$:

Des valeurs de calprotectine entre 100 et 200 $\mu\text{g/g}$ peuvent avoir pour origine une maladie organique telle qu'une inflammation causée par les AINS, une diverticulite non sévère ou un syndrome de l'intestin irritable en phase de rémission. En présence d'une inflammation de faible intensité il est recommandé de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200 $\mu\text{g/g}$:

Les valeurs de calprotectine dépassant 200 $\mu\text{g/g}$ indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires sous le suivi de médecins spécialistes.

INTERPRETATION DES RESULTATS

SUIVI D'UNE MICI

La détermination du taux de calprotectine fécale est aussi un moyen fiable et simple pour faciliter le suivi des patients atteints d'une MICI (réf. 10-20).

La corrélation des taux de calprotectine avec l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale du patient, évaluée par endoscopie, a été déterminée dans trois études indépendantes ayant utilisé les essais BÜHLMANN de dosage de la calprotectine (tableau 4). La valeur diagnostique du taux de calprotectine dans la prédiction d'une rémission ou d'une rechute clinique, en fonction des symptômes des patients, des indices d'activité clinique, du besoin non planifié d'une augmentation de la dose thérapeutique, de l'hospitalisation ou de l'urgence, a été déterminée dans trois études ayant utilisé les essais BÜHLMANN de dosage de la calprotectine (tableau 5).

La synthèse de l'ensemble des valeurs-seuils publiées et des études de performance clinique susmentionnées permet d'établir les catégories de résultats suivantes :

Valeurs inférieures à 100 µg/g :

Des concentrations de calprotectine fécale inférieures à 100 µg/g peuvent indiquer de façon fiable des patients à faible risque de rechute clinique, en rémission endoscopique et chez lesquels des procédures endoscopiques invasives peuvent être évitées (réf. 10-20).

Valeurs entre 100 et 300 µg/g :

Des concentrations en calprotectine fécale comprises entre 100 et 300 µg/g peuvent indiquer la nécessité d'un contrôle plus étroit au cours de la période suivante avec pour objectif l'évaluation des tendances évolutives de la maladie.

Valeurs supérieures à 300 µg/g :

Des concentrations en calprotectine fécale dépassant 300 µg/g doivent conduire à la répétition du test et, si les valeurs élevées se confirment, à la réalisation d'investigations supplémentaires (réf. 10-20).

Les catégories de résultats ci-dessus sont des recommandations. Il est conseillé aux praticiens médicaux d'établir des seuils individuels propres au patient à partir de la détermination, lors d'une période de rémission de la maladie, de sa propre concentration de base en calprotectine.

Un résultat faux-négatif, à savoir une valeur de calprotectine dans la catégorie moins de 100 µg/g alors qu'il devrait dépasser 300 µg/g, dans le cas d'un patient montrant une inflammation endoscopique, bien que cela soit peu probable, risque de retarder des décisions cliniques et un traitement appropriés du patient. Par conséquent, il importe que le patient reste sous la surveillance d'un médecin et l'informe de tout symptôme clinique.

Des études ont montré que des concentrations élevées en calprotectine, supérieures à 300 µg/g, ne traduisent pas systématiquement la survenue d'une rechute clinique (réf. 10-20). Des taux élevés de calprotectine doivent être considérés comme un signal d'alerte et conduire à une répétition du test. La confirmation de taux élevés doit inciter à la réalisation d'investigations supplémentaires.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Comparaison de méthodes :

Biais au point de décision clinique (200 µg/g) : -1,6 % (intervalle de confiance à 95 % : -12,0 – 15,2)

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. 103 échantillons cliniques ont été mesurés conformément aux instructions d'utilisation au moyen des tests BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range et BÜHLMANN fCAL® ELISA. Les mesures ont été réalisées pendant trois jours avec deux lots de cassettes tests Quantum Blue® fCAL high range. Les données de corrélation sont illustrées sur la figure 2.

Répétabilité : 20,0 – 22,7 % CV

Précision intra-laboratoire : 22,4 – 28,1 % CV

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Cinq échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 180 et 1224 µg/g ont été testés par un opérateur quotidiennement pendant 20 jours, dans deux dosages indépendants chaque jour, à raison de deux répétitions par dosage. Le Tableau 6 rassemble les résultats de tests ainsi obtenus.

Reproductibilité : 19,2 – 28,9 % CV

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Pour ce faire, des mesures ont été réalisées sur trois instruments Quantum Blue® Reader différents à l'aide de trois lots de cassettes test différents. Cinq échantillons d'extraits de selles, présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 202 et 1328 µg/g, ont été testés pendant 5 jours, à raison d'un dosage quotidien répété cinq fois chaque jour. Chacun des lecteurs Quantum Blue® Reader a été utilisé par un opérateur différent, dans trois sites différents. Le tableau 7 rassemble les résultats obtenus.

Limite de blanc (LoB) : 60 µg/g calprotectine

La LoB a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de quatre échantillons de selles dilués à une concentration cible de calprotectine inférieure à 10 µg/g. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq répliques chaque jour permettant d'obtenir 60 valeurs de blanc. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. La LoB a été calculé avec un test non paramétrique.

Limite de détection (LoD) : 100 µg/g calprotectine

La LoD a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de cinq échantillons cliniques dont les concentrations de calprotectine étaient de 59, 70, 82, 117 et 148 µg/g. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq répliques chaque jour permettant d'obtenir 75 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. La LoD a été calculée avec une analyse paramétrique.

Limite de quantification (LoQ) 100 µg/g calprotectine

La LoQ a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de six échantillons cliniques dont les concentrations de référence en calprotectine, mesurées au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA, étaient de 59, 70, 82, 117, 148 et 166 µg/g. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 90 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. L'erreur relative totale a été calculée à l'aide du modèle de la moyenne quadratique à partir d'estimations d'erreur de précision et de biais pour chaque échantillon. Les valeurs d'erreur relative totale ont été transformées en log et portées graphiquement en fonction de la concentration de référence en calprotectine des échantillons. La LoQ a été déterminée par la valeur correspondant à l'intersection de la droite d'ajustement obtenue par régression linéaire avec le niveau d'erreur relative totale de 30 % défini comme critère d'acceptation. Le tableau 8 rassemble les résultats obtenus.

Plage de linéarité : 67 – 2153 µg/g calprotectine

Le domaine linéaire du test Quantum Blue® fCAL et Quantum Blue® fCAL high range a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A. Deux groupes d'échantillons, de niveau haut et bas, ont été regroupés de manière à obtenir au moins 17 niveaux de concentration couvrant et excédant la gamme de mesure attendue. Les mélanges ont été testés sous forme de 10 répétitions d'échantillons, en deux analyses indépendantes réalisées avec deux lots de cassettes tests. Le domaine linéaire a été définie comme l'intervalle des concentrations dont les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres étaient déterminés comme non significatifs. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la figure 3.

Linéarité de dilution : 1:10 – 1:100

Un échantillon clinique dont la concentration de calprotectine était estimée à 18 000 µg/g a été dilué dans la solution tampon d'extraction pour donner des concentrations cibles en calprotectine de 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 et 1700 µg/g. Les échantillons ont été encore dilués au 1:10, ce qui a permis d'obtenir des concentrations finales en calprotectine couvrant la plage de mesure de l'essai. Ils ont alors été mesurés en cinq réplicas au moyen du test Quantum Blue® fCAL high range pratiqué sur deux lots de cassettes tests différents. La linéarité des dilutions obtenues a été évaluée selon la ligne directrice CLSI EP6-A. Dans les cas où les coefficients des ajustements de courbe des deuxième ou troisième ordres étaient déterminés comme significatifs, un taux de déviation de linéarité de 20 % maximum était autorisé, aucune déviation supérieure à 10 % n'étant observée. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la figure 4.

Effet crochet à forte dose

Aucun effet crochet à haute dose n'a été observé pour les échantillons dont les concentrations de calprotectine allaient jusqu'à 18 931 µg/g.

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina umana nei campioni di feci impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto per la diagnosi nel distinguere delle malattie infiammatorie organico del tratto gastrointestinale (malattia infiammatoria intestinale, MII (IBD) (rif. 1-7), ad'esempio morbo di Crohn o colite ulcerosa, CU), malattie funzionali (sindrome dell'intestino irritabile, SII (IBS)), in pazienti con dolore addominale cronico di età superiore ai Quattro anni (rif. 8-9). Inoltre contribuisce al monitoraggio dello stato della malattia IBD (rif. 10-20).

Solo per uso professionale*.

*Canada, Taiwan: Solo per uso nel laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione quantitativa dell'antigene calprotectina mediante un immunodosaggio a sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura (mAb) molto specifico per la calprotectina riveste la membrana di rilevazione. Un secondo anticorpo monoclonale di rilevazione, coniugato a oro colloidale e deposto sul supporto di rilascio del coniugato, è rilasciato nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione e della banda di controllo sono misurate quantitativamente con il Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Cassetta di rilevazione	25 unità	B-CAL-TC	Sigillata a vuoto in busta laminata
Tampone di estrazione	1 flacone 125 mL	B-CAL-EX	Pronto per l'uso
Controlli (alto/basso)*	2 flaconi, 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Pronto all'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-CHR-RCC	Carta RFID rossa

Tabella 1

*I controlli contengono quantità lotto specifiche di calprotectina umana. Per le concentrazioni effettive far riferimento al foglio aggiuntivo QC.

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di estrazione delle feci

I dispositivi di estrazione delle feci descritte di seguito non sono forniti nel kit e occorre ordinare l'uno o l'altro insieme al kit.

Dispositivi di estrazione	Quantità	Codice
CALEX® Cap Device	50, 200 o 500 dispositivi contenenti 5 mL di tampone di estrazione / pronto all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 dispositivi, costituiti da spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore, contenenti 1,3 mL di tampone di estrazione / pronto all' uso	B-CAL-SO50

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-100 µL, 100-1000 µL e 250-2500 µL
- Centrifuga
- Provette in polipropilene o polistirene di 5 mL per la diluizione degli estratti
- Timer (facoltativo)
- Quantum Blue® Reader fornito da BÜHLMANN (codice: BI-POCTR-ABS)
- Salviette o carta da blotting

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

- I Controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio (BLP) utilizzando le dovute precauzioni.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone prassi di laboratorio (BPL).
- **Reagenti:** Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbe verificarsi irritazione.
- La soluzione inutilizzata va smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18-28 °C) prima di iniziare l'analisi.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Le cassette di rilevazione non vanno riutilizzate.

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, gestiti o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il dosaggio della Quantum Blue® fCAL high range (CHR_0 o CHR_900) prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID rossa per modificare i parametri di test specifici del lotto. I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- Se non viene utilizzato direttamente, i campioni diluiti devono essere conservati a 2-8 °C e devono essere utilizzati entro dodici ore.
- È importante che gli estratti con BÜHLMANN Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta. Con il dispositivo CALEX® Cap è possibile conservare gli estratti direttamente con il dispositivo. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo procedura del test.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Se si utilizzano i dispositivi di estrazione, è necessario meno di 1 g di feci originali per la procedura di estrazione.

I campioni di feci devono essere raccolti in provette semplici.

Attenzione: Il campione deve essere raccolto senza alcun additivo chimico o biologico presente nel dispositivo.

Trasporto campioni

I campioni di feci devono essere ricevuti dal laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni possono essere trasportati a temperatura ambientale (23 °C).

Conservazione dei campioni

I campioni di feci ricevuti devono essere conservati a 2-8 °C ed estratti entro 3 giorni.

Conservazione degli estratti

Calprotectina in estratti ottenuti con CALEX® Cap Device è stabile a temperatura ambiente (18-28 °C) per 3 giorni, a 2-8 °C per 6 giorni e a -20 °C per 18 mesi.

Calprotectina in estratti ottenuti con metodo di pesatura manuale, con il BÜHLMANN Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ è stabile a 2-8 °C per 6 giorni e a -20 °C per 18 mesi.

PROCEDURA DEL TEST

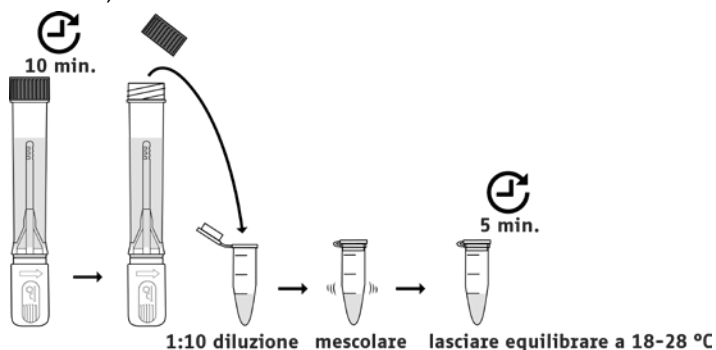
La procedura si compone di tre fasi distinte:

1. Estrazione dei campioni di feci:

L'estrazione è descritta nelle istruzioni per l'uso fornite con i rispettivi sistemi di estrazione.

2. Trattamento del campione:

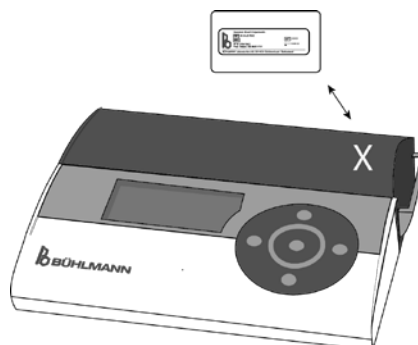
- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:100 con il tampone di estrazione (es. 20 µL di estratto e il 1980 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti con l'estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu e diluire il surnatante 1:10 con il tampone di estrazione (es. 50 µL di estratto e il 450 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).



3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:

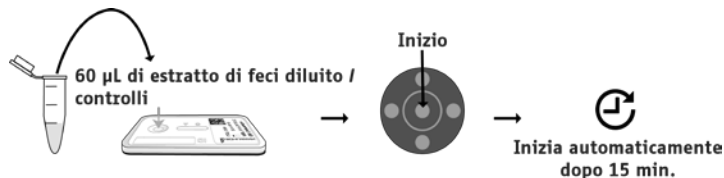
Esistono due metodi alternativi disponibili sul Quantum Blue® Reader: <CHR_900> e <CHR_0>. Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno dei metodi prima del test.

Caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID rossa.



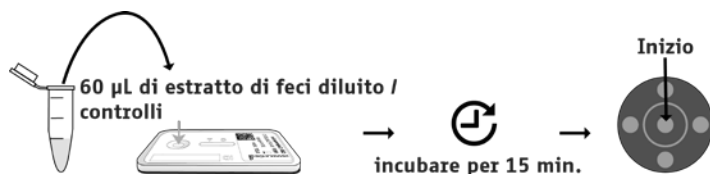
3.1 Metodo <CHR_900> con timer interno

- Caricare la cassetta sul supporto per cassetta del Quantum Blue® Reader. Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.
- Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 15 minuti (900 secondi).
- Per i controlli basso/ alto: Ripetere il punto 3.1 utilizzando 60 µL di controllo, invece dell'estratto di feci diluito.



3.2 Metodo <CHR_0> senza timer interno

- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.
- Incubare per 15 minuti ± 1 minuto (impostare un timer manuale).
- Caricare la cassetta sul supporto per cassetta test del Quantum Blue® Reader.
- Scansionare la cassetta con il Quantum Blue® Reader premendo il pulsante immediatamente.
- Per i controlli basso/ alto: Ripetere il punto 3.2 utilizzando 60 µL di controllo, invece dell'estratto di feci diluito.



Importante: Consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il Quantum Blue® Reader, in particolare per informazioni sulla selezione dei metodi di analisi e su come caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID in modo da poter quantificare i campioni.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la prestazione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori tecnici, si controllino gli aspetti seguenti: i) dispositivi di pipettaggio, controllo della temperatura e temporizzazione, ii) data di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.
- Il self-test, che viene eseguito quando si accende il Quantum Blue® Reader, deve essere valido.

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la banda di controllo (C) deve in ogni caso essere visibile (vedere figure 1A e 1B). Tale banda rappresenta unicamente un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la banda di rilevazione (T). Se la banda di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1A), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci è al di sotto del limite di rilevazione. Se la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1B), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 15 minuti d'incubazione, il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

STANDARDIZZAZIONE

- Il saggio Quantum Blue® fCAL high range è stato standardizzato utilizzando come riferimento il saggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL).
- Il Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione di calprotectina. La curva standard lotto specifica viene generata con i valori medi ($n \geq 20$ misurazioni ciascuna) da 13 punti di taratura ottenuti da diversi campioni fecali con concentrazioni note di calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 100 e 1800 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazione superiore a 1800 µg/g possono essere ulteriormente diluiti 1:10 con tampone di estrazione ed analizzati nuovamente. Il fattore di diluizione risultante deve essere moltiplicato per la concentrazione misurata per ottenerne il risultato finale.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni inferiori a 100 µg/g possono essere rianalizzati con il saggio Quantum Blue® fCAL (codice: LF-CAL25).

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL high range sono destinati alla determinazione dei livelli di calprotectina solo in campioni di feci umane. I valori di calprotectina fecale sono intesi come supporto per la diagnosi nel distinguere malattie organiche da malattie funzionali e come supporto per il monitoraggio di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). I risultati devono essere sempre interpretati in abbinamento ad altri esami clinici e di laboratorio.
- Per il monitoraggio delle MICI si consiglia di eseguire più misure di calprotectina fecale ad intervalli di 4 settimane, al fine di ottenere la migliore accuratezza diagnostica per la previsione di recidive cliniche nei pazienti (rif. 21-22). I pazienti che assumono regolarmente FANS possono avere un aumento nei loro livelli della calprotectina fecale.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La determinazione delle concentrazioni di calprotectina fecale può essere utilizzata come un aiuto affidabile e semplice per distinguere tra patologie gastrointestinali organiche e funzionali (rif. 1-7).

I seguenti dati sono stati stabiliti usando il dispositivo BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice ordine EK-CAL). Uno studio clinico ha confrontato i valori di calprotectina fecale di 344 pazienti sintomatici con i relativi risultati endoscopici. L'esame endoscopico ha mostrato 264 pazienti con malattie gastrointestinali funzionali, mentre 80 pazienti con varie malattie organiche (colite, Crohn's, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, cancro o malattie infettive) (rif. 5).

L'analisi della curva ROC (AUC: 0,962) ha evidenziato un valore soglia clinico ottimale a 50 µg/g per la differenziazione tra patologie gastrointestinali organiche e funzionali, con una sensibilità clinica e specificità rispettivamente del 88,8 % e del 93,6 % (vedi tabella 3).

La concentrazione di calprotectina nelle feci è comparabile in adulti e bambini, mentre nei neonati può essere significativamente più elevata (rif. 8).

Questi dati supportano le seguenti raccomandazioni per l'interpretazione dei risultati:

Valori inferiori a 100 µg/g:

Valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g sono indicativi di nessuna infiammazione o debole infiammazione intestinale: qualora i sintomi persistano considerare la possibilità di procedere con ulteriori investigazioni o di prendere in considerazione di ripetere il test con EK-CAL o LF-CAL.

Valori tra 100 µg/g e 200 µg/g:

I valori di calprotectina compresi tra i 100 e i 200 µg/g possono indicare malattia di lieve entità, una infiammazione causata da FANS, una debole diverticolite e una IBD in fase di remissione. La bassa risposta infiammatoria mostrata in questo intervallo può suggerire di ripetere la misurazione e di eseguire ulteriori indagini.

Valori superiore a 200 µg/g:

Valori di calprotectina superiori a 200 µg/g sono indicativi di attiva malattia organica con infiammazione nel tratto gastrointestinale. Sono suggerite appropriate ulteriori procedure investigative eseguite da specialisti.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

MONITORAGGIO DI MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (MICI)

La determinazione delle concentrazioni di calprotectina fecale costituisce inoltre un metodo semplice e affidabile di support al monitoraggio dei pazienti affetti da MICI (rif. 10-20).

Tre studi indipendenti hanno determinato una correlazione tra i livelli di calprotectina misurati usando i test BÜHLMANN e le condizioni d'infiammazione della mucosa intestinale dei pazienti, rilevate tramite esami endoscopici (tabella 4). In tre studi in cui è stato usato il test calprotectina BÜHLMANN è stato determinato il valore diagnostico della calprotectina nella previsione di remissioni e recidive cliniche in relazione a sintomi del paziente, indici clinici di attività, necessità non programmata di incremento terapeutico, ospedalizzazione o procedure di emergenza, (tabella 5).

Le conoscenze consolidate dei valori di cut-off pubblicati e gli studi di cui sopra sulle prestazioni cliniche supportano le seguenti categorie di risultati:

Valori inferiori a 100 µg/g:

Livelli di calprotectina fecale inferiori a 100 µg/g indicano in maniera affidabile pazienti a basso rischio di recidiva clinica in remissione endoscopica, per i quali è possibile evitare procedure endoscopiche invasive (rif. 10-20).

Valori compresi tra 100 e 300 µg/g:

Livelli di calprotectina fecale compresi tra 100 e 300 µg/g indicano la necessità di esami più rigorosi nel periodo immediatamente successivo volti a valutare le tendenze di sviluppo della malattia.

Valori superiori a 300 µg/g:

In caso di livelli di calprotectina fecale superiori a 300 µg/g è necessario ripetere i test e, qualora i livelli fossero confermati, predisporre ulteriori procedure di analisi (rif. 10-20).

Le categorie di cui sopra sono fornite a livello indicativo. Si consiglia di stabilire valori di soglia individuali per ciascun paziente definiti dal professionista sanitario responsabile, determinati in base al livello di riferimento di calprotectina del paziente misurato in fase di remissione.

Eventuali risultati falsi negativi, ovvero risultati di calprotectina inferiori a 100 µg/g in pazienti con infiammazione endoscopica, che invece dovrebbero avere livelli di calprotectina superiore a 300 µg/g, e sebbene improbabili, possono ritardare adeguate decisioni cliniche e trattamenti. È pertanto importante mantenere il paziente sotto la cura di un professionista sanitario e segnalare qualsiasi sintomo clinico.

Alcuni studi hanno dimostrato che elevati livelli di calprotectina oltre 300 µg/g non indicano sempre lo sviluppo di una recidiva clinica (rif. 10-20). Livelli elevati di calprotectina devono sempre essere considerati come segnale di allarme e in tal caso le misure devono essere ripetute. A seguito di conferma di un incremento dei livelli è necessario predisporre ulteriori procedure di analisi.

PERFORMANCE CARATTERISTICA

Confronto del metodo

Distorsione al punto di decisione clinica (200 µg/g): -1,6 % (intervallo di confidenza al 95 %: -12,0-15,2)

Lo studio di confronto del metodo è stato condotto in base alla norma CLSI EP09-A3. 103 campioni clinici sono stati misurati secondo le istruzioni per l'uso con il test Quantum Blue® fCAL high range e con il test BÜHLMANN fCAL® ELISA. Le misurazioni sono state effettuate in un periodo di tre giorni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. I dati di correlazione sono illustrati in figura 2.

Ripetibilità: 20,0–22,7 % CV

Precisione interna del laboratorio: 22,4–28,1 % CV

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate in base alla norma CLSI EP05-A3. Cinque campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 180 e 1224 µg/g sono stati analizzati da un operatore in un periodo di 20 giorni, in due esecuzioni indipendenti al giorno con due ripetizioni per esecuzione. I risultati del test sono riportati in tabella 6.

Riproducibilità: 19,2–28,9 % CV

La riproducibilità è stata determinata in base alla norma CLSI EP05-A3 effettuando misurazioni su tre strumenti Quantum Blue® Reader diversi con tre lotti diversi di cassette del test. Cinque campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 202 e 1328 µg/g sono stati analizzati in un periodo di 5 giorni, in un'esecuzione unica con cinque ripetizioni per esecuzione. Ogni strumento Quantum Blue® Reader è stato adoperato da un operatore diverso presso tre sedi diverse. I risultati sono riportati in tabella 7.

Limite del bianco (LoB): 60 µg/g di calprotectina

Il LoB è stato determinato in base alla norma CLSI EP17-A2 su quattro campioni fecali diluiti a una concentrazione target di calprotectina inferiore a 10 µg/g. I campioni sono stati misurati in un periodo di tre giorni in cinque ripetizioni al giorno ottenendo 60 valori del bianco. Lo studio è stato condotto su due lotti diversi di cassette del test. Il LoB è stato valutato usando una analisi non parametrica.

Limite di rilevabilità (LoD): 100 µg/g di calprotectina

Il LoD è stato determinato in base alla norma CLSI EP17-A2 su cinque campioni clinici con concentrazioni di calprotectina di 59, 70, 82, 117 e 148 µg/g. I campioni sono stati misurati in un periodo di tre giorni in cinque ripetizioni ogni giorno, ottenendo 75 valori. Lo studio è stato condotto con due lotti diversi di cassette del test. Il LoD è stato calcolato mediante analisi parametrica.

Limite di quantificazione (LoQ): 100 µg/g di calprotectina

Il LoQ è stato determinato in base alla norma CLSI EP17-A2 su sei campioni clinici con concentrazioni di riferimento

di calprotectina di 59, 70, 82, 117, 148 e 166 µg/g, stabilite con il test BÜHLMANN fCAL® ELISA. I campioni sono stati misurati in un periodo di tre giorni in cinque ripetizioni ogni giorno, ottenendo 90 valori. Lo studio è stato condotto con due lotti diversi di cassette del test. L'errore relativo totale è stato calcolato usando il modello RMS dalle stime di precisione e distorsione di ciascuna campione. I valori dell'errore relativo totale sono stati trasformati logaritmicamente e diagrammati contro la concentrazione di riferimento di calprotectina dei campioni.

Il LoQ è stato definito come l'intersezione del modello di regressione lineare ottenuto per il grafico e il criterio di accettazione del 30 % di errore relativo totale. I risultati sono riportati in tabella 8.

Intervallo lineare: 67–2153 µg/g di calprotectina

L'intervallo lineare del test Quantum Blue® fCAL high range è stato determinato in base alla norma CLSI EP06-A. Due gruppi di campioni, a concentrazione bassa e alta, sono stati mescolati per ottenere 17 livelli di concentrazione che rientravano e superavano l'intervallo di misurazione previsto. Le miscele sono state analizzate in 10 ripetizioni con due lotti di cassette del test. L'intervallo lineare è stato definito come l'intervallo dei livelli di concentrazione nei quali coefficienti dell'adattamento di secondo e terzo ordine sono stati ritenuti non significativi. I risultati per una cassetta del test sono illustrati in figura 3.

Linearità della diluizione: 1:10–1:100

Un campione clinico con concentrazione stimata di calprotectina di 18000 µg/g è stato diluito con tampone di estrazione per ottenere concentrazioni accurati di calprotectina di 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 e 1700 µg/g. I campioni sono stati ulteriormente diluiti 1:10 per ottenere concentrazioni di calprotectina che coprissero l'intervallo di misurazione del dosaggio. Le diluizioni sono state misurate in cinque ripetizioni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. La linearità delle diluizioni ottenute è stata valutata in base alla norma CLSI EP6-A. Quando i coefficienti dell'adattamento di secondo o terzo ordine sono stati ritenuti significativi, è stata consentita una deviazione massima dalla linearità del 20 %, senza osservare deviazioni superiori al 10 %. I risultati di un lotto di cassette del test sono illustrati in figura 4.

Effetto gancio ad alte dosi

Non è stato osservato un effetto gancio ad alte dosi per campioni con concentrazioni di calprotectina fino a 18 931 µg/g.

INDICACIONES DE USO

El BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas a fin de facilitar la valoración de una inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo se pueden utilizar para facilitar el diagnóstico, permitiendo distinguir una enfermedad inflamatoria orgánica del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, por ejemplo la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa) (ref. 1-7) de una enfermedad funcional (síndrome del intestino irritable, SII), en pacientes con dolor abdominal crónico mayores de cuatro años (ref. 8-9), y como ayuda para el control de la EII (ref. 10-20).

Sólo para uso profesional*.

*Canada, Taiwan: Solo para uso en el laboratorio.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El análisis permite la determinación selectiva del antígeno calprotectina mediante inmunoanálisis tipo sándwich. La membrana de análisis lleva un recubrimiento de un anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para calprotectina. Un segundo anticuerpo de detección monoclonal, conjugado con coloides de oro, se deposita en la almohadilla de liberación del conjugado y se libera en el sistema de reacción tras la adición de la muestra de suero diluida. El conjugado de calprotectina / anticálprotectina oro se une al anticuerpo anti-calprotectina recubierto en la membrana de prueba (Línea de Test, T) y el conjugado oro anti-calprotectina libre restante se une al anticuerpo anti-ratón de cabra recubierto en la membrana de prueba (Línea de control, C) . Las intensidades de señal de la línea de prueba y la línea de control se miden cuantitativamente mediante el Quantum Blue® Reader.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Casetes de prueba	25 unidades	B-CAL-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de extracción	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Controles (alto/bajo)*	2 viales, 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CHR-RCC	Tarjeta de plástico roja

Tabla 1

*Los controles contienen cantidades específicas de lote de calprotectina humana nativa. Véase la hoja de datos de QC adicional para las concentraciones reales.

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del equipo permanecen estables a una temperatura entre 2 y 8 °C, hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

Los dispositivos de extracción fecal que se describen a continuación no se incluyen en el kit y el que se elija debe ser pedido con el kit.

Dispositivos de extracción	Cantidad	Código
CALEX® Cap Device	50, 200 o 500 dispositivos, contienen 5 mL tampón de extracción / listos para usar	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 tubos que consisten en espátulas y tapas de base	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción constan de tubo, cono y punta de dosificación contienen 1,3 mL de tampón de extracción / listos para usar.	B-CAL-SO50

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Vórtex para la extracción de heces
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 µL, 100-1000 µL y 250-2500 µL
- Centrífuga
- Tubos de 5 mL desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de la dilución de los extractos Cronómetro (optativo)
- Quantum Blue® Reader disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS)
- Pañuelos suaves o papel secante

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque ha dado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tomando las precauciones adecuadas.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) tomando las precauciones apropiadas.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con agua abundante; de lo contrario, se puede producir irritación.

- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

Precauciones técnicas

Componentes del kit

- Deje que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18-28 °C) antes de ser utilizados.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Los casetes de prueba no deben ser reutilizados.

Procedimiento de análisis

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El Quantum Blue® Reader debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de Quantum Blue® fCAL high range (CHR_0 o CHR_900) antes de iniciar el análisis (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- Utilizar la tarjeta roja con chip RFID para cambiar los parámetros de prueba específicos de lote.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción.
- Si no se usa directamente, las muestras diluidas deben almacenarse a 2-8 °C y deben usarse dentro de las doce horas siguientes.
- Con BÜHLMANN Smart Prep y ScheBo® Quick-Prep™, es importante centrifugar los extractos antes del almacenamiento. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3000 x g. Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo. Con el dispositivo CALEX® Cap puede almacenar los extractos directamente en el dispositivo. Para la reutilización / nueva medición de los extractos ver el paso 2 en el capítulo procedimiento del análisis.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Si se usan los dispositivos de extracción, se necesita menos de 1 g de muestra de heces nativa para el procedimiento de extracción.

Las muestras de heces se deberán recoger en tubos lisos.

Importante: la muestra debe ser recolectada sin adiciones químicas o biológicas en el dispositivo de recolección.

Transporte de muestras

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces durante los 3 días posteriores a su recogida. Las muestras podrán transportarse a temperatura ambiente (23 °C).

Almacenamiento de muestras

Las muestras de heces recibidas deberán ser almacenadas entre 2-8 °C y extraídas en el transcurso de los siguientes 3 días.

Almacenamiento de extractos

Calprotectina en extractos obtenidos por CALEX® Cap Device es estable a temperatura ambiente (18-28 °C) durante 3 días, a 2-8 °C durante 6 días y a -20 °C durante 18 meses.

Calprotectina en extractos obtenidos por método de pesaje manual, por BÜHLMANN Smart-Prep o por ScheBo® Quick-Prep™ es estable a 2-8 °C durante 6 días o a -20 °C durante 18 meses.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

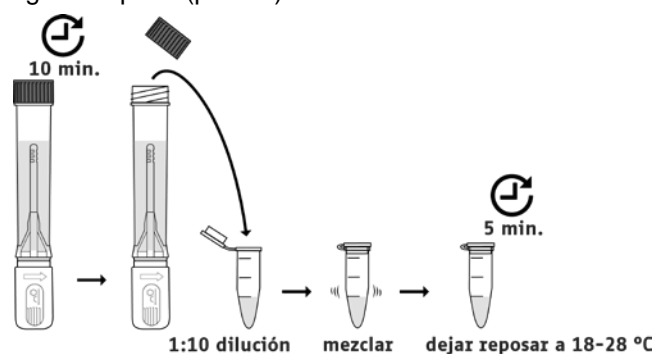
El procedimiento del ensayo consiste en tres pasos:

1. Extracción de las muestras de heces:

La extracción se describe en las instrucciones de uso entregadas con los respectivos dispositivos de extracción.

2. Procesamiento de las muestras:

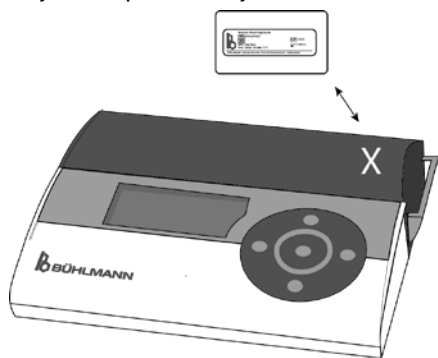
- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Después de la extracción, deje que el extracto de materia fecal se asiente durante 10 minutos. Se diluye el sobrenadante 1:100 con tampón de extracción (por ejemplo, 20 µl de extracto y 1980 µl de tampón de extracción) y se mezcla bien. Dejar reposar las muestras diluidas 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Después de la extracción, dejar que el extracto de heces repose durante 10 minutos con el tapón blanco del dispositivo hacia abajo. Desenrosque el tapón de color azul y diluir el sobrenadante 1:10 con tampón de extracción (e.g. 50 µL extracto y 450 µL tampón de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el siguiente paso (paso 3).



3. Procedimiento de ensayo de flujo lateral y lectura de los resultados:

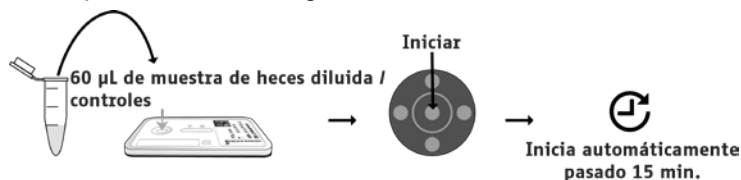
En el Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CHR_900> y <CHR_0>. Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

Cargue los parámetros específicos del lote desde la tarjeta chip RFID roja.



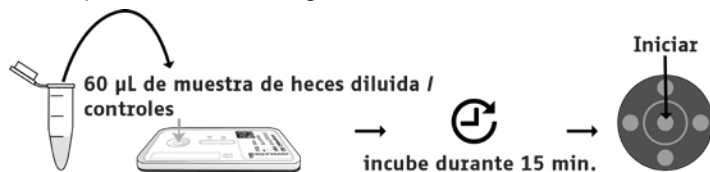
3.1. Método <CHR_900> con cronómetro interno

- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Agregue 60 µL de extracto de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El escaneo se inicia automáticamente pasados 15 minutos (900 segundos).
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.1 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.



3.2 Método <CHR_0> sin cronómetro interno

- Agregue 60 µL de extracto de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 15 minutos ± 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Cargue el casete de prueba en el soporte del casete de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Inicie el escaneo del casete con el Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio inmediatamente.
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.



Observación: Consulte el manual del Quantum Blue® Reader para conocer sus funciones básicas y saber cómo ponerlo en marcha y manejarlo, especialmente cómo seleccionar métodos de prueba y cómo cargar los parámetros específicos del lote desde la tarjeta de chip RFID para obtener las muestras medidas.

CONTROL DE CALIDAD

- Si el rendimiento del análisis no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye los errores en la técnica, compruebe los siguientes puntos: i) pipeteado, la temperatura y tiempo; ii) fechas de caducidad de los reactivos, y iii) condiciones de conservación e incubación.
- La autocomprobación (calibration check) del dispositivo Quantum Blue® Reader que se realiza tras encender el lector tiene que ser válida.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para la obtención de un resultado válido de la prueba, la línea control (C) debe ser visible en cualquier caso (véanse las figuras 1A y 1B). Se usa sólo como control funcional de la prueba y no puede usarse para la interpretación de la línea de test (T). Si la línea de test (T) no es detectable después de 15 minutos de incubación (figura 1A), no hay cantidades detectables de calprotectina presentes en la muestra de heces. Si la línea de test (T) es detectable después de 15 minutos de incubación (figura 1B), la cantidad de calprotectina presente en la muestra de heces se calcula mediante el Quantum Blue® Reader.
- Si sólo la línea de test (T) es detectable después de 15 minutos de tiempo de incubación (figura 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis con Quantum Blue® fCAL high range debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Si ni la línea control (C) ni la línea de test (T) se detectan después de 15 minutos de tiempo de incubación (figura 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis con Quantum Blue® fCAL high range debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Como el Quantum Blue® Reader permite la evaluación cuantitativa de las líneas de test (T) y control (C), se realiza una validación adicional de la validez de la línea control (C). Si la intensidad de la línea control (C) es inferior a un umbral después de 15 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis con Quantum Blue® fCAL high range debe repetirse con un casete de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN

- Quantum Blue® fCAL high range está estandarizado con el BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL).
- El Quantum Blue® Reader utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. Esta curva de calibración específica del lote se genera con los valores medios ($n \geq 20$ mediciones cada uno) de 13 puntos de calibración obtenidos de diferentes muestras de heces con concentraciones conocidas de calprotectina. El rango de ensayo es entre 100 y 1800 µg/g.

- Para mediciones cuantitativas, las muestras desconocidas con lecturas por encima de 1800 µg/g puede diluirse adicionalmente 1:10 con tampón de extracción y ensayarse de nuevo. El factor de dilución resultante se debe multiplicar por la concentración medida para obtener los resultados finales.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por debajo de 100 µg/g pueden repetirse con el ensayo Quantum Blue® fCAL (código orden: LF-CAL25).

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit de Quantum Blue® fCAL high range están destinados a la determinación de los niveles de calprotectina en sólo muestras de heces humanas.
- Los valores de calprotectina fecal son una ayuda para facilitar el diagnóstico distinguiendo entre enfermedad orgánica y enfermedad funcional y para facilitar el control de la EII. Los resultados deben interpretarse siempre en combinación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Para el control de la EII, se ha sugerido que el uso de múltiples determinaciones de calprotectina fecal obtenidas a intervalos de hasta 4 semanas proporciona la mejor exactitud diagnóstica en la predicción de una recaída clínica de los pacientes (ref. 21-22).
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener elevados los niveles de calprotectina fecal.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

DISTINGUIR ENTRE ENFERMEDAD ORGÁNICA Y ENFERMEDAD FUNCIONAL GASTROINTESTINAL

La determinación de los niveles de calprotectina fecal pueden ser utilizados como una ayuda fiable y simple para distinguir entre enfermedades gastrointestinales funcionales u orgánicas. (ref. 1-7).

Los datos siguientes se establecieron con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL). En un estudio clínico, se compararon con los hallazgos endoscópicos los valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos. La endoscopia confirmó que 264 pacientes sufrían de enfermedades funcionales mientras que 80 pacientes tenían varias enfermedades orgánicas (colitis, enfermedad de Crohn, úlceras, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer, o enfermedades infecciosas) (ref. 5).

Análisis de la curva ROC (AUC:0,962) resulta en un punto de corte clínico óptimo a 50 µg/g para diferenciar entre enfermedades gastrointestinales orgánicas y funcionales, con valores de sensibilidad y especificidad de 88,8 % y 93,6 % respectivamente (véase la tabla 3).

Los niveles de calprotectina fecal de adultos y niños son comparables, mientras que los niveles de recién nacidos pueden aumentar significativamente (ref. 8). Estos datos respaldan la siguiente recomendación para la interpretación de los resultados:

Valores por debajo de 100 µg/g:

Estos valores de calprotectina debajo de 100 µg/g son indicativos de una situación no inflamatoria o una inflamación leve en el intestino.

Se puede considerar la posibilidad de realizar investigaciones adicionales o repetir el ensayo de la muestra con EK-CAL o LF-CAL25.

Valores elevados entre 100 µg/g y 200 µg/g:

Los valores de calprotectina entre 100 µg/g y 200 µg/g pueden ser representativos de un trastorno orgánico leve como inflamación causada por AINEs, diverticulitis suave y EII en fase de remisión. La baja respuesta inflamatoria mostrada dentro de ese intervalo puede sugerir la repetición de la medida y la realización de investigaciones adicionales.

Valores elevados por encima de 200 µg/g:

Los valores de calprotectina por encima de 200 µg/g son indicativos de un trastorno orgánico activo con inflamación del tracto gastrointestinal. Se sugieren otros procedimientos de investigación adicionales por parte de especialistas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONTROL DE LA EII

La determinación de la calprotectina fecal es también un método fiable y sencillo para facilitar el monitoreo de pacientes con EII (ref. 10-20).

La correlación de los niveles de calprotectina con el estado de inflamación de la mucosa intestinal de los pacientes, según evaluaciones endoscópicas, se ha determinado en tres estudios independientes utilizando análisis de calprotectina BÜHLMANN (tabla 4). El valor diagnóstico de la calprotectina para predecir la remisión y la recaídas clínicas, según los síntomas del paciente, los índices de actividad clínica, la necesidad no prevista de aumento del tratamiento, hospitalización o atención de emergencia, se ha determinado en tres estudios utilizando análisis de calprotectina BÜHLMANN (tabla 5).

El conocimiento condensado de los niveles de corte publicados y los estudios de rendimiento clínico anteriores respalda las categorías de resultados siguientes:

Valores por debajo de 100 µg/g:

Los niveles de calprotectina fecal por debajo de 100 µg/g pueden indicar de manera fiable pacientes con riesgo bajo de recaída clínica, en remisión endoscópica, para los que se puede evitar la realización de procedimientos endoscópicos invasivos (ref. 10-20).

Valores entre 100 y 300 µg/g:

Los niveles de calprotectina fecal entre 100 y 300 µg/g pueden indicar la necesidad de un control más estrecho en el siguiente período para evaluar las tendencias de evolución de la enfermedad.

Valores por encima de 300 µg/g:

Los niveles de calprotectina fecal por encima de 300 µg/g deben dar lugar a la repetición del análisis y, en caso de confirmarse los niveles elevados, la pronta realización de procedimientos de investigación adicionales (ref. 10-20).

Las categorías de resultados anteriores son recomendaciones. Se aconseja que los profesionales sanitarios establezcan umbrales individuales para cada paciente determinando el nivel basal de calprotectina del paciente durante la remisión de la enfermedad.

Un resultado falso negativo que es un resultado de calprotectina en la categoría por debajo de 100 µg/g que debería mostrar un valor por encima de 300 µg/g, para un paciente con inflamación endoscópica, aunque improbable, podría retrasar la toma de las decisiones clínicas apropiadas y el tratamiento del paciente. Por lo tanto, es importante que el paciente permanezca bajo la atención de un profesional sanitario y comunique cualquier síntoma clínico.

Los estudios han mostrado que niveles de calprotectina altos, por encima de 300 µg/g, no siempre indican el desarrollo de una recaída clínica (ref. 10-20). Los niveles de calprotectina altos deben considerarse una señal de alerta para repetir el análisis. La confirmación de los niveles elevados debe dar lugar a la realización de procedimientos de investigación adicionales.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Comparación de los métodos

Sesgo en el punto de decisión clínica (200 µg/g): -1,6 % (intervalo de confianza del 95 %: -12,0-15,2)

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se midieron 103 muestras clínicas con el ensayo Quantum Blue® fCAL high range y con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, siguiendo las instrucciones de uso. Se realizaron mediciones durante un período de tres días con dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. En la figura 2 se muestran los datos de correlación.

Repetibilidad: 20,0-22,7 % CV

Precisión intralaboratorio: 22,4-28,1 % CV

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se establecieron conforme a la norma EP05-A3 del CLSI. Cinco muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina de entre 180 y 1224 µg/g fueron analizadas por un mismo operador durante un período de 20 días en dos series independientes cada día de dos copias cada una. En la tabla 6 se resumen los resultados.

Reproducibilidad: 19,2-28,9 % CV

La reproducibilidad se determinó conforme a la norma EP05-A3 del CLSI realizando mediciones en tres distintos instrumentos Quantum Blue® Reader con tres distintos lotes de cartuchos de prueba. Cinco muestras de heces con concentraciones de calprotectina de entre 202 y 1'328 µg/g fueron analizadas durante un período de 5 días en una única serie de cinco copias. Cada uno de los instrumentos Quantum Blue® Reader fue manejado por un operador distinto situado en tres sitios distintos. En la tabla 7 se resumen los resultados.

Límite de blanco (LoB): 60 µg/g de calprotectina

El LoB se estableció con cuatro muestras de heces diluidas hasta una concentración predeterminada de calprotectina inferior a 10 µg/g, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra cada día durante un período de tres días, por un total de 60 blancos. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. El LoB se calculó mediante un análisis no paramétrico.

Límite de detección (LoD): 100 µg/g de calprotectina

El LoD se determinó con cinco muestras clínicas con concentraciones de calprotectina de 59, 70, 82, 117 y 148 µg/g, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra por día durante un período de tres días, por un total de 75 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. El LoD se calculó mediante un análisis paramétrico.

Límite de cuantificación (LoQ): 100 µg/g de calprotectina

El LoQ se determinó con seis muestras clínicas con concentraciones de referencia de calprotectina de 59, 70, 82, 117, 148 y 166 µg/g, determinadas con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra por día durante un período de tres días, por un total de 90 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. Se determinó el error relativo total mediante el modelo de RMS a partir de estimaciones del sesgo y la precisión de cada muestra. Se representó el logaritmo del error relativo total frente a la concentración de calprotectina de referencia de las muestras. Se determinó el LoQ como el valor de intersección del modelo de regresión lineal obtenido de la gráfica con un criterio de aceptación del error relativo total del 30 %. En la tabla 8 se resumen los resultados.

Intervalo de linealidad: 67-2'153 µg/g de calprotectina

El intervalo de linealidad del ensayo Quantum Blue® fCAL high range se determinó conforme a la norma EP06-A del CLSI. Dos mezclas de muestra, con concentración alta y baja respectivamente, se mezclaron hasta obtener 17 valores distintos de concentración que abarcaran un intervalo que comprendiera todo el intervalo esperado. Se analizaron diez copias de las mezclas en dos lotes de cartuchos de prueba. El intervalo de linealidad se definió como el intervalo de valores de concentración en el cual los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden resultan despreciables. En la figura 3 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

Linealidad de la dilución: 1:10-1:100

Una muestra clínica con una concentración estimada de calprotectina de 18 000 µg/g se diluyó en un tampón de extracción para obtener unas concentraciones predeterminadas de calprotectina de 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 y 1700 µg/g. Se practicó una ulterior dilución 1:10 de las muestras para obtener concentraciones de calprotectina que abarcaran el intervalo de medición del ensayo. Se analizaron cinco copias de las diluciones en dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. La linealidad de las diluciones obtenidas se determinó conforme a la norma EP6-A del CLSI. En los casos en los que los coeficientes de los ajustes de segundo o tercer orden resultaran no despreciables, se estableció un valor máximo aceptado de desviación de la linealidad del 20 %, observándose una desviación superior del 10 %. En la figura 4 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

Efecto gancho a dosis altas

En las muestras con concentraciones de calprotectina de hasta 18 931 µg/g, no se observó ningún efecto gancho a dosis altas.

PORTUGUÊS

USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range é um teste de diagnóstico *in vitro* para a determinação quantitativa da calprotectina em amostras fecais humanas, sendo indicado ao uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do ensaio podem ser utilizados com o auxílio no diagnóstico, ajudando a distinguir doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (Doenças Intestinais Inflamatórias, DII; ex., doença de Chron ou Colite Ulcerativa, CU) de doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7), em pacientes com dor abdominal crônica com mais de quatro anos de idade (ref. 8-9), e como auxiliar do monitoramento de DII (ref. 10-20).

Para uso profissional*.

*Canada, Taiwan: só para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antígeno da calprotectina mediante um imunoenensaio tipo sanduiche. A membrana do teste é revestida com um anticorpo de captura monoclonal (mAB) altamente específico para a calprotectina. Um segundo anticorpo de detecção monoclonal conjugado com ouro coloidal encontra-se na zona de dispensação e liberta-se aquando da adição do extrato diluído da amostra de fezes.

O complexo calprotectina/anti-calprotectina conjugado com ouro coloidal liga-se ao anticorpo monoclonal anti-calprotectina que reveste a membrana do teste (linha do teste) e o conjugado anti-calprotectina com ouro coloidal livre liga-se ao anticorpo de cabra que reveste a membrana (linha de controle). As intensidades dos sinais da linha de teste e de controle são quantificadas pelo Quantum Blue® Reader.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Observações
Cassete do Teste	25 unidades	B-CAL-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de Extração	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Controlos baixo* / elevado*	2 frascos, 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1 pedaço	B-CHR-RCC	Cartão de plástico vermelho

Tabela 1

*Os controlos contêm quantidades específicas de calprotectina humana no lote. Veja a folha de dados adicional QC para as concentrações reais.

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Todos os componentes do kit são estáveis a 2-8 °C até à data de expiração impressa nos rótulos.

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

Os tubos de extração de fezes descritos abaixo não são incluídos no kit, e devem ser encomendados separadamente.

Tubos de extração	Quantidade	Código
CALEX® Cap Device	50, 200 ou 500 dispositivos com 5 mL tampão de extração / pronto para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 tubos, consistindo de espátulas e tampas	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubos: consistindo de tubo, suporte do dosador & dosador com 1,3 mL de tampão de extração / pronto para uso	B-CAL-SO50

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Vortex para extração das fezes
- Pipetas com pontas descartáveis: 10-100 µL, 100-1000 µL e 250-2500 µL
- Centrífuga
- Tubos de propileno ou poliestireno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronómetro (opcional)
- Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Os controlos deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infeções e devem ser manipulados de acordo com as boas práticas do laboratório (BPL), usando as precauções apropriadas.
- Amostras dos pacientes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais (BPL).
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a regulamentação das entidades governamentais locais.

Precauções técnicas

Componentes do kit

- Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18-28 °C) antes do início do ensaio.
- Componentes não podem ser utilizados após data de expiração impressa nos rótulos.
- Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Os cassetes dos testes não podem ser re-utilizados.

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O Quantum Blue® Reader tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL high range (CHR_0 o CHR_900), antes do início do teste (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão vermelho RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de pacientes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados erróneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente a amostra no tubo de extração.
- Se não for utilizado directamente, as amostras diluídas devem ser armazenadas a 2-8 °C e devem ser utilizadas dentro de doze horas.
- É importante centrifugar os extratos com BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3000 xg). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo. Com dispositivo CALEX® Cap pode armazenamento os extratos directamente com o dispositivo. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo Procedimento de Ensaio.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

São necessários menos de 1 g de amostra nativa de fezes para o procedimento de extração.

As amostras de fezes devem ser coletadas em tubos lisos.

Importante: A amostra deve ser coletada sem a adição de qualquer produto químico ou biológico no dispositivo de coleta.

Transporte da amostra

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório nos 3 dias seguintes à coleta. As amostras podem ser transportados à temperatura ambiente (23 °C).

Armazenamento de amostras

As amostras de fezes recebidas devem ser armazenadas a 2-8 °C e extraídas dentro de 3 dias.

Armazenamento do extratos

A calprotectina em extractos obtidos pelo tampão dispositivo CALEX® Cap é estável à temperatura ambiente (18-28 °C) durante 3 dias, a 2-8 °C durante 6 dias e a -20 °C durante 18 meses.

A calprotectina em extratos obtidos por método de pesagem manual, por BÜHLMANN Smart-Prep ou por ScheBo® Quick-Prep™ é estável a 2-8 °C durante 6 dias ou a -20 °C durante 18 meses.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

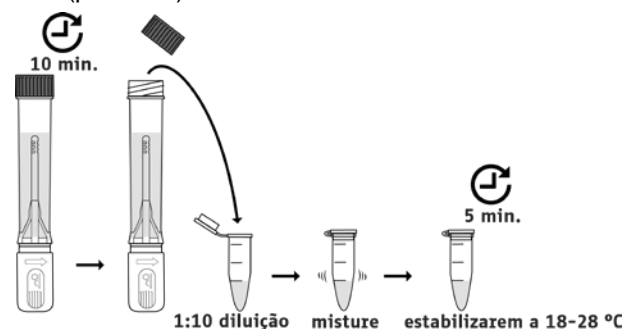
O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

1. Extração das amostras de fezes:

O procedimento de extração está descrito nas instruções de uso fornecidas com os tubos de extração.

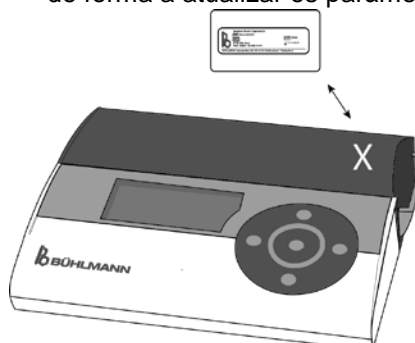
2. Processamento de amostras:

- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:100 com tampão de extração (por exemplo: 20 µL do extrato e 1980 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, antes de continuar com o procedimento do teste. Abrir a tampa azul. Diluir os extratos 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo 3.).



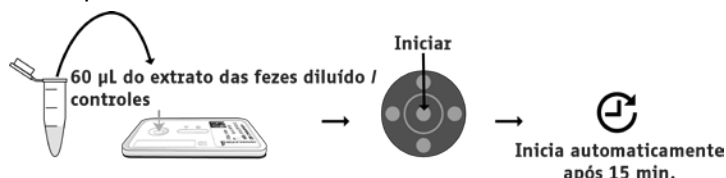
3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

Existem disponíveis dois métodos alternativos no Quantum Blue® Reader: <CHR_900> e <CHR_0>. Selecione um deles antes de iniciar o processo de leitura. Proceda à leitura do cartão chip RFDI vermelho, de forma a atualizar os parâmetros específicos do lote.



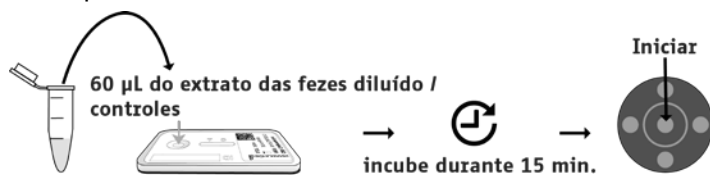
3.1. Método <CHR_900> com cronómetro interno

- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no orifício de carga da amostra de cassete do teste.
- Feche o dispositivo do cassete e inicie a medição pressionando o botão Iniciar.
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 15 minutos (900 segundos).
- Para Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.1 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



3.2. Método <CHR_0> sem cronómetro interno

- Adicione 60 µL do extrato das fezes no orifício de carga da amostra de cassete de teste. Incube durante 15 minutos ± 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Precione imediatamente o botão Iniciar no Quantum Blue® Reader para fazer a leitura do cassete.
- Para Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.2 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



Nota: Por favor, leia as instruções do Manual do Quantum Blue® Reader para conhecer as funções, iniciar e operar o leitor; especialmente como selecionar métodos e introduzir os parâmetros através da leitura do cartão RFDI.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Se o desempenho do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições excluam erros técnicos, verifique o seguinte: i) pipetagem, temperatura e tempos dos diferentes passos, ii) data validade dos reagentes e iii) condições armazenamento e incubação.
- A autocalibração do Quantum Blue® Reader (calibration check) quando é iniciado tem que ser válida.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a Linha de Controlo (C) tem que ser sempre visível (ver figuras 1A e 1B). É um teste de controlo/validação que não pode ser usado para interpretar a Linha de Teste (T). Se a Linha de Teste (T) não for detectável após os 15 min de incubação (figura 1A), a concentração de calprotectina presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a Linha de Teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo Quantum Blue® Reader.
- Se apenas a Linha de Teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete. Se nem a Linha de Controlo (C) nem a Linha de Teste (T) forem detectáveis após 15 min de incubação (figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o Quantum Blue® Reader permite a avaliação quantitativa das Linhas de Teste (T) e de Controlo (C), há uma validação adicional da Linha de Controlo (C). Se a intensidade do sinal da Linha de Controlo (C) for inferior à determinada para esse lote após os 15 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- O Quantum Blue® fCAL high range está estandardizado com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O Quantum Blue® Reader utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. Esta curva específica do lote é gerada com os valores medianos (n ≥ 20 medições cada) de 13 pontos de calibração obtidos a partir de diferentes amostras de fezes com concentrações de calprotectina conhecidas. A gama de calibração varia de 100 a 1800 µg/g.
- Para medições quantitativas, as amostras desconhecidas com valores superiores a 1800 µg/g podem ser diluídas 1:10 com o tampão de extração, e analisadas de acordo com o procedimento. O fator de diluição deve ser multiplicado pelo valor de concentração medido para obter o resultado final.
- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras abaixo de 100 µg/g podem ser re-testadas no Quantum Blue® fCAL (referência: LF-CAL25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL high range são destinados para a determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais apenas humanos.
- Os valores da calprotectina fecal servem para auxiliar no diagnóstico e facilitar a distinção entre doenças orgânicas e doenças funcionais, e para auxiliar no monitoramento de DII (doenças inflamatórias intestinais). Os resultados devem sempre ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais.
- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam a melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 21-22).
- Pacientes que tomam NSAIDs regularmente podem apresentar elevações nos níveis de calprotectina fecal.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

COMO DISTINGUIR DOENÇAS ORGÂNICAS DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS FUNCIONAIS

A determinação dos níveis de calprotectina fecal pode ser usada como um auxílio confiável e simples para distinguir as doenças gastrointestinais orgânicas e funcionais (ref. 1-7).

Os dados a seguir foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN (código de pedido: EK-CAL). Em um estudo clínico, valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos foram comparados a resultados endoscópicos. Exames endoscópicos mostraram que dos 264 pacientes com doenças funcionais, 80 pacientes tinham diversas doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, úlceras, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças infecciosas) (ref. 5).

A análise da curva ROC (AUC: 0,962) resultou em um ótimo corte clínico de 50 µg/g para a diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais, com sensibilidade clínica e especificidade de 88,8 % e 93,6 %, respectivamente (consulte a tabela 3).

Níveis de calprotectina fecal de adultos e crianças são comparáveis, ao passo que níveis de recém-nascidos podem ser significativamente maiores (ref. 8).

Esses dados apoiam a seguinte recomendação para interpretação de resultados:

Valores inferiores a 100 µg/g:

Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g não são indicativos da inflamação ou inflamação leve do trato gastrointestinal. Poderá levar-se em consideração continuar a vigiar o doente e retestar a amostra com o EK-CAL or LF-CAL.

Valores elevados entre 100 e 200 µg/g:

Valores de calprotectina entre 100 e 200 µg/g podem significar uma doença leve orgânica inflamação do trato gastrointestinal como inflamação causada por AINEs, diverticulite leve e IBD na fase de remissão. A fraca resposta inflamatória nesta gama sugere a repetição da quantificação e outras investigações.

Valores elevados superiores a 200 µg/g:

Valores de calprotectina acima de 200 µg /g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação do trato gastrointestinal. Sugere-se procedimentos investigativos apropriados por especialistas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

MONITORAMENTO DE DII

A determinação da calprotectina fecal também é uma forma confiável e simples de auxiliar no monitoramento de pacientes com DII (ref. 10-20).

A correlação entre 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 4).

O valor diagnóstico da calprotectina na predição da remissão clínica e da recaída, de acordo com os sintomas do paciente, os índices de atividade clínica, a necessidade não planejada de escalação terapêutica, hospitalização ou emergência foi determinado em três estudos usando testes de BÜHLMANN de calprotectina (tabela 5). O conhecimento condensado dos valores de corte publicados e os estudos de desempenho clínico acima respaldam as seguintes categorias de resultados:

Valores 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 devem ser evitados (ref. 10-20).

Valores 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 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 execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 10-20).

As categorias de resultados acima são recomendações. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limites individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença. Embora improvável, um resultado falso negativo de calprotectina abaixo de 100 µg/g para um paciente com inflamação endoscópica, onde o valor deveria ser acima 300 µg/g, pode atrasar a tomada de decisões clínicas apropriadas e o tratamento do paciente. Assim, é importante que o paciente permaneça sob os cuidados de um profissional de saúde e informe todos os sintomas clínicos. Estudos demonstraram que níveis altos de calprotectina, acima de 300 µg/g, nem sempre indicam o desenvolvimento de uma recidiva clínica (ref. 10-20). Altos níveis de calprotectina devem ser tratados como um sinal de alerta, requerendo a repetição do teste.

A confirmação desses níveis indica a necessidade de procedimentos adicionais de investigação.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Comparação de métodos

Desvio no ponto de decisão clínica (200 µg/g): -1,6 %
(intervalo de confiança de 95 %: -12,0-15,2)

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Cento e três (103) amostras clínicas foram medidas de acordo com as instruções do teste Quantum Blue® fCAL high range e com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As medições foram realizadas por três dias usando-se dois lotes de cassetes de teste Quantum Blue® fCAL high range. Os dados de correlação podem ser vistos na figura 2.

Repetibilidade: 20,0-22,7 % CV

Precisão intralaboratorial: 22,4-28,1 % CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI. Cinco amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 180 e 1 224 µg/g foram avaliadas por um operador por 20 dias em duas corridas independentes por dia, com duas replicações por corrida. Os resultados do teste estão resumidos na tabela 6.

Reprodutibilidade: 19,2-28,9 % CV

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, através de medições executadas em três Quantum Blue® Reader diferentes, com três lotes de cassetes de teste diferentes. Cinco amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 202 e 1328 µg/g foram testadas por 5 dias em uma corrida com cinco replicações por corrida. Cada um dos Quantum Blue® Readers foi operado por um operador diferente em três locais diferentes. Os resultados estão resumidos na tabela 7.

Limite do branco (LoB): 60 µg/g de calprotectina

O LoB foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI com quatro amostras fecais diluídas até uma concentração abaixo de 10 µg/g de calprotectina. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 60 valores de branco. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoB foi avaliado usando-se análise não paramétrica.

Limite de detecção (LoD): 100 µg/g de calprotectina

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se cinco amostras clínicas com concentrações de 59, 70, 82, 117 e 148 µg/g de calprotectina. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 75 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoD foi calculado usando-se análise paramétrica.

Limite de quantificação (LoQ): 100 µg/g de calprotectina

O LoQ foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se seis amostras clínicas com concentrações de referência de 59, 70, 82, 117, 148 e 166 µg/g de calprotectina determinadas com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 90

valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio de cada amostra. Os valores de erro relativo total foram transformados logaritmicamente e plotados contra as concentrações de referência de calprotectina das amostras. O LoQ foi definido como a intersecção do modelo de regressão linear obtido para a plotagem e o critério de aceitação de 30 % do erro relativo total. Os resultados estão resumidos na tabela 8.

Faixa linear: 67-2153 µg/g de calprotectina

A faixa linear do teste Quantum Blue® fCAL high range foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras, alto e baixo, foram misturados para se obter 17 níveis de concentração abrangendo toda a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em 10 replicações com dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de níveis de concentração nos quais os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na figura 3.

Linearidade da diluição: 1:10-1:100

Uma amostra clínica com uma concentração estimada de 18000 µg/g de calprotectina foi diluída no tampão de extração para se obter concentrações de 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 e 1700 µg/g de calprotectina. As amostras foram submetidas a uma diluição adicional de 1:10 para se obter concentrações de calprotectina que correspondessem à faixa de medição do teste. As diluições foram então medidas em cinco replicações no teste Quantum Blue® fCAL high range, com dois lotes de cassetes de teste. A linearidade das diluições obtidas foi avaliada de acordo com a diretriz EP6-A do CLSI. Nos pontos em que os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordem foram considerados significativos, um desvio máximo da linearidade de 20 % foi permitido, sendo que nenhum desvio acima de 10 % foi observado. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na figura 4.

Efeito gancho com dose elevada

Não foi observado efeito gancho com dose elevada para amostras com concentrações de calprotectina até 18 931 µg/g.

APPENDIX I

TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND FIGUREN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS E FIGURAS

Test Cassette Results

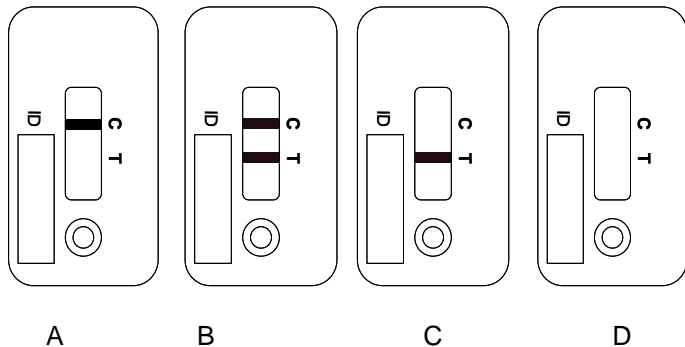


Figure 1

Clinical study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

Calprotectin ¹ vs. clinical diagnosis	
Patient number and demographics	344 Age Median (IQR): 63 (53-72), 41.6 % male
Cut-off	50 µg/g
AUC	0.962
Sensitivity	88.8 %
Specificity	94.3 %
NPV	96.5 %
PPV	82.6 %
LR+	15.6
LR-	0.12

Table 3

Clinical studies – IBD monitoring

Calprotectin ¹ vs IBD activity determined by endoscopic findings	Study 1 Spain (ref. 10)	Study 2 Spain (ref. 11)	Study 3 Australia, New Zealand (ref.12)
Patient number and demographics	89 (CD ²) Ages: 32-58 44 % male	123 (UC ³) Ages: 18-85 66.4 % male	99 (CD ² after resection) Ages: 29-47 ³ 46.5 % male
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98 %	86 %	91 %
PPV	79 %	80.3 %	53 %

Table 4

¹ Results for studies 1 and 2 were obtained with the BÜHLMANN lateral flow assays (Quantum Blue[®] fCAL and Quantum Blue[®] fCAL high range). Results in study 3 were obtained with the 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. 13)	Study 5 Spain (ref. 14)	Study 6 Spain (ref. 15)
Patient number and demographics	92 (CD ²) 38 % male	30 (CD ³) adalimumab therapy Ages: 24-64 43.3 % male	33 (CD ²) 20 (UC ³) infliximab therapy Ages: 18-68 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 5

¹ Results for study 4 were obtained with the BÜHLMANN fCAL[®] ELISA. Results for studies 5 & 6 were obtained with the BÜHLMANN lateral flow assays (Quantum Blue[®] fCAL and Quantum Blue[®] fCAL high range).

² CD = Crohn's disease patients

³ UC = Ulcerative Colitis patients

Method Comparison

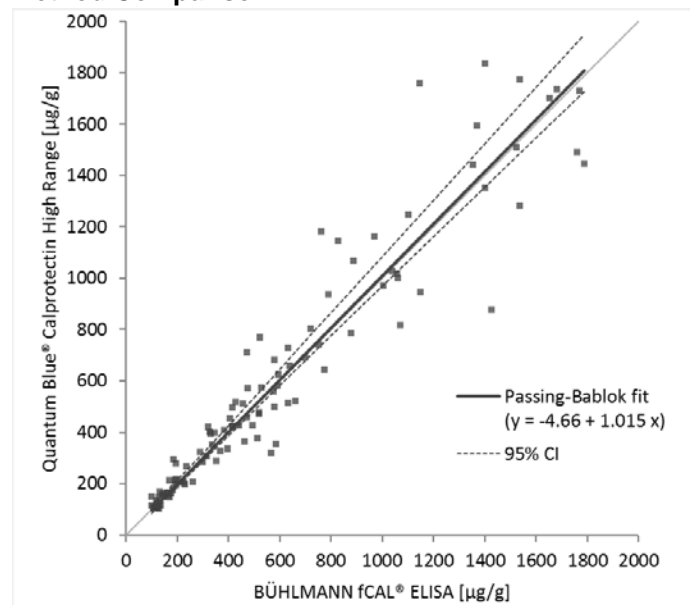


Figure 2

APPENDIX I

TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND FIGUREN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS E FIGURAS

Within-laboratory precision

Mean Conc. [µg/g]	Repeatability CV [%]	Between-run Precision CV [%]	Between-day Precision CV [%]	Within-lab Precision CV [%]
180	21.0	0.0	12.6	24.5
219	21.5	5.1	17.5	28.1
330	20.6	15.5	0	25.8
582	22.7	6.4	13.1	27.0
1224	20.0	6.4	6.0	22.4

Table 6

Reproducibility

Mean Conc. [µg/g]	Repeatability CV [%]	Between-day Precision CV [%]	Between-Lot/Op/In ¹ Precision CV [%]	Reproducibility CV [%]
202	21.5	2.8	8.7	23.3
243	23.3	11.3	12.7	28.9
347	19.7	3.2	0	19.9
629	20.8	10.0	4.0	23.4
1328	16.9	9.0	0	19.2

Table 7

Limit of Quantification

Sample	1	2	3	4	5	6
Reference value [µg/g]	99.72	132.75	148.49	165.47	82.65	80.45
Bias [µg/g] (Mean value obtained – reference value)	17.29	16.07	0.84	-0.08	12.50	21.26
Precision [% CV]	28	23	19	18	27	19
% Total Error	33	26	19	18	31	32
Intersection of linear regression with acceptance criterion of 30 % relative total error ² [µg/g]						97.2

Table 8

Linearity

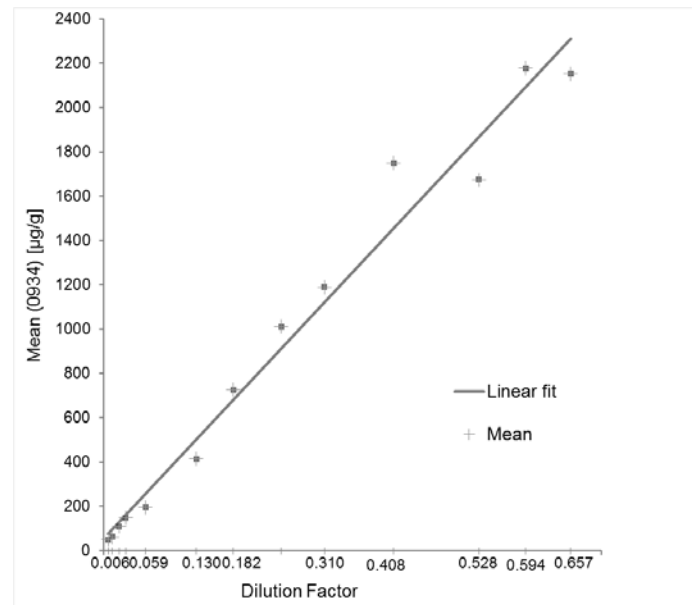


Figure 3

Dilution Linearity

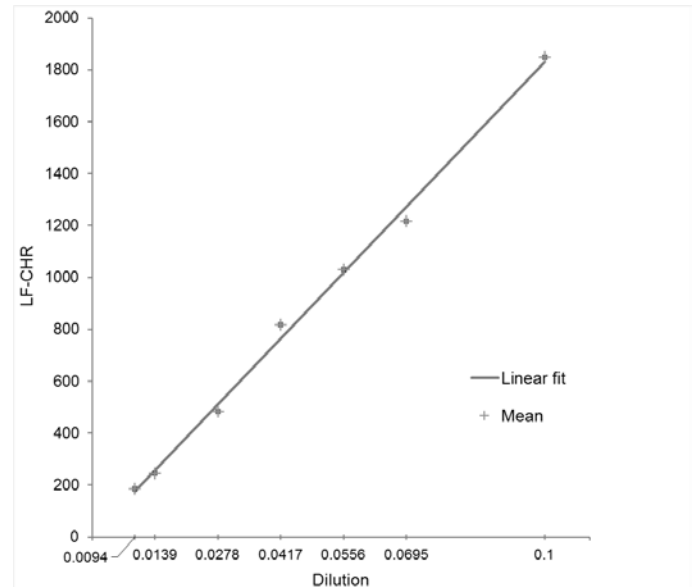


Figure 4

¹ Lot/Op/Inst. = Lot, Operator and Instrument

² The relative total error and the acceptance criterion were log transformed

REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / REFERENCES / 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. 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)
8. Qingling Zhu et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
9. 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)
10. Lin JF et al. *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. 20,1407-15 (2014)
11. 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)
12. Lobatón Ortega 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)
13. 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)
14. 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)
15. Ferreira-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)
16. Ferreira-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)
17. 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)
18. Lassen 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)
19. 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)
20. 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)
21. 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)
22. De Vos M et al. *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 9, 2111-2117 (2013)


APPENDIX III

NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS

APPENDIX IV

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
REF	Catalogue number Bestellnummer Code Codice Código Código
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote Código lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos Contenido suficiente para <n> tests
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
TC	Test Cassette Testkassette Cassette test Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
BUF EX	Extraction Buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción Tampão de extração
CONTROL L	Control Low Kontrolle Tief Contrôle Bas Controllo Basso Control Bajo Controle Baixo
CONTROL H	Control High Kontrolle Hoch Contrôle Élevé Controllo Alto Control Alto Controle Alto
RCC	RFID Chip Card RFID Chipkarte Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão Chip RFID

CE

IVD