



Quantum Blue[®] fCAL

Quantitative Lateral Flow Assay

LF-CAL25

25 tests

Revision date: 2016-11-09

BÜHLMANN LABORATORIES AG

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

English	page	3
Deutsch	Seite	7
Français	page	11
Italiano	pagina	15
Español	página	19
Português	página	23

INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid to the assessment of intestinal mucosal inflammation. The assay results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, e.g. Crohn's disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-6), in patients with chronic abdominal pain, above the age of four (ref. 7-8).

For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

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

Table 1

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

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.

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
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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

PRECAUTIONS

Safety 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.
- 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 assay.
- 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 assay (CAL_0 or CAL_720) before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the white 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.
- Diluted samples should be used within several hours and cannot be stored for a longer time period.

- With BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3'000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube. With CALEX® Cap Device you can store the extracts directly with the device. For re-use / re-measurement of the extracts see step 2 under assay procedure.
- CALEX® Cap Device: Allow the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down after extraction. Unscrew the blue cap and dilute the supernatant 1:1.6 with Extraction Buffer (e.g. 200 µL extract and 120 µL Extraction Buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes to 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step no. 3).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-200 µL and 1 mL
- Centrifuge
- 5 mL polypropylene or polystyrene tubes for the dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Soft tissues or blotting paper

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 BÜHLMANN CALEX® Cap is stable at room temperature 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™: Allow the stool extract settle for 10 minutes after extraction. Dilute the supernatant 1:16 with Extraction Buffer (e.g. 20 µL extract and 300 µL Extraction Buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes to 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step no. 3).

3. Lateral Flow Assay Procedure and Readout:

There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CAL_720> and <CAL_0>. Select one of these methods before starting the experiments.

Load the lot specific parameters from the white RFID Chip Card.

3.1. Method <CAL_720> with internal timer

- Load the Test Cassette onto the Test Cassette holder of the 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 12 minutes (720 seconds).
- For Low / High Controls: Repeat step 3.1 using 60 µL of Control instead of diluted stool extract.

3.2. Method <CAL_0> without internal timer

- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the Test Cassette.
- Incubate for 12 minutes +/-1 minute (set a timer manually).
- Load the Test Cassette onto the Test Cassette holder of the Reader.
- Scan the cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) 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 more about the basic functions and how to initialize and operate the 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 precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.
- 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 12 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 12 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 12 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the calprotectin assay has to be repeated using another Test Cassette.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the calprotectin assay 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 12 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Quantum Blue® fCAL high range assay has to be repeated using another Test Cassette.

STANDARDIZATION

- The Quantum Blue® fCAL 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 median values ($n \geq 10$ measurements each) from at least 10 calibration points obtained from different stool samples with known calprotectin concentrations. The assay range is between 30 and 300 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 300 µg/g can be re-tested in the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (order code: LF-CHR25).

LIMITATIONS

- Reagents delivered with the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values can be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- A calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL assay can be confirmed by measuring other biomarkers (such as C-reactive protein) or by repeating the calprotectin test (with BÜHLMANN fCAL® ELISA or using a second Test Cassette) and comparing to the CDAI score and the clinical status of the patient, before any clinical and/or therapeutic decision is made.

- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevations in their fecal calprotectin levels.

INTERPRETATION OF RESULTS

Estimation of fecal calprotectin is a reliable and simple way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases.

The following data were established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). In a clinical study, 401 symptomatic consecutive patients scheduled for colonoscopy were investigated (Table 13).

Endoscopy examination showed 273 patients with functional diseases, whereas 128 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulceration, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases).

A clinical cut-off at 50 µg/g was determined by ROC curve analysis (AUC: 0.935) by applying this cut-off for differentiation between organic and functional diseases, a clinical sensitivity of 84.4 % and a specificity of 94.5 % can be reached. The suggested cut-off level for adults (50 µg/g) can be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref. 7). Although fecal calprotectin levels from adults and children are reported comparable in general, levels of newborns can be significantly increased (ref.6).

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Values below 50 µg/g:

Calprotectin values <50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patient- samples with low levels are likely not to be in need of further invasive procedures to determine the inflammation cause (ref. 4).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:

Calprotectin values between 50 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 >200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <7 µg/g calprotectin. The LoB has been established in accordance with CLSI protocol EP17-A in three independent runs using three different lots of Test Cartridges with 60 blank values in total by using Extraction Buffer as a sample.

Limit of Detection (LoD): 15 µg/g calprotectin. The LoD has been established with two stool extracts with concentrations of 14.5 and 28.5 µg/g. The samples were measured with three different lots of Test Cartridges in three independent runs of 10 replicates each, set up within 10 minutes. The averaged SD values were determined and the LoD has there from been calculated in accordance with CLSI protocol EP17-A.

Limit of Quantification (LoQ):**Lower LoQ: $\leq 30 \mu\text{g/g}$ calprotectin****Upper LoQ: $\geq 300 \mu\text{g/g}$ calprotectin**

The LoQ has been established with seven stool extracts at concentrations between 14.5 and 622 $\mu\text{g/g}$. The samples were measured with three different lots of Test Cassettes in three independent runs of 10-20 replicates each, set up within 10 minutes and averaged. The resulting precision profile is shown in Figure 2. The limit of quantification corresponds to the concentration of calprotectin with an imprecision below 25 % CV allowing a quantitative measurement within the range from 30 (lower LoQ) to 300 $\mu\text{g/g}$ (upper LoQ).

Linearity: Four stool samples with elevated calprotectin concentrations were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Extraction Buffer and each dilution was subsequently assayed on two Test Cassette according to the assay procedure and averaged for each test point. The results showed linearity within the indicated measuring range of 30 to 300 $\mu\text{g/g}$ of the Quantum Blue® fCAL assay for all 4 samples ($R^2 = 0.986 - 0.995$). One example is shown in (Figure 3). The average difference between measured and expected concentrations was 2% corresponding to a recovery of 98 %. The recovery varied between 84-114 %.

Recovery: 92 %. Four stool extracts containing low calprotectin concentrations were spiked with different amounts from a highly concentrated calprotectin stock solution. Each sample was measured before and after spiking on three test cartridges according to the assay procedure. The three replicates were averaged and the mean values are presented in Table 15. The recovery varied 83-105 %.

Repeatability: 15.5 - 22.2 % CV. The repeatability of the Quantum Blue® fCAL assay was calculated from 2 extracted stool samples containing 49 and 138 $\mu\text{g/g}$ calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in one run of 20 replicates set up within 10 minutes. The mean values of three different lots of Test Cassette are presented in Table 14. The repeatability varied between 15.5-22.2 % CV.

Inter-lot Precision: 20.2 - 24.5 % CV. The inter-lot precision of the Quantum Blue® fCAL assay was calculated from 4 extracted stool samples containing between 30 and 244 $\mu\text{g/g}$ calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in three independent runs of 10-20 replicates each, set up within 10 minutes using three different lots of Test Cassette. The inter-lot data of the 4 samples varied from 20.2 to 24.5 % CV.

Method Comparison: $R^2 = 0.806$; $y = 1.02x - 11.1 \mu\text{g/g}$
101 stool extracts from subjects undergoing IBD vs. IBS screening exhibiting calprotectin concentrations within the indicated measuring range of the Quantum Blue® fCAL assay were analyzed according to the assay procedure using a data set originated from Test Cassette of six different lots and compared with the values obtained by the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). The correlation data are illustrated in Figure 4.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL ist ein *in-vitro*-Diagnostest für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben als Hilfsmittel bei der Einschätzung von Entzündungen der Darm-Schleimhaut. Die Testresultate können als Diagnose-Hilfsmittel verwendet werden zur Unterscheidung zwischen organisch-entzündlichen Magen-Darm-Trakt Erkrankungen (chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) z.B. Morbus Crohn (CD) oder Colitis ulcerosa (UC)) und einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (ref. 1-6) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (ref. 7-8).

Nur zu Laborzwecken zu verwenden.

PRINZIP DER METHODE

Das Testprinzip beruht auf der selektiven Messung von Calprotectin mittels Sandwich Immunoassay. Ein monoklonaler Fangantikörper (mAk), der hoch spezifisch für Calprotectin ist, wird auf eine Testmembran gebunden. Ein zweiter monoklonaler Nachweisantikörper, welcher mit Goldkolloide 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). Das verbleibende nicht gebundene Anti-Calprotectin Goldkonjugat wird von einem Ziege-Anti-Maus Antikörper gebunden, welcher ebenfalls auf die Membran gebunden wurde (Kontrollbande). Die Signalintensität der Testbande und der Kontrollbande wird durch den Quantum Blue® Reader quantifiziert.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Test Kassette	25 Stück	B-CAL-TC	In einem Folienbeutel vakuumdicht
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen 0,5 mL	B-LFCAL- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chip Karte	1	B-LFCAL- RCC	Weisse Plastikkarte

Tabelle 3

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

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICH

Stuhlextraktionsröhrchen

Extraktionsröhrchen zur Stuhlextraktion werden nicht mit diesem Kit mitgeliefert. Eines der in Tabelle 4 beschriebenen Devices muss zusätzlich zum Kit bestellt werden.

Extraktionsbesteck für Stuhlproben

CALEX® Cap Extraktionsröhrchen	50, 200 oder 500 Röhrchen gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
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 4

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Alle Patientenproben sollten gemäß Gute Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kit Komponenten

- Sämtliche Reagenzien und Proben müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18-28 °C) äquilibriert werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht 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 assay (CAL_0 bzw. CAL_720) muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die weisse RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemäße Handhabung 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.
- Verdünnte Extrakte sollten innerhalb einiger Stunden abgearbeitet werden und können nicht über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

- Es ist wichtig, dass die Extrakte im Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3.000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden. Mit CALEX® Cap Device können die Extrakte direkt im Device gelagert werden. Zur Wiederverwendung / wieder Messung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Arbeitsanleitung.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µL und 1 mL
- 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

GEWINNUNG UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Wird für die Extraktion Extraktionsbesteck verwendet, werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden.

Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit chemischen oder biologischen Zusätzen versetzt 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 durch BÜHLMANN CALEX® Cap gewonnen wurden, sind bei Raumtemperatur 3 Tage, bei 2-8°C 6 Tage und bei -20°C 18 Monate stabil.

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

ANLEITUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritte:

1. Extraktion der Stuhlproben:

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchens beschrieben.

2. Verarbeitung des Extraktes:

- Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:16 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 300 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen

lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt (3) fortfahren.

- CALEX® Cap Device: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:1.6 (z.B. 200 µL Extrakt + 120 µL Extraktionspuffer) verdünnen. Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt (3) fortfahren.

3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung:

Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CAL_720> und <CAL_0>. Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Assay starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der roten RFID Chipkarte

3.1 Methode <CAL_720> mit internem Zeitmesser

- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden.
- 60 µL verdünnten Stuhlextrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Den Kassettenhalter schliessen und den Start (<ENTER>) Knopf drücken.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 12 Minuten (720 Sek.).
- Für die Kontrollen Niedrig / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrolle anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

3.2 Methode <CAL_0> ohne internen Zeitmesser

- 60 µL verdünnten Stuhlextrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Die Kassette für 12 +/-1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden und auslesen durch Drücken auf den Start (<ENTER>) Knopf.
- Für die Kontrollen Niedrig / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrolle anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

Hinweis: Nehmen Sie das 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 Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und Zeitmesser, ii) Verfallsdaten 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 Figuren 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 12 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Figur 1A), bedeutet dies, dass Calprotectin nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar ist, wird die Calprotectin Konzentration in der Stuhlprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation nur die Testbande (T) sichtbar ist (Figur 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 nachweisbar sind (Figur 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (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 Lateral Flow Test wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL® ELISA kalibriert (Art.-Nr.: EK-CAL).
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectin Konzentration eine Lot-abhängige Standardkurve. Diese Standardkurve wird über den Median ($n \geq 10$ Messungen) von mindestens 10 Kalibrationspunkten und unterschiedlichen Stuhlproben mit einer bekannten Calprotectin Konzentration berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 300 $\mu\text{g/g}$.
- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, können Proben über 300 $\mu\text{g/g}$ mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (order Code: LF-CHR25) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in dem BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL Kit gelieferten Reagenzien sind nur zur Bestimmung des Calprotectin-Spiegels in menschlichen Stuhlproben bestimmt.
- Fekale Calprotectin Werte sollten als zusätzliches Hilfsmittel genutzt werden, um die Diagnosestellung des Arztes zu erleichtern.

- Ein Wert, der mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin ermittelt wurde, kann mit der Messung anderer Biomarkers (wie des C-reaktiven Protein) oder durch Wiederholung der Calprotectinmessung bestätigt werden (mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA oder unter Verwendung einer zweiten Testkassette). Die Ergebnisse können mit dem CDAI Score und der Klinik des Patienten verglichen werden, bevor eine klinische oder therapeutische Entscheidung getroffen wird.
- Patienten, die regelmäßig NSAR einnehmen, könnten erhöhte Calprotectinwerte aufweisen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Bestimmung von Calprotectin aus Stuhlproben ist eine verlässliche und einfache Methode, um organische von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen zu unterscheiden.

Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA erhoben. In einer klinischen Studie wurde von 401 Patienten, bei denen eine endoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, Calprotectin im Stuhl nachgewiesen (Tabelle 13). Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 273 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 128 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Morbus Crohn, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektions-erkrankungen).

Die ROC Analyse (AUC: 0.935) ergab einen klinischen Grenzwert von 50 $\mu\text{g/g}$ Calprotectin. Wendet man diesen Grenzwert bei der Unterscheidung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen an, kann eine klinische Spezifität von 84.4 % und eine Sensitivität von 94.5 % erreicht werden.

Der vorgeschlagene Grenzwert für Erwachsene kann (50 $\mu\text{g/g}$) kann für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren unabhängig vom Geschlecht verwendet werden (Ref. 7). Calprotectin Werte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 6).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Normalwerte unter 50 $\mu\text{g/g}$:

Calprotectin Werte $< 50 \mu\text{g/g}$ deuten nicht auf eine entzündliche Erkrankung des Darmes hin. Bei niedrigen Calprotectinwerten bedarf es in der Regel keiner invasiven Untersuchungen, um die Ursache der Erkrankung zu bestimmen (Ref. 4)

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 $\mu\text{g/g}$:

Calprotectin Werte zwischen 50 und 200 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$:

Calprotectin Werte $> 200 \mu\text{g/g}$ deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch einen Gastroenterologen werden empfohlen.

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <7 µg/g Calprotectin. Der LoB wurde berechnet nach dem CLSI Protokoll EP17-A in drei unabhängigen Läufen unter Verwendung von drei verschiedenen Testkassetten Lots mit insgesamt 60 Blank Werten, bei denen Extraktionspuffer als Probe verwendet wurde.

Limit of Detection (LoD): 15 µg/g Calprotectin. Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von zwei Stuhlextrakten mit Konzentrationen von 14.5 und 28.5 µg/g. Die Proben wurden in 3 unabhängigen Läufen von 10 Replikaten gemessen, die innerhalb von 10 Minuten angesetzt wurden. Die LoD wurde berechnet unter Verwendung der mittleren Standardabweichung der Proben in Übereinstimmung mit dem CLSI Protokoll EP17-A.

Limit of Quantification (LoQ):

Unterer LoQ: ≤30 µg/g Calprotectin

Oberer LoQ: ≥300 µg/g Calprotectin

Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von sieben Stuhlextrakten mit Konzentrationen zwischen 14.5 und 622 µg/g. Die Proben wurden in drei unabhängigen Läufen von je 10-20 Replikaten gemessen und gemittelt, die innerhalb von 10 Minuten angesetzt wurden. Das entsprechende Präzisionsprofil ist in Figure 2 dargestellt. Die Nachweisgrenze entspricht derjenigen Calprotectin Konzentration, die eine Streuung von <25 % CV zeigt und damit eine quantitative Bestimmung innerhalb eines Bereiches von 30 (unterer LoQ) bis 300 µg/g (oberer LoQ) ermöglicht.

Linearität: Vier Stuhlextrakte mit erhöhtem Calprotectingehalt wurden gemäß der Extraktionsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Extraktionspuffer verdünnt. Jede Verdünnung wurde dann auf zwei Testkassetten gemäß der Anleitung angesetzt und gemessen. Der Mittelwert für jeden Messpunkt wurde berechnet. Die Ergebnisse zeigten eine Linearität der Ergebnisse innerhalb des angegebenen Messbereiches von 30 bis 300 µg/g. für alle vier Proben. ($R^2 = 0.986 - 0.995$). Ein Beispiel ist in Figure 3 dargestellt. Die mittlere Abweichung zwischen dem gemessenen und erwarteten Wert war 2 %, entsprechend einer Wiederfindung von 98 %. Die Linearität variierte zwischen 84 und 114 %.

Wiederfindung: 92 %. Vier Stuhlextrakte mit niedrigen Calprotectin Konzentrationen wurden mit verschiedenen Mengen einer hohen Calprotectinstocklösung aufgestockt. Jede Probe wurde vor und nach dem Spiken auf drei Testkassetten gemäß der Assayanleitung gemessen. Die drei Replikate wurden gemittelt und die Mittelwerte in Tabelle 15 dargestellt. Die Wiederfindung variierte zwischen 83 und 105 %.

Repeatability: 15.5 - 22.2 % CV. Die Repeatability des Quantum Blue® fCAL Tests wurde berechnet mit Hilfe von zwei Stuhlextrakten mit Calprotectingehalten von 49 und 138 µg/g. Jede Probe wurde gemäß der Testanleitung in einem Lauf mit je 20 Replikaten innerhalb von 10 Minuten angesetzt und gemessen. Die Mittelwerte von drei verschiedenen Lots von Testkassetten werden in der Tabelle 14 dargestellt. Die Repeatability lag zwischen 15.5-22.2 % CV.

Inter-lot Präzision: 20.2 - 24.5 % CV. Die Inter-Lot Präzision der Quantum Blue® fCAL Tests wurde berechnet mit Hilfe von vier Stuhlextrakten mit Calprotectingehalten zwischen 30 und 244 µg/g. Jede Probe wurde gemäß der Testanleitung in einem Lauf mit 20 Replikaten innerhalb von 10 Minuten angesetzt und gemessen. Dazu wurden jeweils 3 verschiedene Testkassetten Lots eingesetzt. Die errechneten CVs für die 4 Proben lagen zwischen 20.2 und 24.5 %.

Methodenvergleich: $R^2 = 0.806$, $y = 1.02x - 11.1$ µg/g.

101 Stuhlextrakte von Patienten, die sich einem IBD-IBS Screening unterzogen hatten und Messwerte innerhalb des angegebenen Quantum Blue® fCAL Messbereiches zeigten, wurden gemäß der Anleitung angesetzt und gemessen mit sechs verschiedenen Chargen von Testkassetten und wurden verglichen mit den Ergebnissen, die im BÜHLMANN fCAL® ELISA (Bestellcode: EK-CAL) gewonnen wurden. Die Korrelation wird in Figure 4 dargestellt.

UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL 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. 7-8) 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. 1-6) d'une maladie fonctionnelle (syndrome de l'intestin irritable, SII).

Pour 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 BÜHLMANN 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-LFCAL- CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-LFCAL- RCC	Carte en plastique blanche

Tableau 5

*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.

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.

CALEX® Cap	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
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 6

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

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

PRÉCAUTIONS

Précautions de sécurité

- 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.
- 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 Quantum Blue® fCAL essai (CAL_0 ou CAL_720) avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID blanche 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.

- Les échantillons dilués doivent être utilisés dans un délai de quelques heures et ne peuvent être conservés plus longtemps.
- Il est important de centrifuger les extraits avec 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.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à pointes jetables : 10 - 200 µL et 1 mL
- 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

RELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

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 est stable à température ambiante 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 1/16ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 20 µL d'extrait et 300 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant au moins 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 1/1.6ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 200 µL d'extrait et 120 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer 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 respectivement < CAL_720 > et < CAL_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 blanche.

3.1. Méthode < CAL_720 > 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 12 minutes (720 seconds).
- Pour les contrôles bas / haut : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.

3.2. Méthode < CAL_0 > sans minuteur interne

- Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incuber pendant 12 +/-1 minutes en régler 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 Quantum Blue® Reader.
- Pour les contrôles bas / haut : Répéter l'étape 3.2 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.

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 précision du dosage n'est pas corrélée avec les limites établies et que la répétition exclut toute erreur technique, on vérifiera les paramètres suivants : i) pipetage, dispositifs de 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 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 12 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 12 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 12 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 12 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 12 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 en flux latéral est standardisé contre le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe est générée avec les valeurs médianes (n≥10 mesures à chaque fois) provenant d'au moins 10 points de calibrage et d'échantillons de selles différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de mesure se situe entre 30 et 300 µg/g.

- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs au-dessus à 300 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (code de commande : LF-CHR25).

LIMITES

- Réactifs fournis avec le kit BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL sont destinés à la détermination des niveaux de calprotectine dans les échantillons de selles humaines seulement.
- Les valeurs de calprotectine fécale pourraient être considérées comme des indications supplémentaires et permettre au médecin de poser un diagnostic.
- Le résultat d'un dosage de calprotectine obtenu avec le dosage BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL peut être confirmé en dosant d'autres marqueurs biologiques, comme la protéine C réactive, en répétant le dosage de la calprotectine par BÜHLMANN fCAL® ELISA (référence : EK-CAL) ou en utilisant une seconde cassette test. Comparer l'indice CDAI du patient à son état clinique avant de prendre quelque décision clinique et/ou thérapeutique que ce soit.
- Les patients prenant régulièrement des AINS peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés.

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'estimation du taux de calprotectine fécale est une façon facile et fiable de différencier les maladies organiques des maladies fonctionnelles du tractus gastro-intestinal.

Les données suivantes ont été établies avec le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL). Dans une étude clinique, 401 patients symptomatiques devant subir une coloscopie ont été étudiés (Tableau 13). L'examen endoscopique a montré que 273 patients présentaient des maladies fonctionnelles tandis que 128 patients avaient différentes maladies organiques (colite, maladie de Crohn, ulcère, diverticulite, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses).

L'analyse des courbes ROC (ASC : 0,935) a permis d'établir une valeur seuil clinique optimale de 50 µg/g. Pour différencier une maladie organique d'une maladie fonctionnelle, l'application de ce seuil permet d'atteindre une sensibilité et une spécificité cliniques de 84,4 % et de 94,5 %, respectivement. Le niveau suggéré de la valeur seuil pour les adultes (<50 µg/g) peut être utilisé pour les enfants âgés de 4 à 17 ans des deux sexes (réf. 7). Tandis que les taux fécaux de calprotectine des enfants et des adultes sont comparables, les taux relevés chez le nouveau-né peuvent être significativement augmentés (réf. 6).

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

Valeurs inférieures à 50 µg/g :

Les valeurs de calprotectine <50 µg/g ne sont pas indicatives d'une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les échantillons de patients ayant un niveau bas de calprotectine fécale ne nécessitent donc plus aucune procédure invasive pour déterminer la cause de l'inflammation (réf. 4).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g :

Les valeurs de calprotectine obtenues entre 50 et 200 µg/g peuvent représenter 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. La faible réponse inflammatoire observée dans cette gamme de concentration suggère de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200µg/g :

Les valeurs de calprotectine >200 µg/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.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LoB) : < 7 µg/g de calprotectine. La LOB a été calculé selon le protocole CLSI EP17-A dans trois analyses indépendantes de trois lots différents de cassettes test pour un total de 60 valeurs de blanc, l'échantillon étant le tampon d'extraction.

Limite de détection (LoD) : 15 µg/g de calprotectine. La LoD est établie à partir de deux extraits de selles à des concentrations de 14,5 et 28,5 µg/g. Les échantillons sont analysés avec trois lots différents de cassettes test en trois analyses indépendantes, à raison de 10 réplicats préparés en 10 minutes chacun. La LOD est calculée à partir des valeurs d'écart-type moyennées selon le protocole CLSI EP17-A.

Limite de quantification (LoQ) :

LoQ inférieure : ≤ 30 µg/g de calprotectine

LoQ supérieure : ≥ 300 µg/g de calprotectine

La LoQ est obtenue à partir de sept extraits de selles à des concentrations comprises entre 14,5 et 622 µg/g. Les échantillons sont analysés avec trois lots différents de cassettes test en trois analyses indépendantes, à raison de 10 à 20 réplicats préparés en 10 minutes chacun. Les résultats sont ensuite moyennés. Le profil de précision résultant est illustré sur la Figure 2. La limite de quantification correspond à la concentration de calprotectine avec une imprécision inférieure à 25 % de CV. Il est donc possible d'obtenir une mesure quantitative entre 30 (LoQ inférieure) et 300 µg/g (LoQ supérieure).

Linéarité : Sept échantillons de selles présentant des concentrations de calprotectine supérieures à la normale sont prélevés selon le mode opératoire de dosage. Les extraits sont dilués par du tampon d'extraction. Chaque dilution est ensuite dosée sur deux cassettes test suivant le mode opératoire de dosage, puis la moyenne est calculée pour chaque point du test. Les résultats démontrent une linéarité dans l'intervalle de mesure conseillé, 30 à 300 µg/g, du système de dosage Quantum Blue® fCAL pour l'ensemble des 4 échantillons ($R^2 = 0,986 - 0,995$). La Figure 3 illustre l'un des exemples. La différence moyenne entre les concentrations mesurées et attendu est de 2 %, ce qui correspond à une récupération de 98 %. La récupération des 4 échantillons varie de 84 à 114 % de CV.

Récupération : 92 %. Quatre échantillons de selles comportant des taux faibles de calprotectine ont été additionnés avec différentes quantités de couches leucocytaires humaines diluées contenant des concentrations élevées de calprotectine. Chaque échantillon a été mesuré avant et après ajout de la couche sur deux cassettes test différentes selon la procédure de dosage. Les résultats sont présentés dans le tableau 15. La récupération varie de 83-105 %.

Répétabilité : 15.5 % - 22.2 % CV. La répétabilité du dosage Quantum Blue® fCAL est calculée à partir de 2 échantillons d'extraits de selles contenant 49 et 138 µg/g de calprotectine. Chaque échantillon est analysé selon le mode opératoire de dosage, en une analyse à raison de 20 réplicas préparés en 10 minutes chacun. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de cassettes test sont répertoriées dans le tableau 14. La répétabilité des 4 échantillons varie de 20,2 à 24,5 % de CV.

Précision inter-lots : 20.2 - 24.5 % CV. La précision inter-lots du système de dosage Quantum Blue® fCAL a été calculée à partir de 4 échantillons d'extraits de selles dont les valeurs de la calprotectine sont comprises entre 30 et 244 µg/g. Chaque échantillon a été mesuré selon le mode opératoire de dosage sur 3 analyses indépendantes à raison de 10 à 20 réplicas préparés en 10 minutes chacun, avec 3 lots de cassettes test différentes. Les valeurs inter-lots des 4 échantillons varient de 20,2 à 24,5 % de CV.

Comparaison des méthodes : $R^2 = 0,806$; $y = 1,02x - 11,1$ µg/g. 101 extraits de selles de sujets soumis à un diagnostic de différenciation entre MICI et SCI et présentant des concentrations en calprotectine dans l'intervalle de mesure conseillé du système de dosage Quantum Blue® fCAL sont analysés selon le mode opératoire de dosage avec un jeu de données obtenu à partir de cassettes test de six lots différents. Les résultats sont ensuite comparés aux valeurs obtenues avec le dosage ELISA BÜHLMANN fCAL® (référence : EK-CAL). Les résultats de corrélation sont illustrés sur la Figure 4.

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane impiegato come aiuto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come aiuto per la diagnosi nel distintivo organico delle malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale (malattia infiammatoria intestinale, MII (IBD) (ref. 1-6), ad es. 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 (ref. 7-8).

Per esclusivo uso di 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, viene 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 vengono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

	Quantità	Codice	Commenti
Card 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-LFCAL- CONSET	Pronto all'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-LFCAL- RCC	Carta RFID bianca

Tabella 7

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

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.

Dispositivo CALEX® Cap	50, 200 o 500 dispositivi contenenti 5 mL di tampone di estrazione, pronto all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
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 8

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

PRECAUZIONI**Precauzioni di sicurezza**

- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone prassi di laboratorio (BPL).
- 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 card 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 test Quantum Blue® fCAL (CAL_0 o CAL_720) prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID bianca per modificare i parametri del test specifici per ogni 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

- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro alcune ore e non possono essere conservati più a lungo.
- È importante che gli estratti con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3.000 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.
- 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 1:1.6 con il tampone di estrazione (es. 200 µL di estratto e il 120 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).

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 µL e 1 mL
- 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

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 BÜHLMANN CALEX® Cap è stabile a temperatura ambiente 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 1:16 con il tampone di estrazione (es. 20 µL di estratto e il 300 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: <CAL_720> e <CAL_0>. Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno di questi metodi.

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

3.1 Metodo <CAL_720> con timer interno

- Caricare la card sul supporto per cassetta test del Reader.
- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella card.
- Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 12 minuti (720 secondi).
- Per i controlli basso / alto: Ripetere il punto 3.1 utilizzando 60 µL di controllo, invece di campione di siero diluito.

3.2 Metodo <CAL_0> senza timer interno

- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella card.
- Incubare per 12 minuti +/- 1 minuto (impostare un timer manuale).
- Caricare la card sul supporto per cassetta test del Reader.
- Scansionare la cassetta con il Quantum Blue® Reader premendo il pulsante (<ENTER>) immediatamente.
- Per i controlli basso / alto: Ripetere il punto 3.2 utilizzando 60 µL di controllo, invece di campione di siero diluito.

Importante: Consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il 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 precisione 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 timer, 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 12 minuti di 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 12 minuti di 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 12 minuti di incubazione (Figura 1C), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1D), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- 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 12 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.

STANDARDIZZAZIONE

- Il dosaggio a flusso laterale è stato standardizzato utilizzando come riferimento il saggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL).
- Il BÜHLMANN 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 mediani ($n \geq 10$ misurazioni ciascuna) da almeno 10 punti di taratura ottenuti da diversi campioni fecali con concentrazioni note di calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 30 e 300 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni superiore a 300 µg/g possono essere rianalizzati con il saggio BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (codice: LF-CHR25).

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL è utilizzato per la determinazione dei livelli di calprotectina in soli campioni di feci umane.
- I valori di calprotectina dovrebbero essere utilizzati come ausilio supplementare a disposizione del medico per effettuare una diagnosi.

- Prima di prendere qualsiasi decisione clinica e/o terapeutica, il risultato del test della calprotectina ottenuto con il dosaggio BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL può essere confermato misurando altri biomarcatori (come ad esempio la proteina reattiva C) o ripetendo il test della calprotectina (con BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL) o utilizzando una seconda card) e confrontando i risultati con il punteggio CDAI e lo stato clinico del paziente.
- I pazienti che assumono regolarmente FANS possono avere un aumento nei loro livelli della calprotectina fecale.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La determinazione della calprotectina fecale è un metodo affidabile e semplice per distinguere tra patologie gastrointestinali organiche e funzionali.

I dati seguenti sono stati ottenuti con il BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL) (Tabella 13). In uno studio clinico sono stati valutati 401 pazienti sintomatici consecutivi in attesa di colonscopia. All'esame endoscopico, 273 pazienti sono risultati affetti da patologie funzionali, mentre 128 pazienti presentavano svariate patologie organiche (colite, morbo di Crohn, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, neoplasie maligne o malattie infettive).

L'analisi della curva ROC (AUC: 0,935) ha evidenziato un valore soglia clinico ottimale a 50 µg/g. Applicando tale valore soglia, nella differenziazione tra patologie organiche e funzionali si ottengono valori di sensibilità e specificità clinica dell'84,4 % e del 94,5 %, rispettivamente. I valori soglia indicati per gli adulti (<50 µg/g) possono essere utilizzati anche per i bambini di età compresa tra 4 e 17 anni, indipendentemente dal sesso (ref. 7). Mentre negli adulti e nei bambini i livelli di calprotectina fecale sono paragonabili, i livelli riscontrati nei neonati possono essere aumentati in misura significativa (ref. 6).

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

Valori <50 µg/g:

I valori di calprotectina <50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Per pazienti con bassi livelli di calprotectina probabilmente non sono necessarie ulteriori procedure invasive per determinare le cause dell'infiammazione (ref. 4).

Valori tra 50 µg/g e 200 µg/g:

I valori di calprotectina compresi tra i 50 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 range può suggerire di ripetere la misurazione e di eseguire ulteriori indagini.

Valori superiore 200 µg/g:

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICA

Limite del Bianco (LoB): <7 µg/g di calprotectina. Il LoB è stato stabilito in conformità con il protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A in tre sedute di analisi indipendenti utilizzando tre diversi lotti di card, con un totale di 60 valori di bianco, utilizzando il tampone di estrazione come campione.

Limite di rilevabilità (LoD): 15 µg/g di calprotectina. Il LoD è stato stabilito con due estratti fecali con concentrazioni comprese tra 14,5 e 28,5 µg/g. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di card in tre sedute di analisi indipendenti di 10 repliche ciascuna, programmata entro 10 minuti. Sono stati determinati i valori di SD mediati e da essi è stato calcolato il LoD in conformità con il Protocollo CLSI EP17-A

Limite di Quantificazione (LoQ):

LoQ inferiore ≤30 µg/g di calprotectina

LoQ superiore ≥300 µg/g di calprotectina

Il LoQ è stato stabilito con sette estratti fecali con concentrazioni comprese tra 14,5 e 622 µg/g. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di card in tre sedute di analisi indipendenti di 10 repliche, ciascuna programmata entro 20 minuti, e sono state quindi calcolate le medie. Il profilo di precisione risultante è mostrato in Figure 2. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di calprotectina con un'imprecisione inferiore al 25 % di CV, che consente una misurazione quantitativa nel range da 30 (LoQ inferiore) a 300 µg/g (LoQ superiore).

Linearità: Quattro campioni di feci con concentrazioni elevate di calprotectina sono stati estratti con la procedura prevista per il dosaggio. Gli estratti sono stati diluiti con tampone di estrazione e ciascuna diluizione è stata in seguito analizzata su due cartucce con la procedura prevista per il dosaggio e per ogni punto di misurazione è stata calcolata la media. I risultati hanno mostrato linearità all'interno dell'intervallo di misurazione indicato tra 30 e 300 µg/g del saggio Quantum Blue® fCAL per tutti e 4 i campioni ($R^2 = 0,986 - 0,995$). Un esempio è mostrato in Figure 3. La differenza media tra le concentrazioni misurate e osservate è stata del 3 % (recupero 98 %). La linearità del saggio dei 4 campioni varia tra 84-114 % CV.

Recupero: 92 %. Quattro campioni fecali con bassi livelli di calprotectina sono stati inoculati con quantità differenti di una soluzione stock di calprotectina ad elevate concentrazioni. Ogni campione è stato analizzato prima e dopo l'inoculo con due card differenti, secondo la procedura prevista per il dosaggio. I risultati sono riportati in tabella 15. Il recupero del saggio dei 4 campioni varia tra 83-105 % CV.

Ripetibilità: 15.5 - 22.2 % CV. La ripetibilità del saggio Quantum Blue® fCAL è stata calcolata da 2 campioni di estratti fecali contenenti 49 e 138 µg/g di calprotectina. Ciascun campione è stato controllato con la procedura prevista per il dosaggio in un seduta di analisi di 20 repliche programmate entro 10 minuti. I valori medi di tre diversi lotti di card sono presentati in tabella 14. La ripetibilità del saggio dei 4 campioni varia tra 15.5-22.2 % CV.

Precisione inter-lotto: 20.2 - 24.5 % CV. La precisione inter-lotto del saggio Quantum Blue® fCAL è stata calcolata da 4 campioni di estratti di feci contenenti tra 30 e 244 µg/g di calprotectina. Ciascun campione è stato controllato con la procedura prevista per il dosaggio in tre sedute di analisi indipendenti di 10-20 repliche ognuna, programmata entro 10 minuti, utilizzando tre diversi lotti di cartucce. I dati inter-lotto dei 4 campioni variavano tra 20,2-24,5 % CV.

Confronto dei metodi: $R^2 = 0,806$; $y=1.02x-11.1$ µg/g. 101 estratti fecali da pazienti sottoposti a indagine IBD contro IBS con concentrazioni di calprotectina all'interno dell'intervallo di misurazione indicato del saggio Quantum Blue® fCAL sono stati analizzati con la procedura prevista per il dosaggio utilizzando un insieme di dati originati da card di sei diversi lotti; i risultati sono stati confrontati con i valori ottenuti mediante la procedura di dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL). Le correlazioni sono illustrate in Figura 4.

INDICACIONES DE USO

El BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL 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, distinguiendo una enfermedad inflamatoria orgánica del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, por ejemplo la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa) (ref. 1-6) de una enfermedad funcional (síndrome del intestino irritable, SII), en pacientes con dolor abdominal crónico mayores de cuatro años (ref. 7-8).

Para uso de laboratorio únicamente.

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 oro anticaprotectina con calprotectina se une al anticuerpo anti-calprotectina que recubre una zona de la membrana de análisis (línea de test) mientras que el resto del conjugado de oro anticaprotectina libre se une al anticuerpo de cabra antirrátón que recubre asimismo otra zona de la membrana de análisis (línea de control). Las intensidades de señal de la línea de test y la línea de control se miden cuantitativamente con el lector 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-LFCAL- CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-LFCAL- RCC	Tarjeta de plástica blanca

Tabla 9

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

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIAMENTE 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 CALEX® Cap	50, 200 o 500 dispositivos, contienen 5 mL tampón de extracción, listos para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, constituyendo di espátulas y fondos	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción constituyendo di tubo, cono & punta dosificadora contienen 1.3 mL de tampón de extracción, listos para usar.	B-CAL-SO50

Tabla 10

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.

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a buenas prácticas de laboratorio (BPL) tomando las precauciones apropiadas.
- 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 lector Quantum Blue® debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de calprotectin (CAL_0 o CAL_720) antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue®).
- Utilizare la tarjeta blanca con chip RFID para modificare 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.
- Las muestras diluidas deberán utilizarse en un plazo de varias horas y no pueden conservarse durante un tiempo más prolongado.
- Es importante centrifugar los extractos con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ antes de la conservación (5 minutos a 3.000 x g). Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo. Con CALEX® Cap dispositivo puede almacenar los extractos directamente con el dispositivo. Para la reutilización / nueva medición de los extractos de ver el paso 2 en el capítulo Procedimiento del análisis.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Vórtex para la extracción de heces.
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 a 200 µL y 1 mL.
- Centrifuga.
- Tubos de 5 mL desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones los extractos
- Cronómetro (optativo).
- Lector Quantum Blue® Reader disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS).
- Pañuelos suaves o papel secante.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 1 g de muestra de heces para cada extracción.

Las muestras de heces se deberán recoger en tubos lisos.

Importante: La muestra debe tomarse sin adiciones químicas o biológicas

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 BÜHLMANN CALEX® Cap es estable a temperatura ambiente 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 DE 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™: Diluir los extractos de heces 1:16 con tampon de extracción (e.g. 20 µL extracto y 300 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Después de la extracción, dejar que el extracto de heces asiente durante 10 minutos con la cabeza blanca del dispositivo hacia abajo. Desenrosque la tapa de color azul e diluir el sobrenadante 1:1.6 con tampon de extracción (e.g. 200 µL extracto y 120 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso no. 3).

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

En el lector Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CAL_720> y <CAL_0>. Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

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

3.1. Método <CAL_720> con cronómetro interno

- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Añada 60 µL de muestra 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 12 minutos (720 segundos).
- Para Controles Bajo / Alto: Repita el paso 3.1 usando 60 µL de control en lugar de muestra de suero diluida.

3.2 Método <CAL_0> sin cronómetro interno

- Añada 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 12 minutos +/- 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Inicie el escaneo del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<ENTER>) inmediatamente.
- Para Controles Bajo / Alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de muestra de suero diluida.

Observación: Consulte el manual del lector 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 parámetros específicos del lote desde la tarjeta chip RFID para llevar a cabo análisis de las muestras.

CONTROL DE CALIDAD

- Si la precisión del análisis no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye los errores en la técnica, compruebe los siguientes puntos: i) pipeteado, control de 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 12 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 12 minutos de incubación (figura 1B), la cantidad de calprotectina presente en la muestra de heces se calcula mediante el lector Quantum Blue®.
- Si sólo la línea de test (T) es detectable después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Si ni la línea control (C) ni la línea de test (T) se detectan después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Como el lector Quantum Blue® 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 12 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN

- El análisis de flujo lateral se estandarize con BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® Reader de BÜHLMANN 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 medianos ($n \geq 10$ mediciones cada uno) de al menos 10 puntos de calibración obtenidos de diferentes muestras de heces con concentraciones conocidas de

calprotectina. El rango de ensayo es entre 30 y 300 µg/g.

- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por encima de 300 µg/g pueden repetirse con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (código: LF-CHR25).

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit de BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL están destinadas a la determinación de los niveles de calprotectina en sólo muestras de heces humanas.
- Los valores de calprotectina fecal deben utilizarse como datos complementarios para ayudar al médico a establecer un diagnóstico.
- Los resultados de análisis de calprotectina obtenidos con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL pueden confirmarse midiendo otros biomarcadores (como la proteína C reactiva) o repitiendo el análisis de calprotectina (con BÜHLMANN fCAL® ELISA o utilizando un segundo casete de análisis) y comparándolos con el índice CDAI y el estado clínico del paciente antes de tomar cualquier decisión clínica y/o terapéutica.
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener elevados los niveles de calprotectina fecal.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El cálculo de la calprotectina fecal es una manera fiable y sencilla de distinguir las enfermedades intestinales orgánicas de las funcionales. Se establecieron los siguientes datos con el ELISA de calprotectina de BÜHLMANN fCAL® (código para pedidos: EK-CAL). En un estudio clínico, se investigó a 401 pacientes consecutivos sintomáticos, programados para una colonoscopia (Table 13). El examen endoscópico mostró a 273 pacientes con enfermedades funcionales, mientras que 128 pacientes sufrían diversas enfermedades orgánicas (colitis, enfermedad de Crohn, ulceración, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer o enfermedades inflamatorias).

El análisis de la curva ROC (AUC: 0,935) dio como resultado un valor umbral óptimo de 50 µg/g. Al aplicar este valor umbral, se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 84,4 % y una especificidad del 94,5 % en la diferenciación entre enfermedades orgánicas y funcionales. El valor límite sugerido para los adultos (< 50 µg/g) puede usarse en los niños de 4 a 17 años, con independencia del sexo (ref. 7). Si bien las concentraciones fecales de calprotectina en los adultos y los niños son comparables, las concentraciones de los recién nacidos pueden estar significativamente aumentadas (ref. 6).

Estos datos respaldan la siguiente interpretación de los resultados:

Valores por debajo de 50 µg/g:

Estos valores de calprotectina <50 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. No es probable que pacientes con niveles bajos de calprotectina fecal precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (ref. 4).

Valores elevados entre 50 µg/g y 200 µg/g:

Los valores de calprotectina entre 50 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 >200 µg/g son indicativos de un trastorno orgánico activo con inflamación del tracto gastrointestinal. Sugieren llevar a cabo investigaciones adicionales apropiadas por parte de especialistas.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite para el blanco (LoB): <7 µg/g de calprotectina. El LoB se ha establecido de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A en tres series de lecturas independientes utilizando tres lotes diferentes de cassettes de análisis con un total de 60 valores para el blanco utilizando tampón de extracción como muestra.

Límite de Detección (LoD): 15 µg/g de calprotectina. El LoD se ha calculado a partir de dos extractos de heces con concentraciones de 14,5 y 28,5 µg/g. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de cassetes de análisis en tres series de lecturas independientes de 10 réplicas cada una configuradas en un intervalo de 10 minutos. Se determinaron los valores medios de SD para el cálculo del. El LoD ha sido calculado de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A

Límite de Cuantificación (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g de calprotectina

LoQ superior: ≥300 µg/g de calprotectina

El LoQ se ha establecido a partir de siete extractos de heces con concentraciones de entre 14,5 y 622 µg/g. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de cassetes de análisis en tres tandas de lecturas independientes de 10-20 réplicas cada una configuradas en un intervalo de 10 minutos, obteniéndose luego los valores medios. En la Figure 2 se muestra el perfil de precisión resultante. El límite de cuantificación corresponde a la concentración de calprotectina con una imprecisión inferior a 25 % CV, permitiendo mediciones cuantitativas en el rango de 30 (LoQ inferior) a 300 µg/g (LoQ superior).

Linealidad: Se extrajeron de acuerdo al procedimiento de ensayo cuatro muestras de heces con concentraciones elevadas de calprotectina. Los extractos se diluyeron con tampón de extracción y cada dilución se ensayó seguidamente con dos cassetes de análisis de acuerdo al procedimiento de ensayo, obteniéndose la media para cada punto de análisis. Los resultados mostraron linealidad dentro del rango de medición indicado de 30 a 300 µg/g del ensayo Quantum Blue® fCAL para la totalidad de las 4 muestras ($R^2 = 0,986 - 0,995$). En la Figure 3 se muestra un ejemplo. La diferencia media entre las concentraciones medidas y esperadas fue del 2 %, correspondiente a una recuperación del 98 %. La linealidad varía entre 84 y 114 %.

Recuperación: 92 %. A cuatro muestras de heces con concentraciones bajas de calprotectina se añadieron diferentes cantidades de una solución stock de

calprotectina altamente concentrada. Cada muestra se midió antes y después de añadir cantidades conocidas, en tres casetes de prueba diferentes, según el procedimiento del ensayo. Los valores medios obtenidos tras promediar los tres réplicas se presentan en la table 15. La recuperación varía entre 83 y 105 %.

Repetibilidad: 15.5 % - 22.2 % CV. La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® fCAL se calculó a partir de 2 muestras de heces extraídas que contenían 49 y 138 µg/g de calprotectina. Cada muestra se ensayó de acuerdo al procedimiento de ensayo en una tanda de lectura de 20 réplicas configurada en un intervalo de 10 minutos. En la tabla 14 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de casetes de análisis. La repetibilidad del ensayo varía entre 15.5 y 22.2 % CV

Precisión interlote: 20.2 - 24.5 % CV. La precisión interlote del ensayo Quantum Blue® fCAL se calculó a partir de 4 muestras de heces extraídas que contenían entre 30 y 244 µg/g de calprotectina. Cada muestra se ensayó de acuerdo al procedimiento de ensayo en tres tandas de lecturas independientes de 10-20 réplicas cada una configuradas en un intervalo de 10 minutos utilizando tres lotes diferentes de cassetes de análisis. Los datos interlote de las 4 muestras variaron entre 20,2 y 24,5 % CV.

Comparación de métodos: $R^2 = 0,806$; $y = 1.02x - 11.1$ µg/g. Se analizaron 101 extractos de heces de sujetos sometidos a pruebas para discernir EII de SII que presentaban concentraciones de calprotectina dentro del rango de medición indicado del ensayo Quantum Blue® fCAL, utilizando un conjunto de datos obtenidos con cassetes de análisis de seis lotes diferentes y se compararon los resultados con los valores obtenidos con el método ELISA para calprotectina de BÜHLMANN fCAL® (código para pedidos: EK-CAL). Los datos de correlación se ilustran en la Figure 4.

USO PRETENIDO

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL 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 inflamatórias intestinais [DII], p.ex., doença de Crohn ou colite ulcerativa [CU]) de doenças funcionais (síndrome do intestino irritável [SII]) (ref. 1-6), em pacientes com dor abdominal crônica com mais de quatro anos de idade (ref. 7-8).

Apenas para utilização laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antigénio da calprotectina mediante um imunoensaio 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 leitor BÜHLMANN Quantum Blue®.

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-LFCAL-CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1	B-LFCAL-RCC	Cartão de plástico branco

Tabela 11

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

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.

Dispositivo CALEX® Cap	50, 200 ou 500 dispositivos com 5 mL tampão de extração, pronto para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
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 12

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

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

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais (BPL).
- 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 leitor Quantum Blue® Reader tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL (CAL_0 o CAL_720), antes do início do teste (ver manual do leitor Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão branco RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de doentes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados erróneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente o amostra no tubo de extração.

- As amostras diluídas devem ser usadas dentro de poucas horas e não devem ser armazenadas por um período de tempo muito longo.
- É importante centrifugar os extratos com Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3.000 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo. Com CALEX® Cap dispositivo pode armazenamento os extratos diretamente com o dispositivo. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo Procedimento de Ensaio.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECEDOS

- Vortex para extração das fezes
- Pipetas com pontas descartáveis: 10-200 µL e 1 mL
- Centrífuga
- Tubos de propileno ou poliestereno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronômetro (opcional)
- Leitor Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

São necessários menos de 1g 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 BÜHLMANN CALEX® é estável à temperatura ambiente 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: 1:16 com tampão de extração (por exemplo:

20 µL do extrato e 300 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 no. 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 1:1.6 com tampão de extração (por exemplo: 200 µL do extrato e 120 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 no. 3.).

3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

Existem disponíveis dois métodos alternativos no leitor Quantum Blue® Reader: <CAL_720> e <CAL_0>. Selecione um deles antes de iniciar o processo de leitura. Proceda à leitura do cartão chip RFDI branco, de forma a atualizar os parâmetros específicos do lote.

3.1. Método <CAL_720> com cronômetro interno

- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Feche o dispositivo do cassete no leitor e inicie a medição pressionando ENTER (<START>).
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 12 minutos (720 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 <CAL_0> sem cronômetro interno

- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Incube durante 12 minutos +/-1 minuto (usando um cronômetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Precione ENTER (<START>) no leitor Quantum Blue® Reader para fazer a leitura da 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 leitor 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 a precisão do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições excluírem 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 leitor Quantum Blue® (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 12 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 12 min de incubação (Figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo leitor Quantum Blue®.
- Se apenas a Linha de Teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (Figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a Linha de Controlo (C) nem a Linha de Teste (T) forem detectáveis após 12 min de incubação (Figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o leitor Quantum Blue® 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 12 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- O teste de imunocromatografia está em conformidade de acordo com a BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O leitor BÜHLMANN 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 ($n \geq 10$ medições cada) de pelo menos 10 pontos de calibração obtidos a partir de diferentes amostras de fezes com concentrações de calprotectina conhecidas. A gama de calibração varia de 30 a 300 µg/g.
- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras superiores de 300 µg/g podem ser retestadas no BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (referência: LF-CHR25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL são destinados para a determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais apenas humanas.
- Os valores de calprotectina fecal podem ser utilizados pelo clínico como dado adicional no estabelecimento do diagnóstico.
- O resultado do teste da calprotectina obtido com o BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL pode ser confirmado com outros biomarcadores (p.e. Proteína C reactiva) ou por repetição da calprotectina (com BÜHLMANN fCAL® ELISA ou utilizando um segundo cassete) e comparado com o score CDAI e o estado clínico do doente antes de qualquer tomada de decisão clínica e/ou terapêutica.

- Pacientes que tomam NSAIDs regularmente podem apresentar elevações nos níveis de calprotectina fecal.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Calculando a calprotectina fecal é uma maneira confiável e simples de distinguir doenças intestinais funcionais orgânicas. As informações a seguir com BÜHLMANN fCAL® ELISA (código EK-CAL) foram estabelecidas. Em um estudo clínico, 401 pacientes sintomáticos consecutivos programados para colonoscopia (tabela 13) foi investigada. O exame endoscópico mostrou 273 pacientes com distúrbios funcionais, enquanto 128 pacientes que sofrem de várias doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, ulceração, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças inflamatórias).

Análise ROC (AUC: 0,935) Curva resultou num valor de limiar ótimo de 50 µg/g. Ao aplicar este limite, você pode chegar a uma sensibilidade clínica de 84,4 % e uma especificidade de 94,5 % na diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais. O valor limite sugerido para adultos (<50 µg/g) podem ser utilizados em crianças com idade entre 4-17 anos, independentemente do sexo (ref. 7). Enquanto concentrações anticálprotectina fecais em adultos e crianças são semelhantes, as concentrações de recém-nascidos pode ser significativamente aumentada (ref. 6).

Esses dados apoiam a seguinte recomendação para interpretação de resultados :

Valores inferiores a 50 µg/g:

Valores de calprotectina <50 µg/g não são indicativos de inflamação do trato gastrointestinal. No es probable que pacientes con niveles bajos de calprotectina fecal precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (ref. 4).

Valores elevados entre 50 e 200 µg/g:

Valores de calprotectina entre 50 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 >200 µg/g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação do trato gastrointestinal. Sugere-se procedimentos investigativos apropriados por especialistas.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Limite do Branco (LoB): <7 µg/g calprotectina. A LoB é estabelecida de acordo com o protocolo CLSI EP17-A em três séries de leituras independentes, utilizando três lotes diferentes de cassetes de teste com um total de 60 valores para o destino usando o tampão de extração como uma amostra.

Limite de Detecção (LoD): 15 µg/g calprotectina. O LoD foi calculado a partir de dois extratos de fezes com concentrações de 14,5 e 28,5 µg/g. As amostras foram medidas com três diferentes lotes de cassetes de teste em três séries de leituras independentes de 10 repetições cada conjunto em um intervalo de 10 minutos. Os valores médios SD de cálculo determinada. O LoD foi calculado de acordo com o protocolo do CLSI EP17-A

Limite de Quantificação (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g calprotectina

LoQ superior: ≥300 µg/g calprotectina

O LoQ é estabelecida a partir de sete extratos de fezes com concentrações entre 14,5 e 622 µg/g. As amostras foram medidas com três diferentes lotes de cassetes em três lotes leituras de análise de 10-20 repetições independentes cada conjunto em um intervalo de 10 minutos, em seguida, os valores médios obtidos. Na Figura 2, o perfil resultante é apresentada com precisão. O limite de quantificação corresponde à concentração de calprotectina em uma imprecisão inferior a 25 % CV, permitindo medições quantitativas na gama de 30 (inferior LoQ) de 300 µg/g (mais elevado LoQ).

Linearidade: Foram extraídos de acordo com o procedimento para o tamborete quatro amostras com concentrações elevadas de calprotectina. Os extractos foram diluídos com tampão de extração, e cada diluição foi testado com duas cassetes seguida de análise de acordo com o procedimento de ensaio, obtendo-se a média para cada ponto de análise. Os resultados mostraram linearidade na leitura da gama 30 a 300 µg/g de ensaio Quantum Blue® fCAL para todas as quatro amostras ($R^2 = 0,986-0,995$). Um exemplo é mostrado na Figura 3. A diferença média entre as concentrações esperadas e medidos foi de 2 %, o que corresponde a uma recuperação de 98 %. A linearidade em 84 a 114 %.

Recuperação de quantidades adicionadas: 92 %. Foram adicionados quatro amostras de fezes com baixas concentrações de calprotectina diferentes quantidades de uma solução de estoque de calprotectina altamente concentrada. Cada amostra foi medida antes e após a adição de quantidades conhecidas de duas cassetes de teste diferentes de acordo com o procedimento de ensaio. Os resultados são apresentados na tabela 15. A linearidade varia entre 83 e 105 %

Repetição: 15.5 - 22.2 % CV. La repetibilidade del ensaio Quantum Blue® fCAL são calculados a partir de amostras de fezes tomadas 2 contendo 49 e 138 µg/g de calprotectina. Cada amostra foi testada de acordo com o procedimento de ensaio de leitura de um lote de 20 réplicas definidos para um intervalo de 10 minutos. Na tabela 14, os valores médios a partir de três lotes diferentes de análises são apresentados cassetes. Respeitabilidade ensaio 4 amostras varia entre 15,5 e 22,2 % CV

Precisão Inter-lote: 20.2 - 24.5 % CV. A inter-monte Quantum Blue® fCAL ensaio foi calculada para calprotectina a partir de 4 de fezes amostras contendo entre 30 e 244 µg/g de calprotectina. Cada amostra foi testada de acordo com o procedimento de teste de três lotes de 10-20 leituras independentes replica cada configurados em um intervalo de 10 minutos, utilizando três lotes diferentes de cassetes de teste. As inter-lot 4 amostras de dados variou entre 20,2 e 24,5 % CV

Método comparativo: $R^2 = 0,806$; $y = 1.02x-11,1$ µg/g fezes extrai 101 indivíduos testados para distinguir IBD do IBS que tinham níveis anticalprotectina dentro da faixa de medição do ensaio indicado Quantum Blue® fCAL, usando um conjunto de dados obtidos a partir da análise de seis cassetes diferentes lotes foram analisados os resultados com os valores obtidos por ELISA para calprotectina BÜHLMANN fCAL® (código de EK-CAL) foram comparados. Os dados de correlação são mostrados na Figura 4.

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

Test Cassette Results

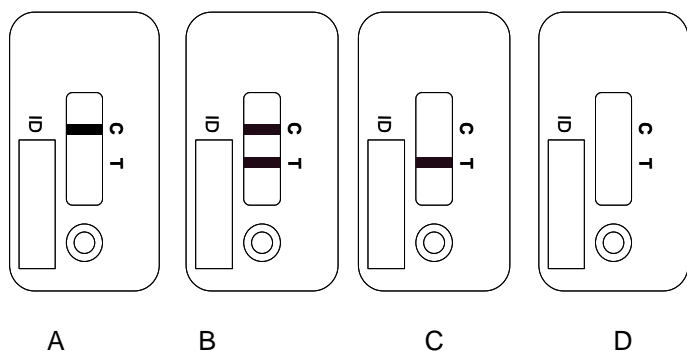


Figure 1

Clinical Study

	Calprotectin (EK-CAL)	Lactoferrin
n	401	391
cut-off	50 µg/g	3 µg/mL
Sensitivity	84.4 %	74.2 %
Specificity	94.5 %	91.0 %
PPV	87.8 %	79.3 %
NPV	92.8 %	88.4 %
LR+	15.4	0.17
LR-	8.25	0.28

Table 13

Precision (Repeatability)

Lot	Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
A	S1	47.8	10.6	22.2
A	S2	141.3	22.0	15.5
B	S1	50.1	10.0	20.1
B	S2	145.5	23.5	16.2
C	S1	50.0	10.3	20.6
C	S2	146.6	31.5	21.7
Mean				19.4

Table 14

Spiking Recovery

Sample	µg/g	spiked with [µg/g]	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
P1	53	25	62	78	79
		50	154	103	150
		100	143	153	94
		200	239	253	95
	Mean				105
P2	81	25	107	106	101
		50	120	131	91
		100	162	181	89
		200	265	281	94
	Mean				94
P3	56	25	77	81	94
		50	120	106	113
		100	110	156	71
		200	186	256	73
	Mean				88
P4	160	25	153	185	82
		50	191	210	91
		100	190	260	73
		200	305	360	85
	Mean				83
Mean					92

Table 15

Precision Profile

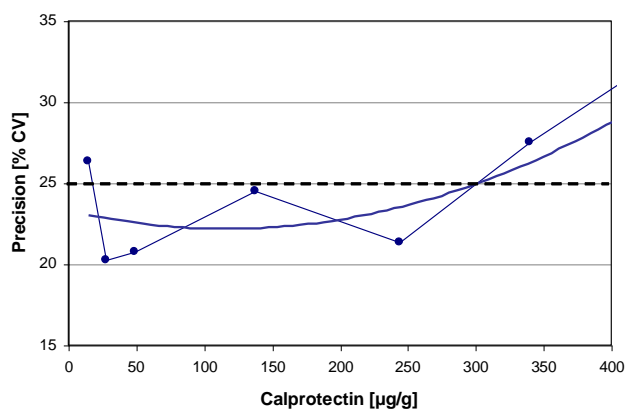


Figure 2

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

Linearity Plot

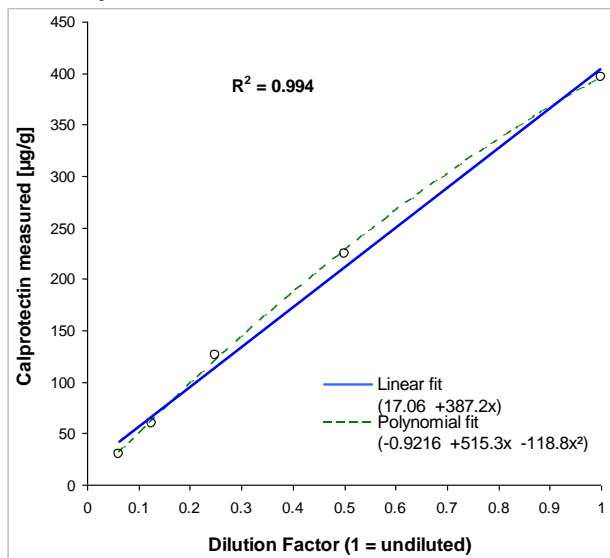


Figure 3

Method Comparison

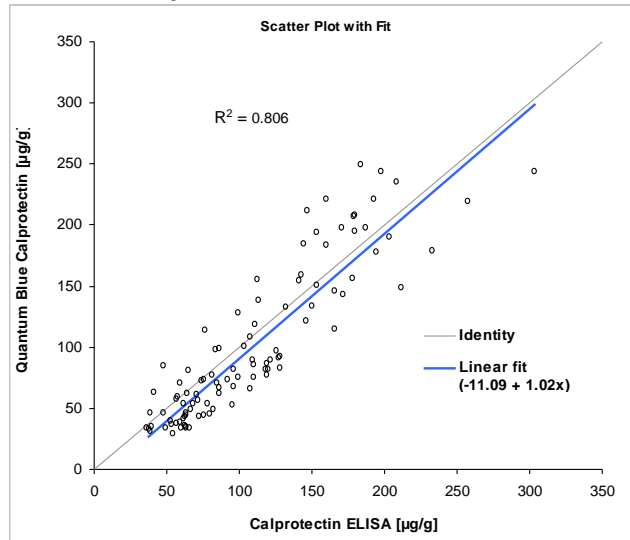












Figure 4

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. Qingling Zhu et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE **11** (3) (2016)
8. 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)

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Test Cassette Testkassette Cassette de testi Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba
	Extraction Buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción
	<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>
	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip