



Quantum Blue[®] fCAL extended

**Quantitative
Lateral Flow Assay**

LF-CALE25

25 tests

Revision date: 2016-11-09

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid in the assessment of intestinal mucosal inflammation. The 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), and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 9-10).

For professional use only*.

*Canada, Taiwan: For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test is designed for the selective measurement of calprotectin antigen by sandwich immunoassay. A monoclonal capture antibody (mAb) 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; Test Band) and the remaining free anti-calprotectin gold conjugate binds to the goat anti-mouse antibody coated on the test membrane (Control Line; Control Band). 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-LFCALUS-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-CALE-CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC720	Green 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

- None of the reagents of this assay contains components of human origin.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation can occur.
- Unused solution should be disposed of according to local state and federal regulations.

Technical Precautions

Kit Components

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

Assay Procedure

- Read carefully the instructions prior to carrying out the assay. Assay 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 extended: B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720, before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the 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 3000 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 the chapter assay procedure.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

If the Extraction Devices are used (refer to Table 2), less than 1 g of native stool will be required.

Collect stool samples into plain tubes. The samples can be stored refrigerated at 2-8 °C for at least 6 days.

The extracts are stable for at least 7 days at 2-8 °C and for at least 24 months at ≤-20 °C.

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

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™: Let the stool extract settle for 10 minutes after extraction. Dilute the supernatant 1:10 with Extraction Buffer (e.g. 50 µL stool extract and 450 µL Extraction Buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step no. 3).
- CALEX® Cap Device: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down. Unscrew the blue cap. The supernatant can be used without further dilution in the lateral flow assay.

3. Lateral Flow Assay Procedure and Readout:

Two alternative methods can be loaded from the respective RFID Chip card: B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720. Select one of the RFID chip cards before starting the experiments. Load the test method from the RFID Chip Card.

3.1. Method <B-CALE-RCC720> with internal timer

- Use the green plastic card.
- 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 Test 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 with 60 µL controls instead of diluted stool extract.

3.2. Method <B-CALE-RCC> without internal timer

- Use the white plastic card.
- 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 Test Cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) button immediately.
- For Low / High Controls: Repeat step 3.2 with 60 µL controls 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 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 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 AND INTERPRETATION OF RESULTS

- The Quantum Blue® fCAL is calibrated with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL).
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the calprotectin concentration. The assay range is between 30 and 1000 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 1000 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 extended 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 extended 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.

EXPECTED VALUES

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, 344 symptomatic patients were compared with endoscopic findings. Endoscopy examination showed 264 patients with functional diseases, whereas 80 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulceration, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases) (ref. 9). ROC curve analysis (AUC: 0.962) resulted in an optimal clinical cut-off at 50 µg/g. Applying this cut-off, a clinical sensitivity and specificity of 88.8 % and 93.6 %,

respectively can be reached in the differentiation between organic and functional diseases (Table 13). Fecal calprotectin levels from adults and children are comparable, whereas 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 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 and curative procedures by specialists are suggested.

The cut-off level suggested for adults (50 µg/g) can be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref.7).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <20 µg/g calprotectin.

Limit of Detection (LoD): <30 µg/g calprotectin.

Limit of Quantification (LoQ):

Lower LoQ: ≤30 µg/g calprotectin.

Upper LoQ: ≥1000 µg/g calprotectin.

The LoQ has been established with 14 stool samples. 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 1000 µg/g (upper LoQ).

Linearity: The results showed linearity within the indicated measuring range of 30 to 1000 µg/g of the Quantum Blue® fCAL extended assay for all samples.

Recovery: The recovery varied between 90.6 %-101.8 %.

Repeatability: 20.1 % mean CV. The repeatability was calculated from 8 stool extract samples. The mean values of three different lots of Test Cassettes are presented in (Table 14). The repeatability varied between 17.9 %-23.9 % CV.

Inter-lot Precision: 20.8 % mean CV. The inter-lot precision of the Quantum Blue® fCAL extended assay was calculated from 8 stool extract samples containing between 30 and 1000 µg/g calprotectin. The inter-lot data of the samples varied from 16.1 %-24.1 % CV.

Method Comparison: $R^2 = 0.94$; $y = 1.05-3.91 \mu\text{g/g}$

50 stool samples exhibiting calprotectin concentrations within the indicated measuring range of the Quantum Blue® fCAL extended assay were analyzed according to the assay procedure and compared with the values obtained by the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). The correlation data are illustrated in Figure 3.

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended ist ein *in vitro* Diagnostest, für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben und ist zur Unterstützung der Beurteilung einer Entzündung der Darmschleimhaut vorgesehen. Die Testergebnisse können zur Unterstützung dienen bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen, entzündlichen Erkrankung des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen; z.B. Morbus Crohn; oder Colitis ulcerosa) von einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (Ref. 1-6) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (Ref. 7-8). Die Testergebnisse können auch zur Unterstützung bei der Überwachung entzündlicher Darmerkrankungen (Ref. 9-10) verwendet werden.

Nur zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal geeignet.*

*Canada, Taiwan: Nur für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

Das Testprinzip beruht auf der selektiven Messung von Calprotectin mittels 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 (Testlinie; Testbande). Das verbleibende nicht gebundene Anti-Calprotectin Goldkonjugat wird von einem Ziege-Anti-Maus Antikörper gebunden, welcher ebenfalls auf die Membran gebunden wurde (Kontrolllinie; 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-LFCALUS-TC	Vakuumdicht In einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche, 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen Tief* / Hoch*	2 Fläschchen, 0,5 mL	B-CHR-CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC	Weisse Plastikkarte
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC720	Grüne 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 werden zur Stuhlextraktion benötigt, aber nicht mitgeliefert und müssen zusätzlich zum Kit bestellt werden.

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

- Keines der Kitbestandteile enthält Material menschlicher Herkunft.
- Alle Patientenproben sollten gemäß „Gute Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung auftreten.
- Unbenutzte Lösungen sollten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kitkomponenten

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

Testablauf

- Lesen Sie die Bedienungsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von der beschriebenen Arbeitsanleitung abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Quantum Blue® fCAL extended Test: B-CALE-RCC bzw. B-CALE-RCC720 muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die 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 enthaltene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Verdünnte Extrakte sollten innerhalb einiger Stunden bearbeitet 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 für 5 Min. bei 3000 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 / erneuten 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

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Für die Stuhlextraktion mit einem Extraktionsbesteck wird weniger als 1 g native Probe benötigt (Tabelle 4).

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden und kann mindestens 6 Tage bei 2-8 °C gelagert werden.

Die Extrakte sind für mindestens 7 Tage bei 2-8 °C und mindestens 24 Monate bei -20 °C stabil.

Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit chemischen oder biologischen Zusätzen versetzt werden.

ARBEITSANLEITUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritten:

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 1:10 verdünnen (z.B. 50 µL Extrakt + 450 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird (Schritt Nr. 3).
- CALEX® Cap Device: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten mit dem weissen Verschluss nach unten sedimentieren lassen. Der Überstand kann dann ohne weitere Verdünnung in dem Lateral Flow Testablauf verwendet werden.

3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung

Es können zwei alternative Methoden von der jeweiligen RFID-Chipkarte geladen werden. B-CALE-RCC oder B-CALE-RCC720. Wählen Sie eine der RFID-Chipkarten vor dem Start der Experimente. Laden Sie die testspezifischen Parameter von der RFID Chipkarte.

3.1 Methode <B-CALE-RCC720> mit internem Zeitmesser

- Verwenden Sie die grüne Chipkarte.
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden.
- 60 µL verdünntes Extrakt 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 Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

3.2 Methode <B-CALE-RCC> ohne internen Zeitmesser

- Verwenden Sie die weisse Chipkarte.
- 60 µL verdünntes Extrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Die Kassette für 12 +/-1 Minuten inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden und Lesevorgang durch Drücken auf den Start (<ENTER>) Knopf starten.
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

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

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb den erwarteten Bereichen 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 Abbildungen 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 12 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Abbildung 1A), bedeutet dies, dass Calprotectin nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar ist, wird die Calprotectinkonzentration in der Stuhlprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation nur die Testbande (T) sichtbar ist (Abbildung 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar sind (Abbildung 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation von 12 Minuten einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG UND INTERPRETATION DER RESULTATE

- Der Lateral Flow Test wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL® ELISAs kalibriert (Art.-Nr.: EK-CAL).
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectinkonzentration eine lot-spezifische Standardkurve. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 1000 µg/g.
- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, können Proben über 1000 µg/g mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL Assay high range (order Code: LF-CHR25) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Quantum Blue® fCAL extended Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.
- Fekale Calprotectinwerte sollten als zusätzliches Hilfsmittel genutzt werden, um die Diagnosestellung des Arztes zu erleichtern.
- Ein Wert, der mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended 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 NSAIDs einnehmen, haben möglicherweise erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl.

ERWARTETE WERTE

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 wurden fäkale Calprotectinwerte von 344 symptomatischen Patienten mit endoskopischen Ergebnissen verglichen.

Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 264 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 80 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen) (Ref. 9).

Die ROC Analyse (AUC: 0,962) ergab einen optimalen klinischen Cut off von 50 µg/g Calprotectin. Bei Anwendung dieses Grenzwertes kann eine klinische Spezifität von 88,8 % und eine Sensitivität von 93,6 % erreicht werden. (Tabelle 13).

Calprotectinwerte 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 µg/g:

Calprotectinwerte <50 µg/g schliessen eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes weitgehend aus. 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 µg/g:

Calprotectinwerte zwischen 50 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Da eine geringe Entzündungsaktivität vorhanden ist, empfehlen sich eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectinwerte >200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch einen Gastro-enterologen und therapeutische Massnahmen werden empfohlen.

Der für Erwachsene empfohlene Cut-off Wert von 50 µg/g kann auch für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden, unabhängig von deren Geschlecht (Ref. 7).

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <20 µg/g Calprotectin.

Limit of Detection (LoD): <30 µg/g Calprotectin.

Limit of Quantification (LoQ):

Unterer LoQ: ≤30 µg/g Calprotectin

Oberer LoQ: ≥1000 µg/g Calprotectin

Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von 14 Stuhlextrakten. Das entsprechende Präzisionsprofil ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Nachweisgrenze entspricht derjenigen Calprotectinkonzentration, die eine Streuung von <25 % CV zeigt und damit eine quantitative Bestimmung innerhalb eines Bereiches von 30 (unterer LoQ) bis 1000 µg/g (oberer LoQ) ermöglicht.

Linearität: Die Ergebnisse zeigen eine Linearität der Ergebnisse innerhalb des angegebenen Messbereiches von 30 bis 1000 µg/g für alle Quantum Blue® fCAL extended Test Proben.

Wiederfindung: Die Wiederfindung variierte zwischen 90,6 %-101,8 %.

Wiederholbarkeit (Repeatability): 20,1 % CV. Die Repeatability des Quantum Blue® fCAL extended Tests wurde berechnet mit Hilfe von 8 Stuhlextrakten. Die Mittelwerte von 3 verschiedenen Lots von Testkassetten werden in Tabelle 14 dargestellt. Die Repeatability liegt zwischen 17,9 %-23,9 % CV.

Inter-Lot Präzision: 20,8 % CV. Die Inter-Lot Präzision der Quantum Blue® fCAL extended Tests wurde berechnet mit Hilfe von 8 Stuhlextrakten mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 30 und 1000 µg/g. Die errechneten CVs lagen zwischen 16,1 % und 24,1 %.

Methodenvergleich: $R^2 = 0,94$; $y = 1,05-3,91 \mu\text{g/g}$

50 Stuhlextrakte von Patienten, die Messwerte innerhalb des angegebenen Quantum Blue® fCAL extended Test Messbereiches zeigten, wurden gemäß der Anleitung angesetzt, gemessen und mit den Ergebnissen verglichen, die im BÜHLMANN fCAL® ELISA (Bestellcode: EK-CAL) gewonnen wurden. Die Korrelation wird in Abbildung 3 dargestellt.

UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended est un test diagnostique *in vitro* de dosage quantitatif de la calprotectine dans les échantillons de selles humaines. Son but est d'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 souffrant de douleurs abdominales chroniques (réf. 7-8) – 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) d'une maladie fonctionnelle (syndrome de l'intestin irritable, SII) (réf. 1-6) et, d'autre part, à la surveillance d'une MICI (réf. 9-10).

Uniquement pour utilisation professionnelle*.

*Canada, Taiwan : Utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'antigène de la calprotectine par un dosage immunologique de type sandwich. Un anticorps monoclonal de capture (mAb) hautement spécifique de la calprotectine est déposé sur la membrane test. Un second anticorps monoclonal, conjugué à de l'or colloïdal permettant la détection, est présent sur la bande de libération du conjugué. Il est libéré dans le système après ajout de l'échantillon de selle extrait et dilué. Le conjugué calprotectine/anti-calprotectine-or se lie à l'anticorps anti-calprotectine déposé sur la membrane test (ligne test) et le restant du conjugué or anti-calprotectine 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-LFCALUS-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon d'extraction	1 flacon 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas* / Élevé*	2 flacons, 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC720	Carte en plastique verte

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-C200
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

- Aucun des réactifs de ce test ne contient de composants d'origine humaine.
- Les échantillons des patients doivent être manipulés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- **Réactifs** : Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau pour éviter tout risque d'irritation.
- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

Précautions techniques

Composants du kit

- Tous les réactifs et échantillons à tester doivent être équilibrés à température ambiante (18-28 °C) avant de démarrer le dosage.
Bien mélanger (vortex) les réactifs avant utilisation.
- 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 Quantum Blue® fCAL extended: B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720, avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID 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 extrémités jetables : 10, 200 µL et 1 mL
- Centrifugeuse
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène de 5 mL
- Minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Papier absorbant

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure nécessite moins de 1 g de selle native par extraction en utilisant un dispositif d'extraction (tableau 6). Le prélèvement de selles se fait dans des tubes ordinaires. Elles se conservent au réfrigérateur à 2-8 °C au moins 6 jours.

Les extraits sont stables pendant au moins 7 jours à 2-8 °C et au moins 24 mois à -20 °C.

Important : Les échantillons doivent être prélevés sans additifs.

PROCÉDURE 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 1/10ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 50 µL d'extrait et 450 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons 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. Le surnageant peut être utilisé sans autre dilution dans l'essai en flux latéral.

3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective < B-CALE-RCC720 > et < B-CALE-RCC >. Sélectionnez l'une des cartes à puce RFID avant de procéder au test.

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

3.1. Méthode < B-CALE-RCC720 > avec minuteur interne

- Utilisez la carte en plastique verte.
- 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 s).
- Pour les Contrôles Bas / Élevé : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.

3.2. Méthode < B-CALE-RCC > sans minuteur interne

- Utilisez la carte en plastique blanche.
- Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incubé pendant 12 +/- 1 minutes en utilisant un minuteur externe.
- Charger la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette en appuyant sur le bouton de démarrage du lecteur Quantum Blue®.
- Pour les Contrôles Bas / Élevé : Répéter l'étape 3.2 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.

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

CONTROLE DE QUALITÉ

- 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 lecteur Quantum Blue® 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 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 calibré avec 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. La gamme de mesure se situe entre 30 et 1000 µg/g.

- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs au-dessus à 1000 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (code de commande : LF-CHR25).

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse Quantum Blue® fCAL extended sont uniquement destinés à la détermination des taux de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- 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 qui prennent des AINS de façon régulière 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). Au cours d'une étude clinique, les valeurs de calprotectine fécale de 344 patients symptomatiques ont été comparées aux résultats des investigations endoscopiques.

L'examen endoscopique a montré que 264 patients présentent des maladies fonctionnelles alors que 80 patients présentent des maladies organiques diverses (colites, maladie de Crohn, ulcères, diverticules, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses) (réf. 9).

L'analyse de la courbe ROC (aire sous la courbe AUC : 0.962) montre une valeur seuil clinique optimale à 50 µg/g. En appliquant cette valeur seuil, une sensibilité clinique et une spécificité, respectivement, de 88.8 % et 93.6 %, ont été atteintes dans la différenciation des maladies organiques et fonctionnelles (voir tableau 13).

La concentration de calprotectine dans les selles est comparable chez les adultes et les enfants, tandis qu'elle peut augmenter de façon significative chez les nouveau-nés (réf. 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 et de mettre en place un traitement curatif sous le suivi de médecins spécialistes.

La valeur seuil proposée pour les adultes (50 µg/g) peut également être utilisée comme référence chez les enfants âgés de 4 à 17 ans, quel que soit le sexe (réf. 7).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LoB) : < 20 µg/g de calprotectine.

Limite de détection (LoD) : <30 µg/g de calprotectine.

Limite de quantification (LoQ) :

LoQ inférieure : ≤ 30 µg/g de calprotectine

LoQ supérieure : ≥ 1000 µg/g de calprotectine

La LoQ est obtenue à partir de 14 extraits de selles. 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 1000 µg/g (LoQ supérieure).

Linéarité : Les résultats démontrent une linéarité dans l'intervalle de mesure conseillé, 30 à 1000 µg/g, du système de dosage Quantum Blue® fCAL extended pour l'ensemble des échantillons.

Récupération : La récupération varie de 90.6 %-101.8 %.

Répétabilité : 20.1 % de CV. La répétabilité du dosage Quantum Blue® fCAL extended est calculée à partir de huit échantillons d'extraits de selles. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de cassettes test sont répertoriées dans le tableau 14. La répétabilité des échantillons varie de 17.9 % à 23.9 % de CV.

Précision inter-lots : 20.8 %. La précision inter-lots du système de dosage Quantum Blue® fCAL extended a été calculée à partir de huit échantillons d'extraits de selles dont les valeurs de la calprotectine sont comprises entre 30 et 1000 µg/g. Les valeurs inter-lots des échantillons varient de 16.1 % à 24.1 % de CV.

Comparaison des méthodes : $R^2 = 0.94$; $y = 1.05-3.91 \mu\text{g/g}$. 50 extraits de selles et présentant des concentrations en calprotectine dans l'intervalle de mesure conseillé du système de dosage Quantum Blue® fCAL extended sont analysés selon le mode opératoire de dosage. Les résultats sont ensuite comparés aux valeurs obtenues avec le dosage BÜHLMANN fCAL® ELISA (référence : EK-CAL). Les résultats de corrélation sont illustrés sur la figure 3.

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina umana nei campioni di feci impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto per la diagnosi nel distinguere delle malattie infiammatorie organico del tratto gastrointestinale (malattia infiammatoria intestinale, MII (IBD) (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). Inoltre contribuisce al monitoraggio dello stato della malattia IBD (ref. 9-10).

Solo per uso professionale*.

*Canada, Taiwan: Solo per uso nel laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione quantitativa dell'antigene calprotectin 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 del segnale della banda di rilevazione e della banda di controllo vengono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Card di rilevazione	25 unità	B-LFCALUS-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-CALE-CONSET	Pronto all'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC	Carta RFID bianca
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC720	Carta RFID verde

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

- Nessuno dei reagenti di questo test contiene componenti di origine umana.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone prassi di laboratorio (BPL).
- **Reagenti:** Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbe verificarsi irritazione.
- La soluzione inutilizzata va smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18-28 °C) prima di iniziare l'analisi. Miscelare bene (con vortex) i reagenti primi dell'uso.
- 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 Quantum Blue® fCAL extended: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720, prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID 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.

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 suggeriti (vedere tabelle 8) la procedura richiede meno di 1 g di feci native per l'estrazione.

Prelevare il campione di feci in provette o contenitori. I campioni possono essere conservati a 2-8 °C per 6 giorni. Gli estratti sono stabili a 2-8 °C per almeno 7 giorni e a ≤-20 °C per almeno 24 mesi.

Importante: il campione deve essere prelevato senza l'aggiunta di additivi chimici o biologici nel dispositivo di raccolta.

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 stabilizzarsi l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:10 con il tampone di estrazione (es. 50 µL di estratto e il 450 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Dopo l'estrazione, fare stabilizzarsi l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti con l'estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu. Il supernatante può essere utilizzato senza ulteriore diluizione nel test a flusso laterale.

3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:

Due metodi alternativi possono essere caricati dalla rispettiva carta chip RFID: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Selezionare una delle carte chip RFID prima di iniziare gli esperimenti. Caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID.

3.1 Metodo < B-CALE-RCC720 > con timer interno

- Utilizzare la carta di plastica verde.
- Caricare la cassetta nell' apposito vano a scorrere per cassetta del lettore.
- 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 del estratto di feci diluito.

3.2 Metodo < B-CALE-RCC > senza timer interno

- Utilizzare la carta di plastica bianca.
- 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 cassetta nell' apposito vano a scorrere per cassetta del lettore.
- Scansionare la cassetta con il Quantum Blue® Reader premendo immediatamente il pulsante (<ENTER>).
- Per i Controlli Basso / Alto: Ripetere il punto 3.2 utilizzando 60 µL di controllo, invece del estratto di feci diluito.

Importante: Consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il 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 risultato del 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 calprotectin 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 calprotectin deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- 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 calprotectin deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 12 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectin deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

STANDARDIZZAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Il dosaggio a flusso laterale è stato calibrato 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. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 30 e 1000 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni superiori a 1000 µg/g possono essere rianalizzati con il saggio BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (codice: LF-CHR25).

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL extended sono ottimizzati per la determinazione di livelli di calprotectina solamente in campioni fecali umani.
- 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 rapido BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL può essere confermato misurando altri biomarcatori (come ad esempio la proteina reattiva C) o ripetendo il test della BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL, o utilizzando una seconda cassetta) 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.

VALORI ATTESI

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 condotto su 344 pazienti sintomatici, sono stati confrontati i valori calprotectina umana con gli esami endoscopici.

L'esame endoscopico ha mostrato 264 pazienti con malattie gastrointestinali funzionali, mentre 80 pazienti con varie malattie organiche (colite, Crohn's, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, cancro o malattie infettive) (ref. 9).

L'analisi della curva ROC (AUC 0.962) ha evidenziato un valore soglia clinico ottimale di 50 µg/g. Applicando il valore (soglia), viene raggiunta una sensibilità di 88.8 % e specificità clinica di 93.6 %. Ciò rende possibile la differenziazione tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche (vedi tabella 13).

La concentrazione di calprotectina nelle feci è comparabile in adulti e bambini, mentre nei neonati può essere significativamente più elevata (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 e curative eseguite da specialisti.

La soglia suggerito per gli adulti (50 µg/g) può essere anche usato per i bambini con età compresa tra i 4 e i 17 anni senza differenziazione di sesso (ref. 7).

PERFORMANCE CARATTERISTICA

Limite del Bianco (LoB): <20 µg/g di calprotectina.

Limite di rilevabilità (LoD): <30 µg/g di calprotectina.

Limite di Quantificazione (LoQ):

LoQ inferiore ≤30 µg/g di calprotectina

LoQ superiore ≥1000 µg/g di calprotectina

Il LoQ è stato stabilito con 14 estratti fecali. Il profilo di precisione risultante è mostrato in figura 2. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di calprotectina con un'impresione inferiore al 25 % di CV, che consente una misurazione quantitativa nel range da 30 (LoQ inferiore) a 1000 µg/g (LoQ superiore).

Linearità: I risultati mostrano una linearità all'interno dell'intervallo di misurazione indicato tra 30 e 1000 µg/g del saggio Quantum Blue® fCAL extended per tutti i campioni.

Recupero: Il recupero del saggio dei campioni varia tra 90.6 % e 101.8 %.

Ripetibilità: 20.1 % di CV. La ripetibilità del saggio Quantum Blue® fCAL extended è stata calcolata da otto campioni di estratti fecali. I valori medi di tre diversi lotti di card sono presentati nella tabella 14. La ripetibilità del saggio dei campioni varia tra 17.9 % e 23.9 % CV.

Precisione inter-lotto: 20.8 % di CV. La precisione inter-lotto del saggio Quantum Blue® fCAL extended è stata calcolata da otto campioni di estratti di feci contenenti tra 30 e 1000 µg/g di calprotectina. I dati inter-lotto dei campioni variavano tra 16.1 % e 24.1 % CV.

Confronto dei metodi: $R^2 = 0.94$; $y = 1.05-3.91 \mu\text{g/g}$.

50 estratti fecali da pazienti con concentrazioni di calprotectina all'interno dell'intervallo di misurazione indicato del saggio Quantum Blue® fCAL extended sono stati analizzati con la procedura prevista per il dosaggio; i risultati sono stati confrontati con i valori ottenuti mediante la procedura di dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL). Le correlazioni sono illustrate nella figura 3.

INDICACIONES DE USO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas que ayuda a valorar la 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, como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa) de una enfermedad funcional (síndrome del intestino irritable, SII) (ref. 1-6), en pacientes con dolor abdominal crónico mayores de cuatro años (ref. 7-8), y para facilitar el control de la EII (ref. 9-10).

Solo para uso profesional*.

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

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El análisis permite la determinación selectiva del antígeno calprotectina mediante inmunoanálisis tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal se encuentra en la zona de dispensación de la muestra y se libera en el sistema después de añadir la muestra de heces extraída y diluida. El complejo [calprotectina / anticalprotectina oro coloidal] se unirá al anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para calprotectina situado en la línea test (banda test) y la [anticalprotectina oro coloidal libre] se unirá al anticuerpo que recubre la línea control (banda control). Las intensidades de la señal en la línea test y la línea control se miden cuantitativamente mediante el lector Quantum Blue® de BÜHLMANN.

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Cartucho de prueba	25 unidades	B-LFCALUS-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-CALE-CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC	Tarjeta de plástica blanca
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC720	Tarjeta de plástica verde

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 SUMINISTRADOS 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

- Ninguno de los reactivos de esta prueba tiene componentes de origen humano.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones apropiadas.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con agua abundante; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- 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) y mézclelos bien (con agitador de vórtice) 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 calprotectina: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720, antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue®).
- Utilizaremos la tarjeta con chip RFID para modificar los parámetros de prueba específicos de lote.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción. Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- 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 SUMINISTRADOS

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

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 1 g de heces nativas por extracción usando el dispositivo de extracción fecal (referirse a la tabla 10).

Recoger la muestra de heces en tubos sencillos y conservarla refrigerada a 2-8 °C hasta 6 días.

Los extractos son estables a 2-8 °C por lo menos 7 días y a ≤-20 °C por lo menos 24 meses.

Importante: La muestra debe recogerse sin ningún aditivo químico o biológico en el dispositivo de recogida.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

El procedimiento del análisis 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 1:10 con tampón de extracción (e.g. 50 µL extracto y 450 µL tampón de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con los 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. El sobrenadante se puede utilizar sin dilución adicional en el ensayo de flujo lateral.

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

Dos métodos alternativos se pueden cargar desde la tarjeta chip RFID respectiva. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Seleccione una de las tarjetas con chip RFID antes de comenzar los experimentos. Cargue el método de prueba de la tarjeta de chip RFID.

3.1. Método <B-CALE-RCC720> con cronómetro interno

- Use la tarjeta de plástico verde.
- 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 barrido 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 extracto de heces diluido.

3.2 Método <B-CALE-RCC> sin cronómetro interno

- Use la tarjeta de plástico blanca
- 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 barrido 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 extracto de heces diluido.

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® 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 cartucho 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 cartucho 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 cartucho de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- El análisis de flujo lateral se calibra con BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® de BÜHLMANN utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. El rango de ensayo es entre 30 y 1000 µg/g.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por encima de 1000 µg/g pueden repetirse con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range assay (código: LF-CHR25).

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit Quantum Blue® fCAL extended sirven únicamente para la determinación de niveles de calprotectina en 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 rápido BÜHLMANN Quantum Blue® para calprotectina pueden confirmarse midiendo otros biomarcadores (como la proteína C reactiva) o repitiendo el análisis de BÜHLMANN fCAL® ELISA (o utilizando un segundo cartucho 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 presentar niveles elevados de calprotectina fecal.

VALORES ESPERADOS

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 BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL). En un estudio clínico, se compararon con los hallazgos endoscópicos los valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos. La endoscopia confirmó que 264 pacientes sufrían de enfermedades funcionales mientras que 80 pacientes tenían varias enfermedades orgánicas (colitis, enfermedad de Crohn, úlceras, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer, o enfermedades infecciosas) (ref. 9).

Un análisis de la curva ROC (AUC: 0.962) dio como resultado un valor límite óptimo de 50 µg/g. Aplicando este valor límite, la sensibilidad y la especificidad clínica del método alcanzó 88.8 % y 93.6 % respectivamente (véase la tabla 13). Esto demuestra que la calprotectina fecal es una excelente biomarcador para distinguir entre enfermedades orgánicas y funcionales. Por lo tanto, las muestras que exceden el valor límite de 50 µg/g se pueden considerar como positivas y los pacientes no deben someterse a investigaciones invasivas, como la colonoscopia y otros métodos, para confirmar una inflamación orgánica.

La concentración de calprotectina en heces es comparable en niños y adultos. Por lo tanto, se puede utilizar el valor de corte (50 µg/g), recomendado para adultos, también para niños de 4 a 17 años de edad (ref. 6). Las concentraciones de calprotectina en recién nacidos son considerablemente elevadas.

Estos datos respaldan la siguiente interpretación de los resultados:

Valores por debajo de 50 µg/g:

Los 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. Una baja respuesta inflamatoria mostrada dentro de ese intervalo puede indicar la conveniencia de repetir la medición y de llevar a cabo análisis 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. Indican la conveniencia de llevar a cabo análisis adicionales apropiados y procedimientos curativos por parte de especialistas.

El nivel de corte sugerido para adultos (50 µg/g) se puede utilizar también para niños de entre 4 y 17 años de edad con independencia del sexo (ref. 7).

Recuperación de cantidades añadidas: La linealidad varía entre 90.6 y 101.8 %.

Repetibilidad: 20.1 % CV. La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® fCAL extended se calculó a partir de 8 muestras de heces. En la tabla 14 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de casetes de análisis. La respetabilidad del ensayo de las muestras varía entre 17.9 y 23.9 % CV.

Precisión interlote: 20.8 % CV. La precisión interlote del ensayo Quantum Blue® fCAL extended se calculó a partir de 8 muestras de heces extraídas que contenían entre 30 y 1000 µg/g de calprotectina. Los datos interlote de las muestras variaron entre 16.1 y 24.1 % CV.

Comparación de métodos: R² = 0.94; y = 1.05-3.91 µg/g. Se analizaron 50 extractos de heces que presentaban concentraciones de calprotectina dentro del rango de medición indicado del ensayo Quantum Blue® fCAL extended y se compararon los resultados con los valores obtenidos con el método para BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL). Los datos de correlación se ilustran en la figura 3.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite para el blanco (LoB): <20 µg/g de calprotectina.

Límite de Detección (LoD): <30 µg/g de calprotectina.

Límite de Cuantificación (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g de calprotectina

LoQ superior: ≥1000 µg/g de calprotectina

El LoQ se ha establecido a partir de 14 extractos de heces. En la figura 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 1000 µg/g (LoQ superior).

Linealidad: Los resultados mostraron linealidad dentro del rango de medición indicado de 30 a 1000 µg/g del ensayo Quantum Blue® fCAL extended para la totalidad de muestras.

APLICAÇÃO DO TESTE

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended é um teste de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados para um auxiliar no diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DII; ex., doença de Chron ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-6) em pacientes com dor abdominal crônica acima de quatro anos de idade (ref. 7-8), e como auxiliar no monitoramento de DII (ref. 9-10).

Para uso profissional*.

*Canada, Taiwan: Somente para uso 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-LFCALUS-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de Extração	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Controles Baixo* / Alto*	2 frascos, 0.5 mL	B-CALE-CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1	B-CALE-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão Chip RFID	1	B-CALE-RCC720	Cartão de plástico verde

Tabela 11

* Os controles 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

- Nenhum reagente deste kit contém componentes de origem humana.
- Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais.
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, leve imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a Regulamentação das Entidades Governamentais Locais.

Precauções técnicas

Componentes do kit

- Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18-28 °C) antes do início do ensaio.
Misture bem (vortex) os reagentes antes de usar.
- 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® tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL extended: B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720, antes do início do teste (ver manual do Leitor Quantum Blue®).
- Utilize o cartão RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de doentes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados errôneos.
- 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 Cap CALEX® 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 poliestireno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronómetro
- Leitor Quantum Blue® disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Se os tubos de extração utilizados forem os mencionados na tabela 12, é necessário menos de 1 g de fezes. Colha as amostras de fezes em tubos limpos e armazene refrigerado a 2-8 °C até 6 dias. O extrato é estável ≥7 dias a temperatura 2-8 °C e ≥24 meses a temperatura ≤ -20°C. Importante: A amostra tem que ser colhida em tubos sem qualquer aditivo químico ou biológico.

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: 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28° 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, abrir a tampa azul. O sobrenadante pode ser utilizado sem qualquer diluição adicional com o ensaio de escoamento lateral.

3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

Dois métodos alternativos podem ser carregados a partir do respectivo cartão chip RFID. B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720. Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar os experimentos. Coloque o método de teste a partir da RFID Chip Card.

3.1. Método <B-CALE-RCC720> com cronómetro interno

- Use o cartão de plástico verde.
- 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 <B-CALE-RCC > sem cronómetro interno

- Use o cartão de plástico branco.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Incube durante 12 minutos +/- 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Precione ENTER (<START>) no leitor Quantum Blue® 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 excluïrem 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 controle/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 Controle (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 Controle (C). Se a intensidade do sinal da Linha de Controle (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.

CALIBRAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

- O teste de imunocromatografia está calibrado de acordo com a BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O leitor BÜHLMANN Quantum Blue® utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. A gama de calibração varia de 30 a 1000 µg/g.
- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras superiores de 1000 µg/g podem ser retestadas no Quantum Blue® fCAL high range BÜHLMANN (referência: LF-CHR25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL extended destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais 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 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 estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) podem apresentar aumentos nos níveis de calprotectina fecal.

VALORES ESPERADOS

Calculando a calprotectina fecal é uma maneira confiável e simples de distinguir doenças intestinais funcionais orgânicos. As informações a seguir com BÜHLMANN fCAL® ELISA (código EK-CAL) foram estabelecidos. Em um estudo clínico, valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos foram comparados a resultados endoscópicos.

Exames endoscópicos mostraram que dos 264 pacientes com doenças funcionais, 80 pacientes tinham diversas doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, úlceras, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças infecciosas) (ref. 9).

A análise da curva (AUC: 0,962) característica de operação do receptor (COR) resultou em um corte clínico ótimo em 50 µg/g. Aplicando-se este corte, uma sensibilidade clínica e especificidade de 88.8 % e 93.6 % respectivamente podem ser obtidas na diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais (veja tabela 13).

Níveis de calprotectina fecal d'adultos e crianças são comparáveis, ao passo que níveis de recém-nascidos podem ser significativamente maiores (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 da inflamação do trato gastrointestinal. Poderá levar-se em consideração continuar a vigiar o doente e retestar a amostra com o EK-CAL or LF-CAL (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 como inflamação do trato gastrointestinal. 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. Sugerem-se investigações adicionais a indicar pelos especialistas.

O nível de corte sugerido para adultos (50 µg/g) podem também ser usados por crianças de 4 a 17 anos, independente de sexo (ref. 7).

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Limite do Branco (LoB): <20 µg/g calprotectina.

Limite de Detecção (LoD): <30 µg/g calprotectina.

Limite de Quantificação (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g calprotectina

LoQ superior: ≥1000 µg/g calprotectina

O LoQ é estabelecida a partir de 14 extratos de fezes. 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 1000 µg/g (mais elevado LoQ).

Linearidade: Os resultados mostraram linearidade na leitura da gama 30 a 1000 µg/g de ensaio Quantum Blue® fCAL extended para todas amostras.

Recuperação de quantidades adicionadas: A recuperação varia entre 90.6 e 101.8 %.

Repetição: 20.1 % CV. La repetibilidade del ensaio Quantum Blue® fCAL extended são calculados de 8 amostras de fezes. Na tabela 14, os valores médios a partir de três lotes diferentes de análises são apresentados cassetes. Respeitabilidade ensaio amostras varia entre 17.9 % e 23.9 % CV.

Precisão Inter-lote: 20.8 % CV. A inter-monte Quantum Blue® fCAL extended ensaio foi calculada para calprotectina a partir de 8 de fezes amostras contendo entre 30 e 1000 µg/g de calprotectina. As inter-lot amostras de dados variou entre 16.1 % e 24,1 % CV.

Método comparativo: $R^2 = 0.94$; $y = 1.05-3.91 \mu\text{g/g}$. 50 indivíduos testados que tinham níveis anticalprotectina dentro da faixa de medição do ensaio indicado Quantum Blue® fCAL extended para calprotectina, foram analisados e os resultados com os valores obtidos por BÜHLMANN fCAL® ELISA (código de EK-CAL) foram comparados. Os dados de correlação são mostrados na figura 3.

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

Test Results

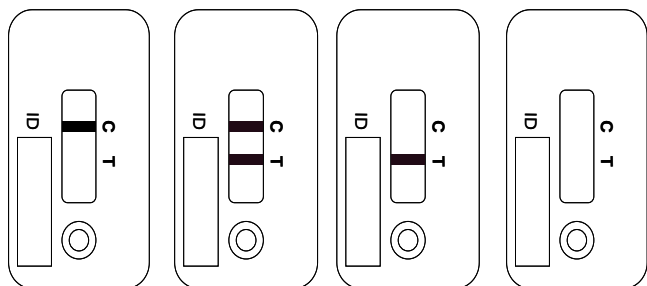


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

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 (ref.10)

Precision (Repeatability)

Sample No.	Calprotectin concentration [mean µg/g]	Repeatability [CV]
Smpl 1	24.2	23.5 %
Smpl 2	32.9	18.7 %
Smpl 3	51.0	17.9 %
Smpl 4	93.7	18.3 %
Smpl 5	298.7	19.7 %
Smpl 6	305.9	18.2 %
Smpl 7	509.7	23.9 %
Smpl 8	662.1	20.6 %

Table 14

Precision Profile

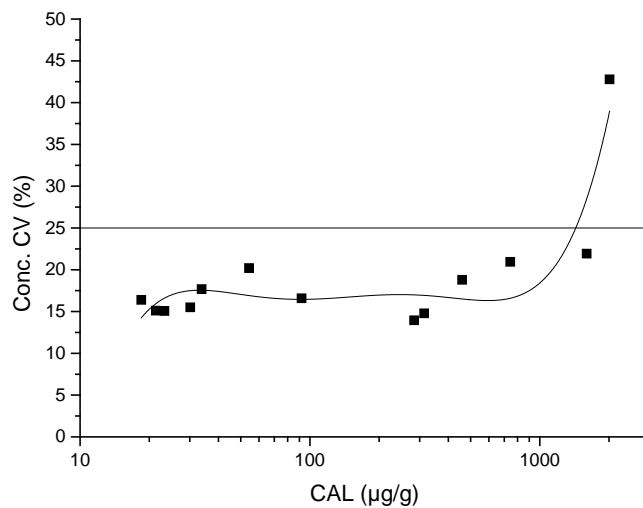


Figure 2

Method Comparison

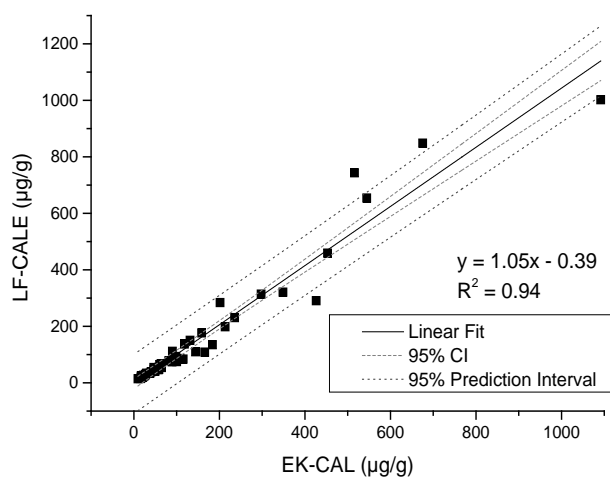






Figure 3

REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. 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)
2. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet **356**, 1783-4 (2000)
3. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease.* Gut **47**,506-513 (2000).
4. Tschanguizi et al.: *Stool Calprotectin as a Marker of inflammation.* Poster at UEGW, 2007
5. Hessian PA and Fisher L: *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure.* Eur J Biochem **268**, 353-63 (2001).
6. 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)
7. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.* J Pediatr Gastroenterol Nutr **40**, 450-5 (2005)
8. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.* Tidsskr Nor Lægeforen **128**, 743–5 (2008)
9. Manz M et al. *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study.* BMC Gastroenterology **12**, 5 (2012).
10. Naismith GD et al. *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease.* J Crohns Colitis. **8**, 1022-9, 2014

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Validade até		Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo	TC	Test Cassette Test Kassette Cassette de testi Card di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
LOT	Batch code Chargenbezeichnung No. du lot No. del lotto No. de lote No. do lote	BUF EX	Extraction Buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción Tampão de extração
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Produto para Diagnóstico <i>in vitro</i>	CONTROL L	Control Low Kontrolle Tief Contrôle Bas Controllo Basso Control Bajo Controle Baixo
	Content sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos Conteúdo suficiente para <n> testes	CONTROL H	Control High Kontrolle Hoch Contrôle Élevé Controllo Alto Control Alto Controle Alto
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Consultar as intruções de uso	RCC	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão Chip