



Quantum Blue[®] fCAL

Quantitative
Lateral Flow Assay

For *In Vitro* Diagnostic Use.

LF-CAL25

25 tests

Release date: 2020-10-30
Version A2

ENGLISH

INTENDED USE

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

For laboratory use only.
EU: For professional use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

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

Table 1

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal extraction devices

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

Extraction device Kits	Quantity	Code
CALEX® Cap device	Packages of 50, 200 or 500 tubes available, 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, each filled with 1.3 mL extraction buffer Ready to use	B-CAL-SO50

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

PRECAUTIONS

Safety precautions

- The controls of this test contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practices (GLP) using appropriate precautions.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- Reagents: Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation can occur.
- Reagents and chemicals have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.

Technical precautions

Kit components

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

Test procedure

- Read the instructions carefully prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL assay (CAL_0 or CAL_720) before starting the test (see Quantum Blue® Reader manual).
- Use the white RFID chip card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device.
- Diluted samples should be used within several hours and cannot be stored for a longer time period.
- With BÜHLMANN Smart-Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE, STABILITY

For the extraction procedure, less than 1 g of native stool specimen is required. Collect stool specimen into plain tubes.

Important: The specimen must be collected without any chemical or biological additives.

Specimen transport

Stool specimens should be received for processing by the laboratory within 3 days of collection. The specimens may be transported at room temperature or refrigerated.

Specimen storage

Stool specimens should be refrigerated at 2-8 °C and extracted within 3 days of receipt at the laboratory. Do not store samples at elevated temperatures.

Extract stability

Fecal calprotectin extracts obtained with the CALEX® Cap device are stable at room temperature (23 °C) for 7 days and at 2-8 °C for up to 15 days. For longer storage, freeze extracts at -20°C. Frozen extracts are stable for a period of up to 23 months.

CALEX® Cap extracts can be stored and frozen directly within the CALEX® Cap device. Extracts can be subject to four freeze-thaw cycles. Prior to measurement, allow frozen extracts to equilibrate to room temperature. For re-use / re-

measurement of the extracts see step 2 under the chapter assay procedure.

Fecal calprotectin extracts obtained by manual weighing method, by BÜHLMANN Smart-Prep or by ScheBo® Quick-Prep™ is stable at 2-8 °C for ≤7 days or at -20 °C for 36 months.

ASSAY PROCEDURE

The assay procedure consists of three steps:

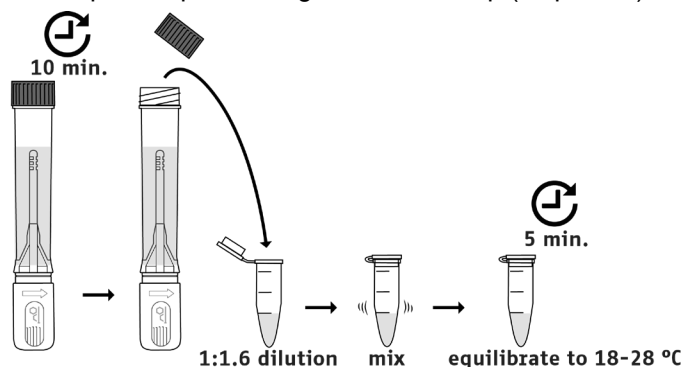
1. Extraction of stool samples

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

CALEX® Cap device: Liquid stool samples can be pipetted directly into the CALEX® Cap device. Unscrew the blue cap and pipet 10 µL of stool sample into the device. Recap the CALEX® Cap device and proceed with vortexing step according to the extraction procedure described and illustrated in the instruction for use delivered with the CALEX® Cap device.

2. Sample processing

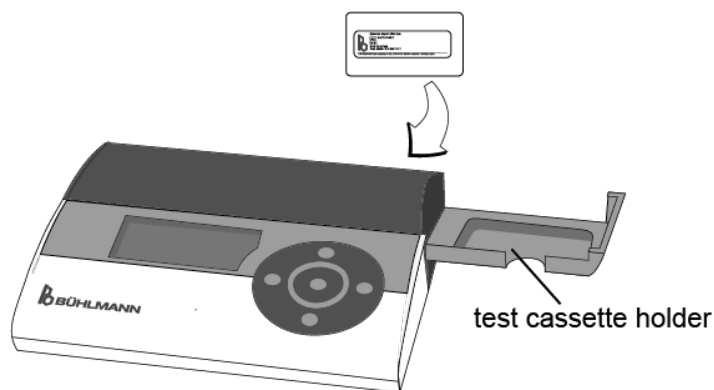
- Smart-Prep or ScheBo® Quick Prep™: Let the stool extract settle for 10 minutes after extraction. Dilute the supernatant 1:16 with extraction buffer (e.g. 20 µL extract and 300 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes to 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step no. 3).
- CALEX® Cap device: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down. Unscrew the blue cap and dilute the supernatant 1:1.6 with extraction buffer (e.g. 200 µL extract and 120 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes to 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step no. 3).



3. Lateral flow assay procedure and readout

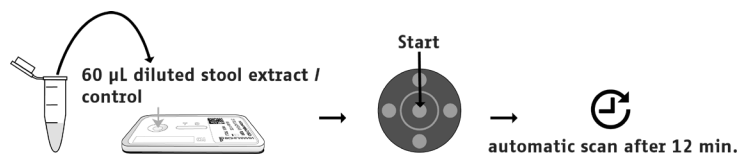
There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CAL_720> and <CAL_0>. Select one of these methods before starting the experiments.

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



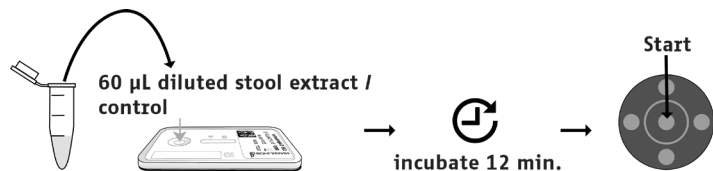
3.1. Method <CAL_720> with internal timer

- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Reader.
- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Close the cassette holder and start the measurement by pressing the start button.
- The scan starts automatically after 12 minutes (720 seconds).
- For low / high controls: Repeat step 3.1 using 60 µL of controls instead of diluted stool extract.



3.2. Method <CAL_0> without internal timer

- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Incubate for 12 minutes +/- 1 minute (set a timer manually).
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Reader.
- Scan the cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) button immediately.
- For low / high controls: Repeat step 3.2 using 60 µL of control instead of diluted stool extract.



Remark: Please refer to the Quantum Blue® Reader manual to learn more about the basic functions and how to initialize and operate the reader, especially how to select test methods, and how to load lot specific parameters from the RFID chip card on the Quantum Blue® Reader.

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 ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.

- Result of the self-test of the Quantum Blue® Reader performed at startup has to be valid.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the control line (C) must be visible in any case (see figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for the interpretation of the test line (T). If the test line (T) is not detectable after 12 minutes of incubation time (figure 1A), the concentration of calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a test line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (figure 1B), the calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the test line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (figure 1C), the test result is invalid and the calprotectin assay has to be repeated using another test cassette.
- If neither the control line (C) nor the test line (T) are detectable after 12 minutes of incubation time (figure 1D), the test result is invalid and the calprotectin assay has to be repeated using another test cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the test (T) and control (C) lines, an additional validity check of the control line (C) is undertaken. If the signal intensity of the control line (C) is below a threshold after 12 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Quantum Blue® fCAL assay has to be repeated using another test cassette.

STANDARDIZATION

- The Quantum Blue® fCAL is standardized against the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL).
- The Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the calprotectin concentration. This lot-specific standard curve is generated with the median values ($n \geq 10$ measurements each) from at least 10 calibration points obtained from different stool samples with known calprotectin concentrations. The assay range is between 30 and 300 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 300 µg/g can be re-tested in the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (order code: LF-CHR25).

LIMITATIONS

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

- Results may not be clinically applicable to children less than 4 years of age who have mildly increased fecal calprotectin levels (ref. 8-11).

INTERPRETATION OF RESULTS

DISTINGUISHING ORGANIC DISEASE FROM FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISEASE

The determination of fecal calprotectin levels can be used as a reliable and simple aid in distinguishing organic from functional gastrointestinal diseases (ref. 1-7). The result categories are based on data from clinical studies performed by BÜHLMANN and are BÜHLMANN's recommendations. All test results should be interpreted in conjunction with information available from the patient's clinical symptoms, medical history, and other clinical and laboratory findings.

Clinical thresholds

The following data were established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). Results from 58 clinical samples from patients diagnosed with IBS and 131 clinical samples from patients diagnosed with IBD, from an international clinical study, were analyzed to obtain the values described in table 3.

Calprotectin concentration	Interpretation	Follow-up
< 80 µg/g	Normal	None
80 - 160 µg/g	Gray-zone/Borderline	Follow-up within 4 – 6 weeks
> 160 µg/g	Elevated	Repeat as needed

Table 3

Calprotectin values below 80 µg/g

Fecal calprotectin values <80 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patients with low calprotectin levels are not likely to be in need of invasive procedures to determine the inflammation cause.

Calprotectin values between and equal to 80 and 160 µg/g

Mid-fecal calprotectin levels between and equal to 80 and 160 µg/g, also called gray-zone levels, are not directly indicative of an active inflammation requiring immediate follow-up with invasive testing. However, the presence of inflammation cannot be excluded. Re-evaluation of fecal calprotectin levels after 4 to 6 weeks is recommended to determine the inflammatory status.

Calprotectin values above 160 µg/g

Fecal calprotectin values >160 µg/g are indicative of neutrophil infiltrate in the gastrointestinal tract; therefore, this may signal the presence of active inflammatory disease. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested to achieve an overall clinical diagnosis.

Clinical evaluation

The ability of the BÜHLMANN fCAL® ELISA to discriminate between patients with IBD and other non-inflammatory GI disorders, including IBS, was tested in a clinical study with a total of 337 adult and pediatric patients. One hundred and thirty five (135) patients had a final diagnosis of IBD (Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis), 130 patients suffered from IBS and 72 patients presented

with abdominal pain and/or diarrhea, or other GI-related non-inflammatory conditions (refer to table 4). Final diagnosis was supported by endoscopic as well as other clinical findings.

A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 83.7% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and GI-related non-inflammatory conditions, including IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.923 (refer to table 5).

A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 85.4% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.933 (refer to table 6).

The optimal cut-off combination for these patient pools could be defined by ROC analysis at 80 µg/g and 160 µg/g calprotectin, which is slightly more stringent than a combination of a **more sensitive lower cut-off of 50 µg/g** with lower performance in specificity, and an **upper cut-off of 200 µg/g** with slightly lower sensitivity (table 7 and 8).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <7 µg/g calprotectin

The LoB has been established in accordance with CLSI protocol EP17-A in three independent runs using three different lots of test cassettes with 60 blank values in total by using extraction buffer as a sample.

Limit of Detection (LoD): 15 µg/g calprotectin

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

Limit of Quantification (LoQ):

Lower LoQ: ≤30 µg/g calprotectin

Upper LoQ: ≥300 µg/g calprotectin

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

Linearity

Four stool samples with elevated calprotectin concentrations were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with extraction buffer and each dilution was subsequently assayed on two test cassette according to the assay procedure and averaged for each test point. The results showed linearity within the indicated measuring range of 30 to 300 µg/g of the Quantum Blue® fCAL assay for all 4 samples (R² = 0.986-0.995). One example is shown in (figure 3). The average difference between measured and expected concentrations was 2% corresponding to a recovery of 98%. The recovery varied between 84-114%.

Recovery: 92%

Four stool extracts containing low calprotectin concentrations were spiked with different amounts from a highly concentrated calprotectin stock solution. Each sample was measured before and after spiking on three test cassettes according to the assay procedure. The three replicates were averaged and the mean values are presented in table 9. The recovery varied 83-105%.

Precision (repeatability): 15.5-22.2% CV

The repeatability of the Quantum Blue® fCAL assay was calculated from 2 extracted stool samples containing 49 and 138 µg/g calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in one run of 20 replicates set up within 10 minutes. The mean values of three different lots of test cassette are presented in table 10. The repeatability varied between 15.5-22.2% CV.

Inter-lot Precision: 20.2-24.5% CV

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

Method Comparison: $R^2 = 0.806$; $y = 1.02x - 11.1$ µg/g

One hundred and one (101) stool extracts from subjects undergoing IBD vs. IBS screening exhibiting calprotectin concentrations within the indicated measuring range of the Quantum Blue® fCAL assay were analyzed according to the assay procedure using a data set originated from test cassette of six different lots and compared with the values obtained by the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL). The correlation data are illustrated in figure 4.

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL ist ein *in-vitro*-Diagnosteset für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben, der als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Darmschleimhautentzündungen dient. Die Testergebnisse dienen bei der Diagnose als -Hilfsmittel zur Unterscheidung zwischen organischen, entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen (CED), speziell Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (UC)) und funktionellen Erkrankungen (Reizdarmsyndrom (RDS)) (ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen.

Für den Laborgebrauch.

Europa: Für den professionellen Gebrauch.

PRINZIP DER METHODE

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

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Testkassette	25 Stück	B-CAL-TC	Vakuumdicht In einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen niedrig*/hoch*	2 Fläschchen 0,5 mL	B-LFCAL- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	B-LFCAL- RCC	Weisse Plastikkarte

Tabelle 1

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

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICH

Stuhlextraktionsprodukte

Extraktionsprodukte zur Stuhlextraktion werden nicht mit diesem Kit mitgeliefert und müssen zusätzlich zum Kit bestellt werden.

Extraktions- produkt Kits	Menge	Art.-Nr.
CALEX® Cap	Packungen mit 50, 200 oder 500 Röhrchen erhältlich, 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 2

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- 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

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Die Kontrollen enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss Guter Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Alle Patientenproben sollten gemäss Guter Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheits-vorkehrungen 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.
- Die Reagenzien und Chemikalien müssen gemäss den nationalen Richtlinien und Bestimmungen als gefährlicher Abfall behandelt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kit Komponenten

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

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Quantum Blue® fCAL assay (CAL_0 bzw. CAL_720) muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die weisse RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemässe Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen enthaltene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Verdünnte Extrakte sollten innerhalb einiger Stunden abgearbeitet werden und können nicht über einen längeren Zeitraum gelagert werden.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden.

PROBENTNAHME, LAGERUNG, STABILITÄT

Für das Extraktionsverfahren werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt. Die Stuhlproben in Röhrchen ohne Zusatzstoffe füllen.

Wichtiger Hinweis: Den Proben dürfen keine chemische oder biologische Zusatzstoffe beigelegt werden.

Transport der Proben

Die Stuhlproben sollten innerhalb von 3 Tagen nach der Gewinnung zur Bearbeitung im Labor eingehen. Die Stuhlproben können bei Raumtemperatur oder gekühlt versendet werden.

Lagerung der Proben

Die Stuhlproben sollten im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt und innerhalb von 3 Tagen nach Eingang im Labor extrahiert werden. Die Proben nicht bei erhöhten Temperaturen lagern.

Stabilität des Extraktes

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

Lagerung, die Extrakte bei -20 °C einfrieren. Gefrorene Extrakte sind für einen Zeitraum von bis zu 23 Monaten stabil.

CALEX® Cap Extrakte können direkt im CALEX® Cap gelagert und gefroren werden. Die Extrakte können vier Einfrier/ Auftau-Zyklen ausgesetzt werden. Vor der Messung die gefrorenen Extrakte auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen. Zur Weiterverwendung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Testdurchführung.

Calprotectin-Stuhlextrakte, die mit manuellen Wiegemethoden, wie BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™, gewonnen wurden, sind bei 2-8 °C für ≤7 Tage oder bei -20 °C für 36 Monate stabil.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in drei Schritte:

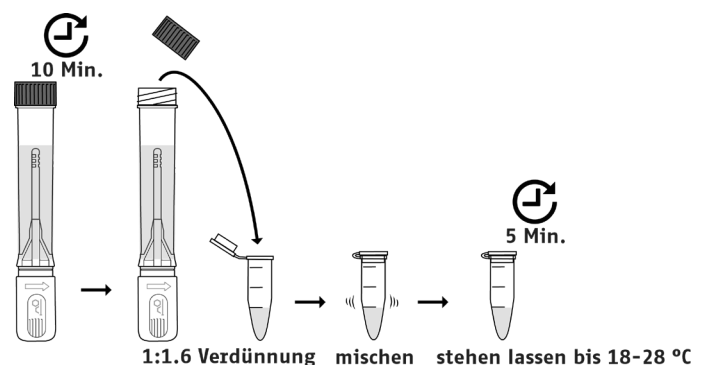
1. Extraktion der Stuhlproben:

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchens beschrieben.

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

2. Verarbeitung des Extraktes:

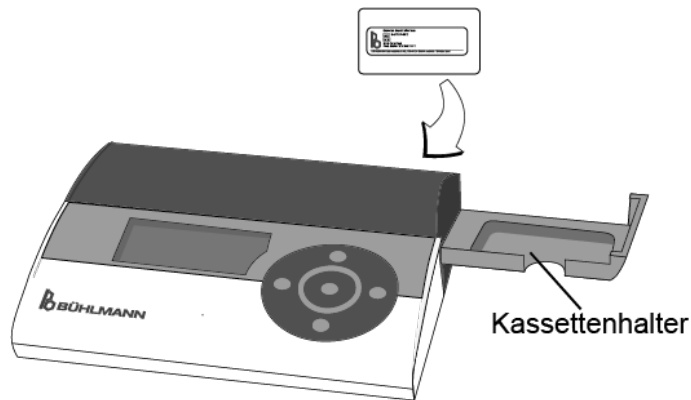
- Smart-Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten ruhen lassen. Den Überstand mit Extraktionspuffer 1:16 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 300 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt (3) fortfahren.
- CALEX® Cap: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten mit dem weissen Verschluss nach unten ruhen lassen. Öffnen Sie den blauen Verschluss und verdünnen Sie den Überstand mit Extraktionspuffer 1:1,6 (z.B. 200 µL Extrakt + 120 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt (3) fortfahren.



3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung:

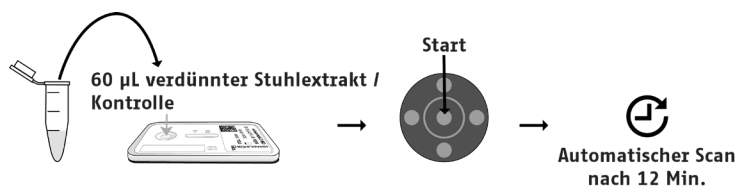
Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CAL_720> und <CAL_0>. Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Assay starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der weissen RFID Chipkarte



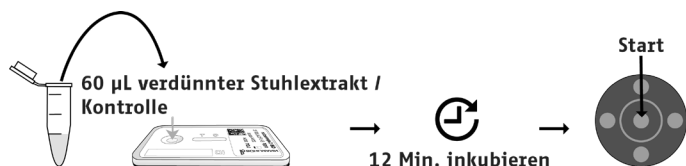
3.1 Methode <CAL_720> mit internem Zeitmesser

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



3.2 Methode <CAL_0> ohne internen Zeitmesser

- 60 µL verdünntes Stuhlextrakt auf die runde Probenaufragsstelle der Kassette aufbringen.
- Die Kassette für 12 +/- 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Kassette auf den Kassettenträger des Readers laden.
- Lesevorgang durch sofortiges Drücken auf den Startknopf (<ENTER>) starten.
- Für die Kontrollen Niedrig / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrolle anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



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

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und Zeitmessung, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerungs- 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 Abbildung 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 die Calprotectinkonzentration im Stuhl 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 von 12 Minuten nur die Testbande (T) sichtbar ist (Abbildung 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation von 12 Minuten nachweisbar sind (Abbildung 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG

- Der Quantum Blue® fCAL wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL® ELISA (Art.-Nr.: EK-CAL) standardisiert.
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectinkonzentration eine Lot-abhängige lot-spezifische Standardkurve. Diese Standardkurve wird über den Median (n ≥ 10 Messungen) von mindestens 10 Kalibrationspunkten und unterschiedlichen Stuhlproben mit einer bekannten Calprotectinkonzentration berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 300 µg/g.
- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, können Proben über 300 µg/g mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (Bestellcode: LF-CHR25) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Quantum Blue® fCAL Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.
- Fäkale Calprotectinwerte sind als Hilfe bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen Erkrankung von einer funktionellen Erkrankung. Die Interpretation der Resultate sollte stets in Kombination mit anderen klinischen Ergebnissen und Laborergebnissen erfolgen.
- Patienten, die regelmässig NSAID einnehmen, könnten erhöhte fäkale Calprotectinkonzentrationen aufweisen.
- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinspiegel im Stuhl aufweisen (Ref. 8-11).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Unterscheiden einer organischen Erkrankung von einer funktionellen gastrointestinalen Erkrankung

Die Bestimmung des Calprotectinspiegels in Stuhlproben kann als zuverlässige und einfache Hilfe bei der Unterscheidung zwischen organischen und funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen verwendet werden (Ref. 1-7).

Die Ergebniskategorien basieren auf Daten aus klinischen Studien, die von BÜHLMANN durchgeführt wurden, und sind Empfehlungen von BÜHLMANN. Alle Testergebnisse sollten zusammen mit Informationen, die aus den klinischen Symptomen des Patienten, der Anamnese und anderen klinischen Ergebnissen und Laborbefunden verfügbar sind, interpretiert werden.

Klinische Schwellenwerte

Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA erhoben (Bestellcode: EK-CAL).

Ergebnisse aus 58 klinischen Proben von mit RDS diagnostizierten Patienten und aus 131 klinischen Proben von mit CED diagnostizierten Patienten aus einer internationalen klinischen Studie wurden herangezogen, um die in Tabelle 3 angegebenen Werte zu erhalten.

Calprotectin-konzentration	Interpretation	Nachuntersuchung
< 80 µg/g	Normal	Keine
80 – 160 µg/g	Grauzone/ grenzwertig	Nachbeobachtung innerhalb von 4-6 Wochen
> 160 µg/g	Erhöht	Bei Bedarf wiederholen

Tabelle 3

Calprotectinwerte unterhalb 80 µg/g

Calprotectinwerte im Stuhl <80 µg/g deuten nicht auf eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes hin. Patienten mit niedrigen Calprotectinspiegeln benötigen vermutlich keine invasiven Untersuchungen, um die Entzündungsursache zu bestimmen.

Calprotectinwerte zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g

Calprotectinspiegel im Stuhl im Mittelbereich zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g, die auch als

Grauzonenspiegel bezeichnet werden, deuten nicht direkt auf eine aktive Entzündung hin, die eine sofortige Nachuntersuchung mit invasiven Tests erfordert. Das Vorliegen einer Entzündung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Entzündungsstatus wird eine erneute Überprüfung der Calprotectinspiegel im Stuhl nach 4 bis 6 Wochen empfohlen.

Calprotectinwerte oberhalb von 160 µg/g

Calprotectinwerte im Stuhl >160 µg/g deuten auf eine neutrophile Infiltration des gastrointestinalen Traktes hin; daher kann dies ein Zeichen dafür sein, dass eine aktive entzündliche Erkrankung vorliegt. Entsprechende weiterführende Untersuchungen durch Fachärzte zur Erhaltung einer klinischen Gesamtdiagnose werden empfohlen.

Klinische Beurteilung

Die Fähigkeit des BÜHLMANN fCAL® ELISA zwischen Patienten mit CED und anderen nichtentzündlichen GI-Erkrankungen einschliesslich RDS zu unterscheiden, wurde in einer klinischen Studie mit insgesamt 337 erwachsenen und pädiatrischen Patienten untersucht. Einhundert-fünfunddreissig (135) Patienten hatten die endgültige Diagnose einer CED (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder unklare Colitis), 130 Patienten hatten RDS und 72 Patienten stellten sich mit Bauchschmerzen und/oder Durchfall bzw. anderen GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen vor (siehe Tabelle 4). Die endgültige Diagnose wurde durch Endoskopie sowie andere klinische Befunde gestützt.

Die Differenzierung zwischen CED und GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen einschliesslich RDS wurde mit einer klinischen Empfindlichkeit von 93,3% bei 80 µg/g und einer klinischen Spezifität von 83,7% bei 160 µg/g erreicht. Die ROC-Kurvenanalyse ergab einen AUC von 0,923 (siehe Tabelle 5).

Die Differenzierung zwischen CED und RDS wurde mit einer klinischen Empfindlichkeit von 93,3% bei 80 µg/g und einer klinischen Spezifität von 85,4% bei 160 µg/g erreicht. Die ROC-Kurvenanalyse ergab einen AUC von 0,933 (siehe Tabelle 6).

Die durch ROC-Analyse definierte optimale Kombination von Toleranzgrenzen für diese Patientenpopulationen betrug 80 µg/g und 160 µg/g Calprotectin, welches etwas stringenter ist als die Kombination einer empfindlicheren **unteren Toleranzgrenze von 50 µg/g** mit geringerer Spezifitätsleistung und einer **oberen Toleranzgrenze von 200 µg/g** mit etwas geringerer Empfindlichkeit (Tabelle 7 und 8).

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <7 µg/g Calprotectin

Der LoB wurde berechnet nach dem CLSI Protokoll EP17-A in drei unabhängigen Läufen unter Verwendung von drei verschiedenen Testkassetten Lots mit insgesamt 60 Blank Werten, bei denen Extraktionspuffer als Probe verwendet wurde.

Limit of Detection (LoD): 15 µg/g Calprotectin

Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von zwei Stuhlextrakten mit Konzentrationen von 14,5 und 28,5 µg/g. Die Proben wurden in 3 unabhängigen Läufen von 10 Replikaten

gemessen, die innerhalb von 10 Minuten angesetzt wurden. Die LoD wurde berechnet unter Verwendung der mittleren Standardabweichung der Proben in Übereinstimmung mit dem CLSI Protokoll EP17-A.

Limit of Quantification (LoQ)

Unterer LoQ: $\leq 30 \mu\text{g/g}$ Calprotectin

Oberer LoQ: $\geq 300 \mu\text{g/g}$ Calprotectin

Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von sieben Stuhlextrakten mit Konzentrationen zwischen $14,5$ und $622 \mu\text{g/g}$. Die Proben wurden in drei unabhängigen Läufen von je 10-20 Replikaten gemessen und gemittelt, die innerhalb von 10 Minuten angesetzt wurden. Das entsprechende Präzisionsprofil ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Nachweisgrenze entspricht derjenigen Calprotectin-konzentration, die eine Streuung von $<25\%$ CV zeigt und damit eine quantitative Bestimmung innerhalb eines Bereiches von 30 (unterer LoQ) bis $300 \mu\text{g/g}$ (oberer LoQ) ermöglicht.

Linearität

Vier Stuhlextrakte mit erhöhtem Calprotectingehalt wurden gemäss der Extraktionsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Extraktionspuffer verdünnt. Jede Verdünnung wurde dann auf zwei Testkassetten gemäss der Anleitung angesetzt und gemessen. Der Mittelwert für jeden Messpunkt wurde berechnet. Die Ergebnisse zeigten eine Linearität der Ergebnisse innerhalb des angegebenen Messbereiches von 30 bis $300 \mu\text{g/g}$ für alle vier Proben. ($R^2 = 0,986-0,995$). Ein Beispiel ist in Abbildung 3 dargestellt. Die mittlere Abweichung zwischen dem gemessenen und erwarteten Wert war 2%, entsprechend einer Wiederfindung von 98%. Die Linearität variierte zwischen 84 und 114%.

Wiederfindung: 92%

Vier Stuhlextrakte mit niedrigen Calprotectin-konzentrationen wurden mit verschiedenen Mengen einer hohen Calprotectinstocklösung aufgestockt. Jede Probe wurde vor und nach dem Spiken auf drei Testkassetten gemäss der Assayanleitung gemessen. Die drei Replikate wurden gemittelt und die Mittelwerte in Tabelle 9 dargestellt. Die Wiederfindung variierte zwischen 83 und 105%.

Präzision (Wiederholbarkeit): 15,5-22,2% CV

Die Wiederholbarkeit des Quantum Blue® fCAL Tests wurde berechnet mit Hilfe von zwei Stuhlextrakten mit Calprotectingehalten von 49 und $138 \mu\text{g/g}$. Jede Probe wurde gemäss der Testanleitung in einem Lauf mit je 20 Replikaten innerhalb von 10 Minuten angesetzt und gemessen. Die Mittelwerte von drei verschiedenen Lots von Testkassetten werden in der Tabelle 10 dargestellt. Die Wiederholbarkeit lag zwischen 15,5-22,2% CV.

Inter-lot Präzision: 20,2-24,5% CV

Die Inter-Lot Präzision der Quantum Blue® fCAL Tests wurde berechnet mit Hilfe von vier Stuhlextrakten mit Calprotectingehalten zwischen 30 und $244 \mu\text{g/g}$. Jede Probe wurde gemäss der Testanleitung in einem Lauf mit 20 Replikaten innerhalb von 10 Minuten angesetzt und gemessen. Dazu wurden jeweils 3 verschiedene Testkassetten Lots eingesetzt. Die errechneten CVs für die 4 Proben lagen zwischen 20,2 und 24,5%.

Methodenvergleich: $R^2 = 0,806$, $y = 1,02x - 11,1 \mu\text{g/g}$

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

UTILISATION PRÉVUE

Le BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL est un test de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de la calprotectine dans les prélèvements de selles humains destiné à aider à l'évaluation de l'inflammation de la muqueuse intestinale. Les résultats du dosage peuvent aider au diagnostic différenciant une maladie inflammatoire organique du tractus gastro-intestinal (maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou MICI, spécifiquement maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable ou SCI) (réf. 1-7), chez les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques.

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

Europe : pour utilisation professionnelle.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'antigène de la calprotectine par un dosage immunologique de type sandwich. Un anticorps monoclonal de capture (mAb) hautement spécifique de la calprotectine est déposé sur la membrane test. Un second anticorps monoclonal, conjugué à de l'or colloïdal permettant la détection, est présent sur la bande de libération du conjugué. Il est libéré dans le système après ajout de l'échantillon de selle extrait et dilué. Le conjugué calprotectine/anti-calprotectine-or se lie à l'anticorps anti-calprotectine déposé sur la membrane test (ligne test) et le restant du conjugué anti-calprotectine-or qui n'a pas réagi se lie à l'anticorps de chèvre anti-souris déposé sur la membrane test (ligne contrôle). Les intensités de signal de la ligne de test (T) et de la ligne de contrôle (C) sont mesurées quantitativement par le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cassette test	25 pièces	B-CAL-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon d'extraction	1 flacon 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Contrôles bas*/élevé*	2 flacons, 0.5 mL	B-LFCAL-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-LFCAL-RCC	Carte en plastique blanche

Tableau 1

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

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

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

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

Dispositifs d'extraction de selles

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

Kits de dispositifs d'extraction	Quantité	Code
Tube d'extraction CALEX® Cap	Paquets de 50, 200 ou 500 tubes disponibles, chaque tube contenant 5 mL de tampon d'extraction Prêt à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubes, comprenant chacun spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes constitués d'un tube, d'un cône et d'un embout doseur, chacun rempli de 1,3 mL de tampon d'extraction Prêt à l'emploi	B-CAL-SO50

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à pointes jetables : 10 - 200 µL et 1 mL
- Centrifugeuse
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène de 5 mL pour la préparation des dilutions d'échantillons
- minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Papier absorbant

PRECAUTIONS

Précautions de sécurité

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

ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

Précautions techniques

Composants du kit

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

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le dosage de Quantum Blue® fCAL (CAL_0 ou CAL_720) avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID blanche pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Les échantillons dilués doivent être utilisés dans un délai de quelques heures et ne peuvent être conservés plus longtemps.
- Il est important de centrifuger les extraits avec Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ avant de les conserver, 5 min à 3 000 x g. Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation.

PRELEVEMENT, STOCKAGE DES ECHANTILLONS, STABILITE

Moins de 1 g d'échantillon primaire de selles est exigé par la procédure d'extraction. Récupérer l'échantillon de selles dans des tubes ordinaires.

Important : l'échantillon doit être collecté sans adjonction de quelque additif chimique ou biologique que ce soit.

Transport des échantillons

Les échantillons de selles doivent être reçus par le laboratoire en charge du traitement dans les 3 jours qui suivent la collecte. Les échantillons de selles peuvent être expédiés à température ambiante ou réfrigérés.

Conservation des échantillons

Les échantillons de selles doivent être réfrigérés à 2-8 °C et extraits dans les 3 jours qui suivent leur réception par le laboratoire. Ne pas stocker les échantillons à des températures élevées.

Stabilité des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus avec le dispositif CALEX® Cap sont stables à température ambiante (23 °C) pendant 7 jours et à 2-8 °C jusqu'à 15 jours. Pour un stockage plus long, congeler les extraits à -20 °C. Les extraits congelés sont stables pendant une durée pouvant aller jusqu'à 23 mois.

Les extraits CALEX® Cap peuvent être directement stockés et congelés dans le dispositif CALEX® Cap. Les extraits peuvent être soumis à quatre cycles de congélation-décongélation. Avant la mesure, laisser les extraits congelés s'équilibrer à température ambiante. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l'étape 2 dans le chapitre procédure de dosage.

La calprotectine dans les extraits obtenus au moyen de la méthode par pesée manuelle ou au moyen des dispositifs BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ est stable à 2-8 °C pendant ≤ 7 jours et à -20 °C pendant 36 mois.

PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage se déroule en trois étapes :

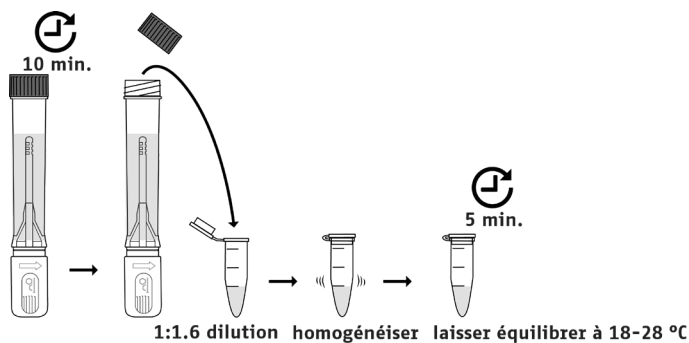
1. Extraction des échantillons de selles :

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

Dispositif CALEX® Cap : Les échantillons de selles liquides peuvent être directement pipetés dans le dispositif CALEX® Cap. Dévisser le bouchon bleu et pipeter 10 µL d'échantillon de selles dans le dispositif. Reboucher le dispositif CALEX® Cap et passer à l'étape d'homogénéisation au vortex conformément à la procédure d'extraction décrite et illustrée dans les instructions d'utilisation livrées avec le dispositif CALEX® Cap.

2. Préparation des extraits :

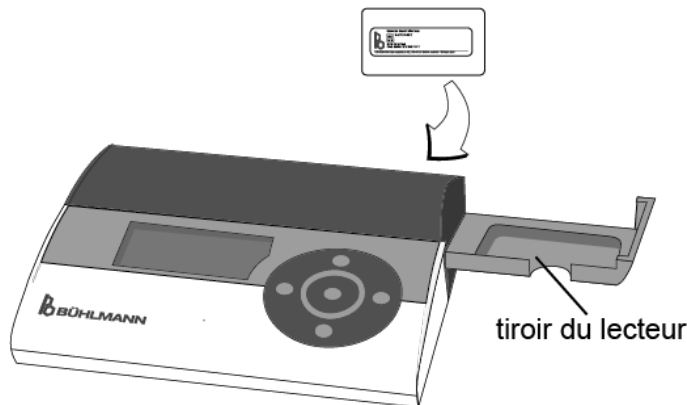
- Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : après extraction, laisser les extraits reposer pendant 10 minutes. Diluer le surnageant au 1/16ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 20 µL d'extrait et 300 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).
- Dispositif CALEX® Cap : après extraction, laisser reposer les extraits pendant 10 minutes, embout blanc vers le bas. Dévisser le bouchon bleu et diluer le surnageant au 1/16ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 200 µL d'extrait et 120 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).



3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat :

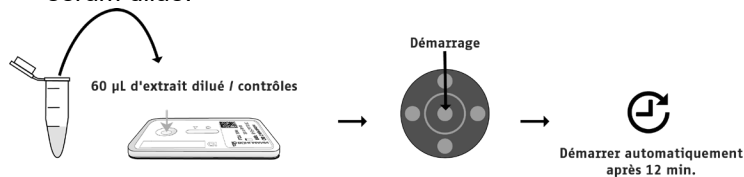
Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respectivement < CAL_720 > et < CAL_0 >. Sélectionner l'une des méthodes avant de procéder au test.

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



3.1. Méthode < CAL_720 > avec minuteur interne

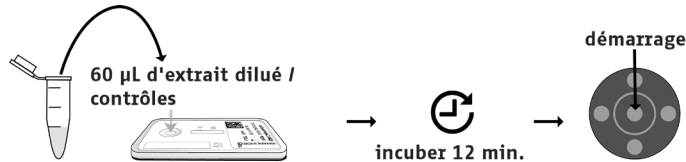
- Déposer la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Ajouter 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Fermer le tiroir et lancer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 12 minutes (720 seconds).
- Pour les contrôles bas / haut : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.



3.2. Méthode < CAL_0 > sans minuteur interne

- Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incuber pendant 12 +/-1 minutes en réglant un minuteur manuellement.
- Charger la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette en appuyant sur le bouton de démarrage du Quantum Blue® Reader.

- Pour les contrôles bas / haut : Répéter l'étape 3.2 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'échantillon de sérum dilué.



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

CONTROLE DE QUALITE

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

VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir figures 1A et 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable de calprotectine n'est présente dans l'échantillon de selle. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (figure 1B), la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon de selle est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 12 minutes de temps d'incubation (figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 12 minutes de temps d'incubation (figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil au bout de 12 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

STANDARDISATION

- Le dosage en flux latéral est standardisé contre le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe est générée avec les valeurs médianes (n≥10 mesures à chaque fois) provenant d'au moins 10 points de calibrage et d'échantillons de selles différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de mesure se situe entre 30 et 300 µg/g.
- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs au-dessus à 300 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (code de commande : LF-CHR25).

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse Quantum Blue® fCAL sont uniquement destinés à la détermination des taux de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les dosages de la calprotectine fécale visent à contribuer au diagnostic permettant de distinguer une maladie organique d'une maladie fonctionnelle. Les résultats devraient toujours être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire.
- Les patients qui prennent des AINS de façon régulière peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés.
- Les résultats peuvent ne pas être cliniquement applicables aux enfants de moins de 4 ans dont les niveaux de calprotectine sont légèrement supérieurs à la normale (réf. 8-11).

INTERPRETATION DES RESULTATS

Différenciation entre maladie organique et maladie gastro-intestinale fonctionnelle

La détermination des niveaux de calprotectine fécale peut servir d'aide fiable et simple à la différenciation des maladies organiques des maladies gastro-intestinales fonctionnelles (réf. 1-7).

Les catégories de résultats se basent sur les données d'études cliniques mises en œuvre par BÜHLMANN et constituent des recommandations de BÜHLMANN. Tous les résultats de test doivent être interprétés en conjonction avec les informations obtenues à partir des symptômes cliniques du patient, ses antécédents médicaux et les autres résultats cliniques et biologiques :

Valeurs seuils cliniques

Les données suivantes ont été établies au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA (réf. de commande : EK-CAL). Les résultats provenant de 58 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour un SCI et de 131 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour une MICI, provenant d'une étude clinique internationale, ont été analysés pour obtenir les valeurs décrites dans le tableau 3.

Concentration en calprotectine	Interprétation	Suite
< 80 µg/g	Normale	Aucune
80 – 160 µg/g	Zone grise/frontière	Suite dans les 4 à 6 semaines
> 160 µg/g	Supérieure à la normale	Répéter le cas échéant

Tableau 3

Valeurs de calprotectine inférieures à 80 µg/g

Des valeurs de calprotectine fécale < 80 µg/g n'indiquent pas d'inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est peu probable que les patients présentant de faibles niveaux de calprotectine nécessitent des procédures invasives visant à déterminer la cause de l'inflammation.

Valeurs de calprotectine comprises entre 80 et 160 µg/g (bornes incluses)

Des niveaux de calprotectine fécale moyens, compris entre 80 et 160 µg/g, bornes incluses, également qualifiés de niveaux dans la zone grise, ne sont pas directement révélateurs d'une inflammation active exigeant un suivi thérapeutique immédiat par des tests invasifs. Cependant, la présence d'une inflammation ne peut pas être exclue. Il est recommandé de réévaluer les niveaux de calprotectine fécale après 4 à 6 semaines pour déterminer l'état d'inflammation.

Valeurs de calprotectine supérieures à 160 µg/g

Des valeurs de calprotectine fécale supérieures à 160 µg/g indiquent une infiltration de neutrophiles dans le tractus gastro-intestinal ; ceci peut signaler la présence d'une maladie inflammatoire active. Des procédures de recherche supplémentaires et appropriées menées par des spécialistes sont suggérées pour obtenir un diagnostic clinique global.

Évaluation clinique

La capacité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA à différencier les patients atteints de MICI des autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI, a été testée dans une étude clinique avec un total de 337 patients adultes et pédiatriques. Cent trente-cinq patients (135) présentaient un diagnostic final de MICI (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique ou colite indétectée), 130 patients souffraient de SCI et 72 patients présentaient des douleurs abdominales et/ou des diarrhées, ou d'autres états non inflammatoires liés au tractus gastro-intestinal (voir tableau 4). Le diagnostic final était étayé par des résultats endoscopiques ainsi que d'autres résultats cliniques.

Une sensibilité clinique de 93,3% à 80 µg/g et une spécificité clinique de 83,7% à 160 µg/g peuvent être atteintes dans la différenciation entre MICI et les autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,923 (voir tableau 5).

Une sensibilité clinique de 93,3% à 80 µg/g et une spécificité clinique de 85,4% à 160 µg/g peuvent être atteintes dans la différenciation entre MICI et le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,933 (voir tableau 6).

La combinaison optimale des seuils pour ces pools de patients a pu être définie par analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) à 80 µg/g et 160 µg/g de calprotectine, ce qui est légèrement plus

restrictif que la combinaison **du seuil bas plus sensible de 50 µg/g** mais avec une performance de spécificité inférieure, et **du seuil haut de 200 µg/g** de sensibilité légèrement inférieure (tableaux 7 et 8).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LoB) : < 7 µg/g de calprotectine

La LoB a été calculé selon le protocole CLSI EP17-A dans trois analyses indépendantes de trois lots différents de cassettes test pour un total de 60 valeurs de blanc, l'échantillon étant le tampon d'extraction.

Limite de détection (LoD) : 15 µg/g de calprotectine

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

Limite de quantification (LoQ) :

LoQ inférieure : ≤ 30 µg/g de calprotectine

LoQ supérieure : ≥ 300 µg/g de calprotectine

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

Linéarité

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

Récupération : 92%

Quatre échantillons de selles comportant des taux faibles de calprotectine ont été additionnés avec différentes quantités de couches leucocytaires humaines diluées contenant des concentrations élevées de calprotectine. Chaque échantillon a été mesuré avant et après ajout de la couche sur deux cassettes test différentes selon la procédure de dosage. Les résultats sont présentés dans le tableau 9. La récupération varie de 83-105%.

Précision (répétabilité) : 15,5%-22,2% CV

La répétabilité du dosage Quantum Blue® fCAL est calculée à partir de 2 échantillons d'extraits de selles contenant 49 et 138 µg/g de calprotectine. Chaque échantillon est analysé selon le mode opératoire de dosage, en une analyse à raison de 20 réplicats préparés en 10 minutes chacun. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de cassettes test sont répertoriées dans le tableau 10. La répétabilité varie de 15,5 à 22,2% de CV.

Précision inter-lots : 20,2-24,5% CV

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

Comparaison des méthodes : $R^2 = 0,806$; $y = 1,02x - 11,1$ µg/g

Cent et un (101) extraits de selles de sujets soumis à un diagnostic de différenciation entre MICI et SCI et présentant des concentrations en calprotectine dans l'intervalle de mesure conseillé du système de dosage Quantum Blue® fCAL sont analysés selon le mode opératoire de dosage avec un jeu de données obtenu à partir de cassettes test de six lots différents. Les résultats sont ensuite comparés aux valeurs obtenues avec le dosage ELISA BÜHLMANN fCAL® (référence : EK-CAL). Les résultats de corrélation sont illustrés sur la figure 4.

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane e viene impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto alla diagnosi differenziale tra malattie gastrointestinali organiche infiammatorie (malattia infiammatoria intestinale (IBD), nello specifico la malattia di morbo di Crohn o colite ulcerosa (CU)) e funzionali (sindrome dell'intestino irritabile (IBS)) (rif. 1-7), in pazienti con dolore addominale cronico.

Per l'uso in laboratorio.

Europa: per uso professionale.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione quantitativa dell'antigene calprotectina mediante un immunodosaggio a sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura (mAb) molto specifico per la calprotectina riveste la membrana di rilevazione. Un secondo anticorpo monoclonale di rilevazione, coniugato a oro colloidale e deposto sul supporto di rilascio del coniugato, viene rilasciato nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione (T) e della banda di controllo (C) sono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

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

Tabella 1

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

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

REAGENTI E MATERIALI FORNITI SU RICHIESTA**Dispositivi di estrazione delle feci**

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

Kit di dispositivi di estrazione	Quantità	Codice
Dispositivo CALEX® Cap	Sono disponibili confezioni da 50, 200 o 500 provette contenenti 5 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte 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 provette costituite da provetta, cono e tappo dosatore, contenenti 1,3 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso	B-CAL-SO50

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

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

PRECAUZIONI**Precauzioni di sicurezza**

- I controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BLP) utilizzando le dovute precauzioni.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle buone Pratiche di Laboratorio (BPL).
- 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.

- I reagenti e gli agenti chimici devono essere trattati come rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

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

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, gestiti o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il test Quantum Blue® fCAL (CAL_0 o CAL_720) prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader).
- Utilizzare la carta RFID bianca per modificare i parametri del test specifici per ogni lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro alcune ore e non possono essere conservati più a lungo.
- È importante che gli estratti con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3.000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta.

RACCOLTA, CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI, STABILITÀ

Per la procedura di estrazione è necessario meno di 1 g di campione di feci native. Raccogliere il campione di feci in provette semplici.

Importante: Il campione deve essere raccolto senza l'aggiunta di nessun additivo chimici o biologici.

Trasporto dei campioni

I campioni di feci devono essere ricevuti per il processamento da parte del laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni di feci possono essere spediti a temperatura ambiente o refrigerati.

Conservazione dei campioni

I campioni di feci devono essere refrigerati a 2-8 °C ed estratti entro 3 giorni dalla ricezione in laboratorio. I campioni non vanno conservati a temperature elevate.

Stabilità degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti con il dispositivo CALEX® Cap sono stabili a temperatura ambiente (23 °C) per 7 giorni e a 2-8 °C al massimo per 15 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare gli estratti a -20 °C. Gli estratti congelati sono stabili per un periodo massimo di 23 mesi.

Gli estratti ottenuti con CALEX® Cap possono essere conservati e congelati direttamente dentro il dispositivo CALEX® Cap. Gli estratti possono subire al massimo 4 cicli di congelamento/ scongelamento. Prima della misurazione, lasciare equilibrare gli estratti a temperatura ambiente. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo procedura del test.

La calprotectina contenuta negli estratti ottenuti mediante metodi di pesatura manuale, BÜHLMANN Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ rimane stabile a 2-8 °C per ≤ 7 giorni o a -20 °C per 36 mesi.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

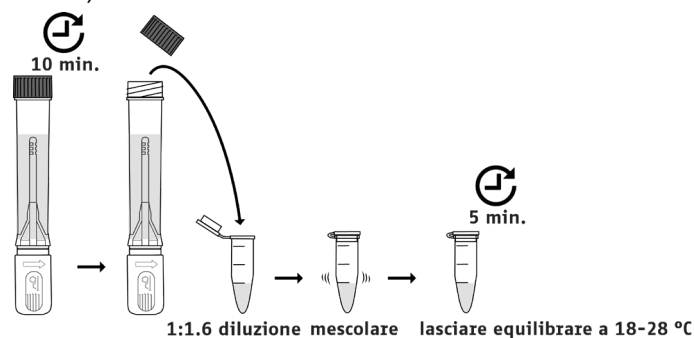
1. Estrazione dei campioni di feci:

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

Dispositivo CALEX® Cap: I campioni di feci liquide possono essere pipettati direttamente nel dispositivo CALEX® Cap. Svitare il tappo blu e pipettare 10 µL di campione di feci nel dispositivo. Richiudere il dispositivo CALEX® Cap e vortexare secondo la procedura di estrazione descritta e illustrata nelle Istruzioni per l'uso fornite insieme al dispositivo CALEX® Cap.

2. Trattamento del campione:

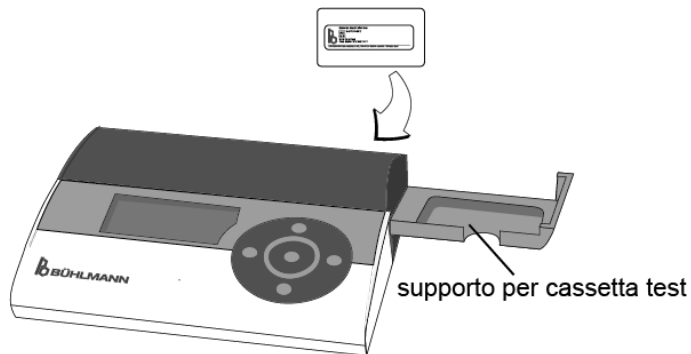
- Smart-Prep o ScheBo® Quick Prep™: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:16 con il tampone di estrazione (es. 20 µL di estratto e il 300 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti con l'estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu e diluire il surnatante 1:1.6 con il tampone di estrazione (es. 200 µL di estratto e il 120 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).



3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:

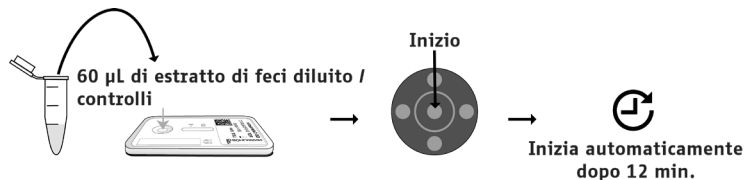
Esistono due metodi alternativi disponibili sul Quantum Blue® Reader: <CAL_720> e <CAL_0>. Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno di questi metodi.

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



3.1 Metodo <CAL_720> con timer interno

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



3.2 Metodo <CAL_0> senza timer interno

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



Importante: Consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il reader, in particolare per informazioni sulla selezione dei metodi di analisi e su

come caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID sul Quantum Blue® Reader.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la prestazione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori tecnici, si controllino gli aspetti seguenti: i) dispositivi di pipettaggio, controllo della temperatura e temporizzazione, ii) data di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.
- Il 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 calprotectina presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 12 minuti di incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 12 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.

STANDARDIZZAZIONE

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

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL sono destinati alla determinazione di livelli di calprotectina solo in campioni di feci umane.
- I valori di calprotectina fecale sono intesi come supporto per la diagnosi nel distinguere malattie organiche da malattie funzionali. I risultati devono essere sempre interpretati in abbinamento ad altri esami clinici e di laboratorio.
- I pazienti che assumono regolarmente farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) possono esibire livelli elevati di calprotectina fecale.
- I risultati non possono essere clinicamente applicabili a bambini di età inferiore ai 4 anni, i quali presentano livelli di calprotectina lievemente più alti (rif. 8-11).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Differenziazione della malattia gastrointestinale organica da quella funzionale

La determinazione dei livelli di calprotectina può essere usata come supporto semplice e affidabile per differenziare le malattie gastrointestinali organiche da quelle funzionali (rif. 1-7).

Le categorie dei risultati sono basate su dati ottenuti in studi clinici eseguiti da BÜHLMANN e costituiscono le raccomandazioni di BÜHLMANN. Tutti i risultati dei test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni disponibili dai sintomi clinici del paziente, dalla anamnesi e da altri risultati clinici e di laboratorio.

Soglie cliniche

I seguenti dati sono stati stabiliti usando il dispositivo BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice ordine EK-CAL).

Per ottenere i valori descritti nella tabella 3, sono stati analizzati i risultati ottenuti in uno studio clinico internazionale condotto su 58 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBS e 131 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBD.

Concentrazione di calprotectina	Interpretazione	Follow-up
< 80 µg/g	Normale	Nessuno
80 – 160 µg/g	Zona grigia/Borderline	Follow-up entro 4-6 settimane
> 160 µg/g	Elevata	Ripetere ogni qualvolta necessario

Tabella 3

Valori di calprotectina inferiori a 80 µg/g

I valori di calprotectina fecale <80 µg/g non sono indicative di infiammazione nel tratto gastrointestinale. È probabile che i pazienti con livelli bassi di calprotectina non necessitano di procedure invasive per determinare la causa dell'infiammazione.

Valori di calprotectina compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g

I livelli intermedi di calprotectina fecale compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g, detti anche livelli nella zona grigia, non sono direttamente indicativi di un'infiammazione attiva che richieda un controllo immediato con l'esecuzione di test invasivi. Tuttavia non si può escludere la presenza di infiammazione. Si raccomanda di rivalutare

il livello della calprotectina dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio.

Valori di calprotectina maggiori di 160 µg/g

I valori di calprotectina fecale >160 µg/g sono indicativi di infiltrati di neutrofili nel tratto gastrointestinale; pertanto questo può segnalare la presenza di una malattia infiammatoria in fase attiva. Per ottenere una diagnosi clinica completa si suggerisce di procedere con le appropriate procedure investigative da parte di specialisti.

Valutazione clinica

La capacità di BÜHLMANN fCAL® ELISA di differenziare tra IBD e altre malattie gastrointestinali (GI) non infiammatorie, inclusa la IBS, è stata valutata in uno studio clinico condotto in totale su 337 pazienti adulti e pediatrici. Di questi pazienti, 135 avevano una diagnosi finale di IBD (morbo di Crohn, colite ulcerosa o colite indeterminata), 130 una diagnosi di IBS e 72 presentavano dolore addominale e/o diarrea, o altre condizioni non infiammatorie GI-correlate (vedere la tabella 4). La diagnosi finale è stata confermata sia endoscopicamente sia tramite altri reperti clinici.

Nella differenziazione tra IBD e condizioni non infiammatorie GI-correlate, inclusa la IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'83,7% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) è risultata una AUC (area sotto la curva) di 0,923 (vedere la tabella 5).

Nella differenziazione tra IBD e IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'85,4% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC è risultata una AUC di 0,933 (vedere la tabella 6).

È stato possibile definire una combinazione di cut-off ottimale mediante un'analisi ROC per questi pool di pazienti pari a 80 µg/g e a 160 µg/g di calprotectina che è leggermente più stringente rispetto a una combinazione con **cut-off minimo a 50 µg/g**, più sensibile ma con prestazioni di specificità inferiori, e **cut-off massimo a 200 µg/g** con una sensibilità leggermente minore (tabelle 7 e 8).

PERFORMANCE CARATTERISTICA

Limite del Bianco (LoB): <7 µg/g di calprotectina

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

Limite di rilevabilità (LoD): 15 µg/g di calprotectina

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

Limite di Quantificazione (LoQ):

LoQ inferiore ≤30 µg/g di calprotectina

LoQ superiore ≥300 µg/g di calprotectina

Il LoQ è stato stabilito con sette estratti fecali con concentrazioni comprese tra 14.5 e 622 µg/g. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di card in tre sedute di analisi indipendenti di 10 repliche, ciascuna programmata entro 20 minuti, e sono state quindi calcolate le medie. Il profilo di precisione risultante è mostrato in figura 2. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di calprotectina con un'imprecisione inferiore al 25% di CV, che consente una misurazione quantitativa nel range da 30 (LoQ inferiore) a 300 µg/g (LoQ superiore).

Linearità

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

Recupero: 92%

Quattro campioni fecali con bassi livelli di calprotectina sono stati inoculati con quantità differenti di una soluzione stock di calprotectina ad elevate concentrazioni. Ogni campione è stato analizzato prima e dopo l'inoculo con due card differenti, secondo la procedura prevista per il dosaggio. I risultati sono riportati in tabella 9. Il recupero del saggio dei 4 campioni varia tra 83-105% CV.

Precisione (ripetibilità): 15,5-22,2% CV

La ripetibilità del saggio Quantum Blue® fCAL è stata calcolata da 2 campioni di estratti fecali contenenti 49 e 138 µg/g di calprotectina. Ciascun campione è stato controllato con la procedura prevista per il dosaggio in un seduta di analisi di 20 repliche programmate entro 10 minuti. I valori medi di tre diversi lotti di cassette sono presentati nella tabella 10. La ripetibilità del saggio dei 4 campioni varia tra 15,5-22,2% CV.

Precisione inter-lotto: 20,2-24,5% CV

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

Confronto dei metodi: $R^2 = 0,806$; $y=1,02x-11,1$ µg/g

Centouno (101) estratti fecali da pazienti sottoposti a indagine IBD contro IBS con concentrazioni di calprotectina all'interno dell'intervallo di misurazione indicato del saggio Quantum Blue® fCAL sono stati analizzati con la procedura prevista per il dosaggio utilizzando un insieme di dati originati da card di sei diversi lotti; i risultati sono stati confrontati con i valori ottenuti mediante la procedura di dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL). Le correlazioni sono illustrate in figura 4.

INDICACIONES DE USO

El ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de la calprotectina en muestras de heces humanas al efecto de facilitar la valoración de la inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo pueden utilizarse en el diagnóstico para distinguir entre las enfermedades inflamatorias orgánicas del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, CU) (ref. 1-7) y las enfermedades funcionales (síndrome del colon irritable, SII) en los pacientes con dolor abdominal crónico.

Para uso en laboratorio.

Europa: para uso profesional.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

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

Tabla 1

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

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

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

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

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

Kits de dispositivos de extracción	Cantidad	Código
Dispositivos CALEX® Cap	Paquetes de 50, 200 o 500 tubos disponibles, cada uno de los cuales contiene 5 mL de tampón de extracción. Listo para usar	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos que consisten en espátulas y tapas de base	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos compuestos de tubo, cono y punta dosificadora, cada uno de los cuales contiene 1,3 mL de tampón de extracción. Listo para usar	B-CAL-SO50

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Vórtex para la extracción de heces.
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 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).
- Quantum Blue® Reader disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS).
- Pañuelos suaves o papel secante.

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque ha dado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tomando las precauciones adecuadas.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) tomando las precauciones apropiadas.

- **Reactivos:** Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con agua abundante; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- Los reactivos y productos químicos deben tratarse como residuos peligrosos conforme a las directrices o normas nacionales de seguridad sobre riesgos biológicos.

Precauciones técnicas

Componentes del kit

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

Procedimiento de ensayo

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El Quantum Blue® Reader debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de calprotectin (CAL_0 o CAL_720) antes de iniciar el análisis (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- Utilizarse la tarjeta blanca con chip RFID para modificar/ para cambiar los parámetros de prueba específicos de lote.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción.
- 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.

OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS, ESTABILIDAD

Para el procedimiento de extracción, se requiere menos de 1 g de muestra de heces naturales. Recoger la muestra de heces en tubos simples.

Importante: La muestra debe recogerse sin ningún aditivo químico o biológico.

Transporte de las muestras

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces para su procesamiento en un plazo de 3 días desde su

recolección. Las muestras de heces pueden enviarse a temperatura ambiente o refrigeradas.

Conservación de las muestras

Las muestras de heces deben refrigerarse a 2-8 °C y extraerse en un plazo de 3 días a partir de su recepción en el laboratorio. No conservar las muestras a temperaturas elevadas.

Estabilidad de los extractos

Los extractos de calprotectina fecal en los extractos obtenidos con CALEX® Cap son estables a temperatura ambiente (23 °C) durante 7 días y a 2-8 °C hasta 15 días. Para una conservación más prolongada, congelar los extractos a -20 °C. Los extractos congelados son estables durante un período de hasta 23 meses.

Los extractos de Calex® Cap pueden ser conservados y congelados directamente en el dispositivo CALEX® Cap. Los extractos pueden someterse a cuatro ciclos de congelación y descongelación. Antes de la medición, equilibrar los extractos congelados a temperatura ambiente. Para la reutilización/ nueva medición de los extractos de ver el paso 2 en el capítulo procedimiento de ensayo.

La calprotectina de los extractos obtenidos mediante un método de pesada manual, BÜHLMANN Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ es estable a entre 2 y 8 °C durante ≤ 7 días o a -20 °C durante 36 meses.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

El procedimiento del ensayo consiste en tres pasos:

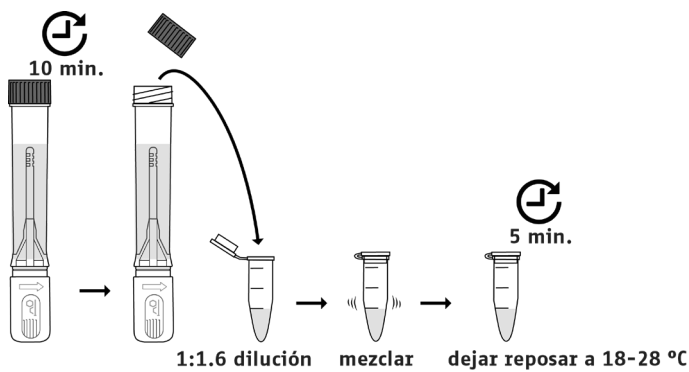
1. Extracción de las muestras de heces:

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

Dispositivo CALEX® Cap: Las muestras de heces líquidas se pueden pipetear directamente en el dispositivo CALEX® Cap. Desenroscar la tapa azul y pipetear 10 µl de muestra de materia fecal en el dispositivo. Volver a tapar el dispositivo CALEX® Cap y proceder con el paso de mezclado en vórtex de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito e ilustrado en las instrucciones de uso suministradas con el dispositivo CALEX® Cap.

2. Procesamiento de las muestras:

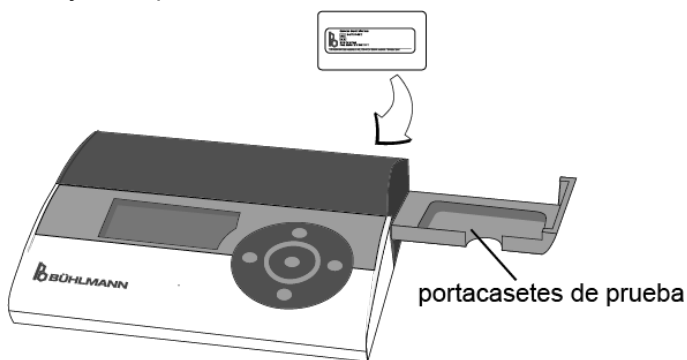
- Smart-Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir el sobrenadante de heces 1:16 con tampon de extracción (e.g. 20 µL extracto y 300 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: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



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

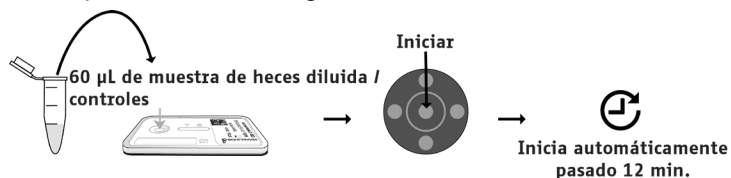
En el lector Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CAL_720> y <CAL_0>. Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

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



3.1. Método <CAL_720> con cronómetro interno

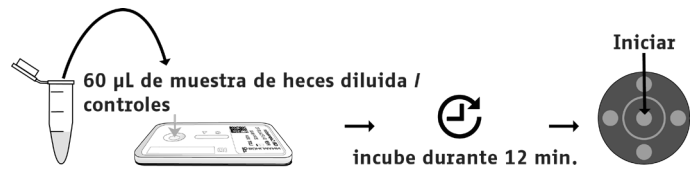
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Añada 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El escaneo se inicia automáticamente pasados 12 minutos (720 segundos).
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.1 usando 60 µL de control en lugar de muestra de suero diluida.



3.2 Método <CAL_0> sin cronómetro interno

- Añada 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 12 minutos +/- 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba Quantum Blue® Reader.
- Inicie el escaneo del casete con el Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<ENTER>) inmediatamente.

- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de muestra de suero diluida.



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

CONTROL DE CALIDAD

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

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para la obtención de un resultado válido de la prueba, la línea control (C) debe ser visible en cualquier caso (véanse las figuras 1A y 1B). Se usa sólo como control funcional de la prueba y no puede usarse para la interpretación de la línea de test (T). Si la línea de test (T) no es detectable después de 12 minutos de incubación (figura 1A), no hay cantidades detectables de calprotectina presentes en la muestra de heces. Si la línea de test (T) es detectable después de 12 minutos de incubación (figura 1B), la cantidad de calprotectina presente en la muestra de heces se calcula mediante el Quantum Blue® Reader.
- Si sólo la línea de test (T) es detectable después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Si ni la línea control (C) ni la línea de test (T) se detectan después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.
- Como el Quantum Blue® Reader permite la evaluación cuantitativa de las líneas de test (T) y control (C), se realiza una validación adicional de la validez de la línea control (C). Si la intensidad de la línea control (C) es inferior a un umbral después de 12 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un casete de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN

- Quantum Blue® fCAL está estandarizado con el BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para orden: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® Reader de BÜHLMANN utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. Esta curva de calibración específica del lote se genera con los valores medianos ($n \geq 10$ mediciones cada uno) de al menos 10 puntos de calibración obtenidos de diferentes muestras de heces con concentraciones conocidas de calprotectina. El rango de ensayo es entre 30 y 300 $\mu\text{g/g}$.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por encima de 300 $\mu\text{g/g}$ pueden repetirse con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (código de orden: LF-CHR25).

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit Quantum Blue® fCAL sirven únicamente para la determinación de niveles de calprotectina en muestras de heces humanas.
- Los valores de calprotectina fecal son una ayuda para facilitar el diagnóstico distinguiendo entre enfermedad orgánica y enfermedad funcional. Los resultados deben interpretarse siempre en combinación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener niveles de calprotectina fecal elevados.
- Los resultados pueden no ser clínicamente aplicables a niños menores de 4 años de edad con ligeros aumentos de la concentración de calprotectina fecal (ref. 8-11).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Diferenciar entre las enfermedades gastrointestinales orgánicas de las funcionales

La determinación de la concentración de calprotectina fecal puede ayudar de forma fiable y sencilla a diferenciar las enfermedades gastrointestinales orgánicas de las funcionales (ref. 1-7).

Las categorías de resultados se basan en datos de estudios clínicos realizados por BÜHLMANN y son recomendaciones de BÜHLMANN. Todos los resultados del ensayo deben ser interpretados en combinación con la información derivada de las manifestaciones clínicas del paciente, sus antecedentes médicos y otros datos clínicos y de laboratorio.

Umbrales clínicos

Los datos siguientes se establecieron con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL).

Se analizaron los resultados de 58 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con SII y 131 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con EII, de un estudio clínico internacional, para obtener los valores mostrados en la tabla 3.

Concentración de calprotectina	Interpretación	Seguimiento
< 80 $\mu\text{g/g}$	Normal	Ninguno
80 – 160 $\mu\text{g/g}$	Zona gris/valor límite	Seguimiento en un plazo de 4 a 6 semanas
> 160 $\mu\text{g/g}$	Elevado	Repetir según sea necesario

Tabla 3

Valores de calprotectina por debajo de 80 $\mu\text{g/g}$

Unos valores de calprotectina fecal <80 $\mu\text{g/g}$ no son indicativos de inflamación gastrointestinal. Los pacientes con bajas concentraciones de calprotectina probablemente no necesiten procedimientos invasivos para determinar la causa de la inflamación.

Valores de calprotectina entre o igual a 80 y 160 $\mu\text{g/g}$

Unos valores intermedios de calprotectina fecal de entre o igual a 80 y 160 $\mu\text{g/g}$, también denominados valores de la zona gris, no son una indicación directa de inflamación activa que requiera un seguimiento inmediato con pruebas invasivas. Sin embargo, no se puede excluir la presencia de inflamación. Se recomienda la reevaluación de los valores de calprotectina fecal después de entre 4 y 6 semanas para determinar el estado inflamatorio.

Valores de calprotectina superiores a 160 $\mu\text{g/g}$

Los valores de calprotectina fecal >160 $\mu\text{g/g}$ son indicativos de infiltrado neutrofílico en el tubo gastrointestinal y pueden indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria activa. Se recomienda llevar a cabo los procedimientos de investigación especializados oportunos para alcanzar un diagnóstico clínico global.

Evaluación clínica

La capacidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA para diferenciar la EII de los otros trastornos gastrointestinales no inflamatorios, incluido el SII, se evaluó en un estudio clínico en el que participaron 337 pacientes adultos y niños. Ciento treinta y cinco (135) pacientes tenían un diagnóstico final de EII (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o colitis intermedia), 130 pacientes presentaban SII y 72 pacientes presentaban dolor abdominal y/o diarrea u otras afecciones gastrointestinales no inflamatorias (véase la tabla 4). El diagnóstico final se apoyó en datos endoscópicos y otros datos clínicos.

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 $\mu\text{g/g}$ y una especificidad clínica del 83,7% a 160 $\mu\text{g/g}$ en la diferenciación entre la EII y otras afecciones gastrointestinales no inflamatorias, incluido el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,923 (véase la tabla 5).

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 $\mu\text{g/g}$ y una especificidad clínica del 85,4% a 160 $\mu\text{g/g}$ en la diferenciación entre la EII y el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,933 (véase la tabla 6).

La combinación óptima de cortes para estos grupos de pacientes se estableció en 80 $\mu\text{g/g}$ y 160 $\mu\text{g/g}$ de calprotectina mediante el análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC). Esta combinación es ligeramente más restrictiva que la combinación de **un corte inferior más sensible de 50 $\mu\text{g/g}$** , con una especificidad ligeramente inferior, y **un corte superior de**

200 µg/g, con una sensibilidad ligeramente inferior (tablas 7 y 8).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite para el blanco (LoB): <7 µg/g de calprotectina

El LoB se ha establecido de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A en tres series de lecturas independientes utilizando tres lotes diferentes de cassettes de análisis con un total de 60 valores para el blanco utilizando tampón de extracción como muestra.

Límite de Detección (LoD): 15 µg/g de calprotectina

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

Límite de Cuantificación (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g de calprotectina

LoQ superior: ≥300 µg/g de calprotectina

El LoQ se ha establecido a partir de siete extractos de heces con concentraciones de entre 14,5 y 622 µg/g. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de casetes de análisis en tres tandas de lecturas independientes de 10-20 réplicas cada una configuradas en un intervalo de 10 minutos, obteniéndose luego los valores medios. En la 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 300 µg/g (LoQ superior).

Linealidad

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

Recuperación: 92%

A cuatro muestras de heces con concentraciones bajas de calprotectina se añadieron diferentes cantidades de una solución stock de calprotectina altamente concentrada. Cada muestra se midió antes y después de añadir cantidades conocidas, en tres casetes de prueba diferentes, según el procedimiento del ensayo. Los valores medios obtenidos tras promediar los tres réplicas se presentan en la tabla 9. La recuperación varía entre 83 y 105%.

Precisión (repetibilidad): 15,5%-22,2% CV

La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® fCAL se calculó a partir de 2 muestras de heces extraídas que contenían 49 y 138 µg/g de calprotectina. Cada muestra se ensayó de acuerdo al procedimiento de ensayo en una tanda de lectura de 20 réplicas configurada en un intervalo de 10 minutos. En la tabla 10 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de casetes de análisis. La respetabilidad del ensayo varía entre 15,5 y 22,2% CV.

Precisión interlote: 20,2-24,5% CV

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

Comparación de métodos: $R^2 = 0,806$; $y = 1,02x - 11,1$ µg/g

Se analizaron 101 extractos de heces de sujetos sometidos a pruebas para discernir EII de SII que presentaban concentraciones de calprotectina dentro del rango de medición indicado del ensayo Quantum Blue® fCAL, utilizando un conjunto de datos obtenidos con casetes de análisis de seis lotes diferentes y se compararon los resultados con los valores obtenidos con el método ELISA para calprotectina de BÜHLMANN fCAL® (código para pedidos: EK-CAL). Los datos de correlación se ilustran en la figura 4.

PORTUGUÊS

USO PRETENIDO

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL é um teste de diagnóstico *in vitro* para a 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 como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DII; mais especificamente doença de Crohn ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7), em pacientes com dor abdominal crônica.

Somente para uso laboratorial.

Europa: Para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antígeno da calprotectina mediante um imunoenensaio tipo sanduiche.

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

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

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

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

Tabela 1

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

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

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

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

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

Kits de dispositivos de extração	Quantidade	Código
Dispositivo CALEX® Cap	Pacotes de 50, 200 ou 500 tubos disponíveis, cada um preenchido com 5 mL de tampão de extração. Pronto para utilização	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 incluindo tubo, cone e ponta dosadora, cada um preenchido com 1,3 mL de tampão de extração. Pronto para utilização	B-CAL-SO50

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- 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 (opcional)
- Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Os controlos deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infeções e devem ser manipulados de acordo com as Boas Práticas do Laboratório (BPL), usando as precauções apropriadas.
- Amostras dos pacientes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL).
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

Precauções técnicas

Componentes do kit

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

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O Quantum Blue® Reader tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL (CAL_0 o CAL_720), antes do início do teste (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão branco RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de pacientes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados errôneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente a 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.

COLETA, ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS, ESTABILIDADE

Para o procedimento de extração, menos de 1 g da amostra nativa de fezes será necessário. Colete as amostras de fezes em tubos comuns.

Importante: A amostra deve ser coletada sem nenhum aditivo químico ou biológico.

Transporte das amostras

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório para processamento até 3 dias depois da coleta. Elas devem ser transportadas à temperatura ambiente ou refrigeradas.

Armazenamento das amostras

As amostras de fezes devem ser armazenadas a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C e extraídas até 3 dias depois de recebidas no laboratório. Não guarde as amostras a temperaturas elevadas.

Estabilidade dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o CALEX® Cap permanecem estáveis à temperatura ambiente (23 °C) por 7 dias e, na faixa de temperatura de 2-8 °C, por até 15 dias. Para armazenar por períodos de tempo mais longos, congele os extratos a -20 °C. Os extratos

congelados se mantêm estáveis por um período de até 23 meses.

Os extratos do CALEX® Cap podem ser armazenados e congelados diretamente dentro do dispositivo CALEX® Cap. Os extratos podem ser submetidos a até quatro ciclos de congelamento-descongelamento. Antes da medição, deixe os extratos congelados atingirem o equilíbrio à temperatura ambiente. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo procedimento de ensaio.

A calprotectina nos extratos obtida pelo método de pesagem manual, com o Smart-Prep ou o ScheBo® Quick-Prep™ da BÜHLMANN, permanece estável por ≤ 7 dias a 2-8 °C ou por 36 meses a -20 °C.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

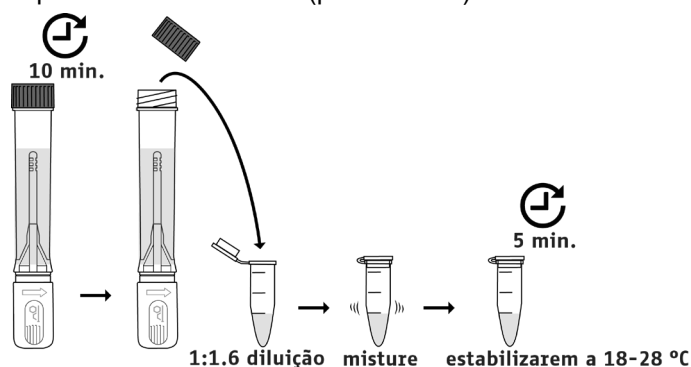
1. Extração das amostras de fezes:

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

Dispositivo CALEX® Cap: As amostras líquidas de fezes podem ser pipetadas diretamente no dispositivo CALEX® Cap. Desenrosque a tampa azul e pipete 10 µL da amostra de fezes no dispositivo. Recoloque a tampa no dispositivo CALEX® Cap e proceda com a etapa de mistura por vórtex de acordo com o procedimento de extração descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap.

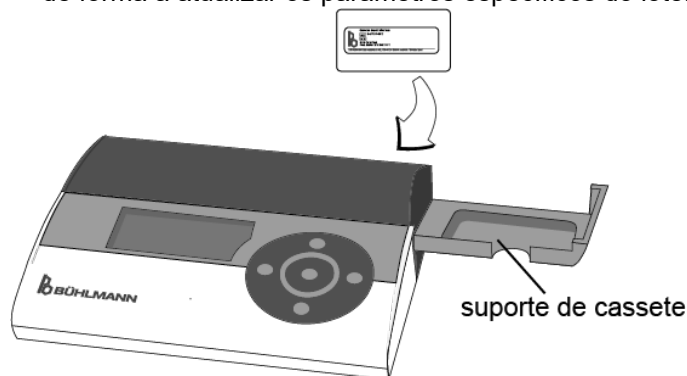
2. Processamento de amostras:

- Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:16 com tampão de extração (por exemplo: 20 µL do extrato e 300 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, antes de continuar com o procedimento do teste. Abrir a tampa azul. Diluir o sobrenadante 1:1.6 com tampão de extração (por exemplo: 200 µL do extrato e 120 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe o sobrenadante diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).



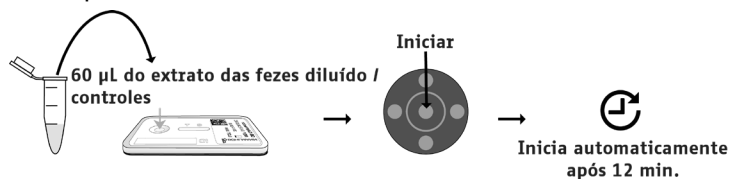
3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

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



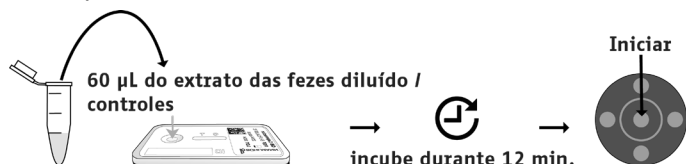
3.1. Método <CAL_720> com cronómetro interno

- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no orifício de carga da amostra de cassete do teste.
- Feche o dispositivo do cassete e inicie a medição pressionando o botão Iniciar.
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 12 minutos (720 segundos).
- Para controlos baixo / alto: Repita a etapa 3.1 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



3.2. Método <CAL_0> sem cronómetro interno

- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no orifício de carga da amostra de cassete de teste.
- Incube durante 12 minutos +/- 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Precione imediatamente o botão Iniciar no Quantum Blue® Reader para fazer a leitura do cassete.
- Para controlos baixo / alto: Repita a etapa 3.2 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



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

CONTROLE DE QUALIDADE

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

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a linha de controlo (C) tem que ser sempre visível (ver figuras 1A e 1B). É um teste de controlo/validação que não pode ser usado para interpretar a linha de teste (T). Se a linha de teste (T) não for detectável após os 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 Quantum Blue® Reader.
- Se apenas a linha de teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a linha de controlo (C) nem a linha de teste (T) forem detectáveis após 12 min de incubação (figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o Quantum Blue® Reader permite a avaliação quantitativa das linhas de teste (T) e de controlo (C), há uma validação adicional da linha de controlo (C). Se a intensidade do sinal da linha de controlo (C) for inferior à determinada para esse lote após os 12 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- O Quantum Blue® fCAL está estandardizado com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O Quantum Blue® Reader utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. Esta curva específica do lote é gerada com os valores medianos (n ≥ 10 medições cada) de pelo menos 10 pontos de calibração obtidos a partir de diferentes amostras de fezes com concentrações de calprotectina conhecidas. A gama de calibração varia de 30 a 300 µg/g.
- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras superiores de 300 µg/g podem ser re-testadas no BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (referência: LF-CHR25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais humanas.
- Os valores da calprotectina fecal servem para auxiliar no diagnóstico e facilitar a distinção entre doenças orgânicas e doenças funcionais. Os resultados devem

sempre ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais.

- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) regularmente podem apresentar níveis elevados de calprotectina fecal.
- Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 8-11).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Como distinguir doenças orgânicas de doenças gastrointestinais funcionais

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

As categorias de resultados baseiam-se nos dados de estudos clínicos realizados pela BÜHLMANN e são recomendações da BÜHLMANN. Todos os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos sintomas clínicos do paciente, seu histórico médico e outros resultados clínicos e laboratoriais.

Limiar clínico

Os dados a seguir foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN (código de pedido: EK-CAL).

Os resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DIIs (provenientes de um estudo clínico internacional) foram analisadas para se obter os valores descritos na tabela 3.

Concentração de calprotectina	Interpretação	Acompanhamento
< 80 µg/g	Normal	Nenhum
80 – 160 µg/g	Zona cinzenta/limitrofe	Retorno dentro de 4-6 semanas
> 160 µg/g	Elevada	Repetir conforme necessário

Tabela 3

Valores de calprotectina abaixo de 80 µg/g

Valores de calprotectina fecal abaixo de 80 µg/g não são indicativos de inflamação do trato gastrointestinal. Os pacientes com baixos níveis de calprotectina fecal provavelmente não requerem procedimentos invasivos para determinação da causa da inflamação.

Valores de calprotectina entre 80 e 160 µg/g

Os níveis intermediários de calprotectina (entre 80 e 160 µg/g, inclusive), também conhecidos como níveis da zona cinzenta, não são diretamente indicativos de inflamação ativa que necessite de acompanhamento imediato com testes invasivos. Todavia, a presença de inflamação não pode ser descartada. A reavaliação dos níveis de calprotectina fecal depois de 4 a 6 semanas é recomendada para determinação do status inflamatório.

Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g

Valores de calprotectina acima de 160 µg/g são indicativos de infiltrado de neutrófilos no trato gastrointestinal e, portanto, podem significar a presença de doença inflamatória ativa. Sugere-se a execução de

procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas, para se obter um diagnóstico clínico completo.

Avaliação clínica

A capacidade do BÜHLMANN fCAL® ELISA de fazer a distinção entre pacientes com DIIs e outros distúrbios não inflamatórios gastrointestinais, incluindo a SII, foi testada em um estudo clínico com um total de 337 pacientes adultos e pediátricos. Cento e trinta e cinco (135) pacientes apresentaram um diagnóstico final de DIIs (doença de Crohn, colite ulcerativa ou colite indeterminada), 130 pacientes sofriam de SII e 72 apresentavam dor abdominal e/ou diarreia ou outras condições não inflamatórias associadas ao trato gastrointestinal (GI) (consulte a tabela 4). O diagnóstico final foi corroborado por resultados endoscópicos e outros resultados clínicos.

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 83,7% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e condições não inflamatórias associadas ao trato GI, incluindo a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,923 (consulte a tabela 5).

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 85,4% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,933 (consulte a tabela 6).

A combinação ótima de ponto de corte para esses grupos de pacientes pôde ser definida por análise de ROC a 80 µg/g e 160 µg/g de calprotectina, valores ligeiramente mais restritivos que uma combinação de **um ponto de corte inferior mais sensível de 50 µg/g** com um desempenho mais baixo em especificidade, e **um ponto de corte superior de 200 µg/g**, com uma sensibilidade ligeiramente mais baixa (tabelas 7 e 8).

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Limite do Branco (LoB): <7 µg/g calprotectina

A LoB é estabelecida de acordo com o protocolo CLSI EP17-A em três séries de leituras independentes, utilizando três lotes diferentes de cassetes de teste com um total de 60 valores para o destino usando o tampão de extração como uma amostra.

Limite de Detecção (LoD): 15 µg/g calprotectina

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

Limite de Quantificação (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 µg/g calprotectina

LoQ superior: ≥300 µg/g calprotectina

O LoQ é estabelecida a partir de sete extratos de fezes com concentrações entre 14,5 e 622 µg/g. As amostras foram medidas com três diferentes lotes de cassetes em três lotes leituras de análise de 10-20 repetições independentes cada conjunto em um intervalo de 10 minutos, em seguida, os valores médios obtidos. Na figura

2, o perfil resultante é apresentada com precisão. O limite de quantificação corresponde à concentração de calprotectina em uma imprecisão inferior a 25% CV, permitindo medições quantitativas na gama de 30 (inferior LoQ) de 300 µg/g (mais elevado LoQ).

Linearidade

Foram extraídos de acordo com o procedimento para o tamborete quatro amostras com concentrações elevadas de calprotectina. Os extractos foram diluídos com tampão de extracção, e cada diluição foi testado com duas cassetes seguida de análise de acordo com o procedimento de ensaio, obtendo-se a média para cada ponto de análise. Os resultados mostraram linearidade na leitura da gama 30 a 300 µg/g de ensaio Quantum Blue® fCAL para todas as quatro amostras ($R^2 = 0.986-0.995$). Um exemplo é mostrado na figura 3. A diferença média entre as concentrações esperadas e medidos foi de 2%, o que corresponde a uma recuperação de 98%. A linearidade em 84 a 114%.

Recuperação de quantidades adicionadas: 92%

Foram adicionados quatro amostras de fezes com baixas concentrações de calprotectina diferentes quantidades de uma solução de estoque de calprotectina altamente concentrada. Cada amostra foi medida antes e após a adição de quantidades conhecidas de duas cassetes de teste diferentes de acordo com o procedimento de ensaio. Os resultados são apresentados na tabela 9. A linearidade varia entre 83 e 105%.

Precisão (repetibilidade): 15,5-22,2% CV

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

Precisão Inter-lote: 20,2-24,5% CV

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

Método comparativo: $R^2 = 0,806$; $y = 1,02x-11,1$ µg/g

Fezes extrai 101 indivíduos testados para distinguir IBD do IBS que tinham níveis anticalprotectina dentro da faixa de medição do ensaio indicado Quantum Blue® fCAL, usando um conjunto de dados obtidos a partir da análise de seis cassetes diferentes lotes foram analisados os resultados com os valores obtidos por ELISA para calprotectina BÜHLMANN fCAL® (código de EK-CAL) foram comparados. Os dados de correlação são mostrados na figura 4.

APPENDIX I

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

Test results

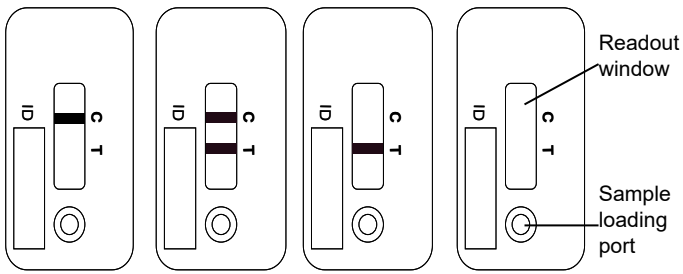


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

Figure 1

Clinical study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

Final diagnosis	Distribution of patients' results in numbers (percent) within BÜHLMANN fCAL® ELISA diagnostic ranges.			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
IBD	9 (6.7%)	12 (8.9%)	114 (84.4%)	135 (100%)
IBS	94 (72.3%)	17 (13.1%)	19 (14.6%)	130 (100%)
Other GI	48 (66.7%)	10 (13.9%)	14 (19.4%)	72 (100%)

Table 4

IBD vs. non-IBD	Clinical decision point	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensitivity (95% CI)	93.3% (87.7%, 96.9%)	84.4% (77.2%, 90.1%)
Specificity (95% CI)	70.3% (63.5%, 76.5%)	83.7% (77.8%, 88.5%)
PPV (95% CI)	67.7% (60.5%, 74.4%)	77.6% (69.9%, 84.0%)
NPV (95% CI)	94.0% (89.0%, 97.2%)	88.9% (83.6%, 93.0%)
ROC AUC (95% CI)	0.923 (0.893, 0.953)	

Table 5

IBD vs. IBS	Clinical decision point	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensitivity (95% CI)	93.3% (87.7%, 96.9%)	84.4% (77.2%, 90.1%)
Specificity (95% CI)	72.3% (63.8%, 79.8%)	85.4% (78.1%, 91.0%)
PPV (95% CI)	77.8% (70.6%, 83.9%)	85.7% (78.6%, 91.2%)
NPV (95% CI)	91.3% (84.1%, 95.9%)	84.1% (76.7%, 89.9%)
ROC AUC (95% CI)	0.933 (0.902, 0.963)	

Table 6

IBD vs. non-IBD	Clinical decision point	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensitivity (95% CI)	96.3% (91.6%, 98.8%)	80.7% (73.1%, 87.0%)
Specificity (95% CI)	59.9% (52.8%, 66.7%)	87.1% (81.7%, 91.4%)
PPV (95% CI)	61.6% (54.7%, 68.2%)	80.7% (73.1%, 87.0%)
NPV (95% CI)	96.0% (91.0%, 98.7%)	87.1% (81.7%, 91.4%)

Table 7

IBD vs. IBS	Clinical decision point	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensitivity (95% CI)	96.3% (91.6%, 98.8%)	80.7% (73.1%, 87.0%)
Specificity (95% CI)	59.2% (50.3%, 67.8%)	90.0% (83.5%, 94.6%)
PPV (95% CI)	71.0% (63.9%, 77.5%)	89.3% (82.5%, 94.2%)
NPV (95% CI)	93.9% (86.3%, 98.0%)	81.8% (74.5%, 87.8%)

Table 8

Non-IBD – IBS + other GI

CI – confidence interval

PPV – positive predictive value

NPV – negative predictive value

ROC AUC – area under receiver operating characteristic curve

Precision profile

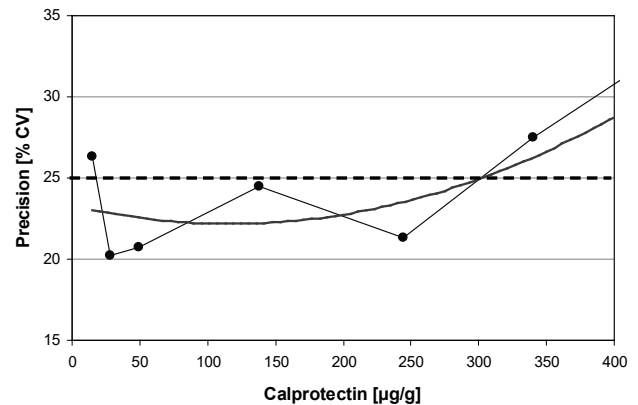


Figure 2

Linearity plot

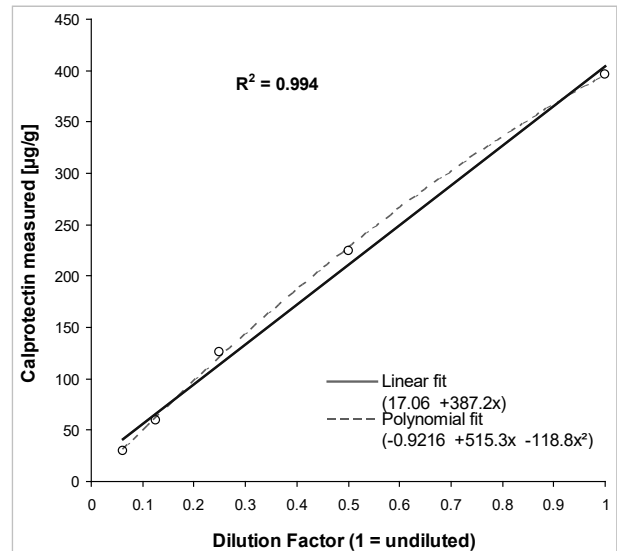


Figure 3

APPENDIX I

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

Spiking recovery

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

Table 9

Method comparison

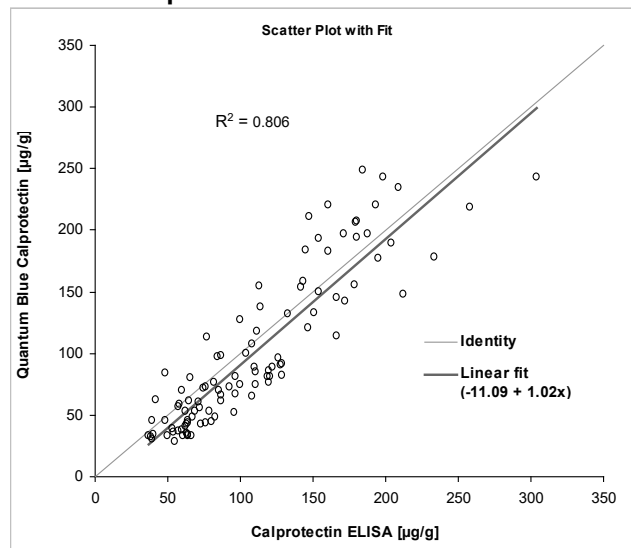


Figure 4

Precision (repeatability)

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

Table 10

APPENDIX II

REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / REFERENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000).
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E.: *Measurement of calprotectin in faeces..* Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012).
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. 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)
9. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
10. Zhu Q. et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
11. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

APPENDIX III

INCIDENT REPORTING IN EU MEMBER STATES

If any serious incident in relation to this device has occurred, please report without delay to the manufacturer and competent authority of your Member State.

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

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

RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE

En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE

Si se ha producido algún incidente grave en relación con este dispositivo, informe inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente de su Estado miembro.

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

APPENDIX IV

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use by Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Validade até
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung No. du lot No. del lotto No. de lote No. do lote
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Produto para diagnóstico <i>in vitro</i>
	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
	Consult instructions for use Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Consultar as instruções de uso

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
TC	Test cassette Test Kassette Cassette test Cassetta di rilevazione Casets de prueba Cassete do teste
BUF EX	Extraction buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción Tampão de extração
CONTROL L	Control low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle baixo
CONTROL H	Control high Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto
RCC	RFID chip card RFID Chipkarte RFID carte à puce RFID carta chip RFID tarjeta chip RFID tartão Chip

