



Quantum Blue[®] fCAL extended

Quantitative Lateral Flow Assay

LF-CALE25 25 tests

Revision date: 2018-02-15

ENGLISH

INTENDED USE

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

For professional use only*.

*Canada, Taiwan: For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cassette	25 pieces	B-LFCALUS-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-CALE-CONSET	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC	White plastic card
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC720	Green plastic card

Table 1

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal extraction devices

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

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

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

PRECAUTIONS

Safety precautions

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

Technical precautions

Kit components

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

Test procedure

- Read carefully the instructions prior to carrying out the assay. Assay performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL extended. B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720 is to use before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the RFID chip card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device.
- With BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube. With CALEX® Cap device you can store the extracts directly with the device. For re-use / re-measurement of the extracts see step 2 under the chapter assay procedure.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

Stool specimens should be collected into plain tubes.

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

Specimen transport

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

Specimen storage

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

Extract storage

Calprotectin in extracts obtained with the BÜHLMANN CALEX® Cap is stable at room temperature for three days, at 2-8 °C for six days and at -20 °C for 18 months.

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

ASSAY PROCEDURE

The assay procedure consists of three steps:

1. Extraction of stool samples

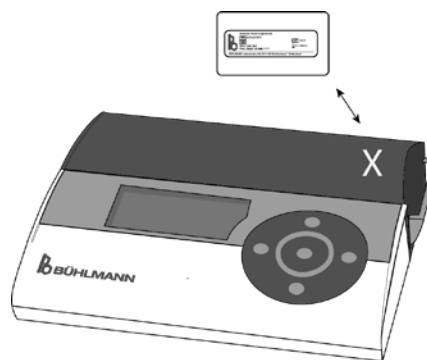
The extraction is described in the instruction for use delivered with the respective extraction devices.

2. Sample processing

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

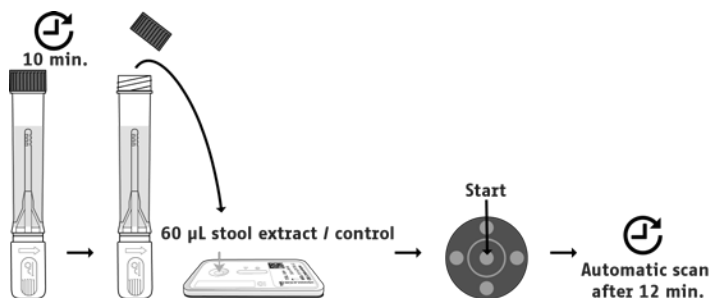
3. Lateral flow assay procedure and readout

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



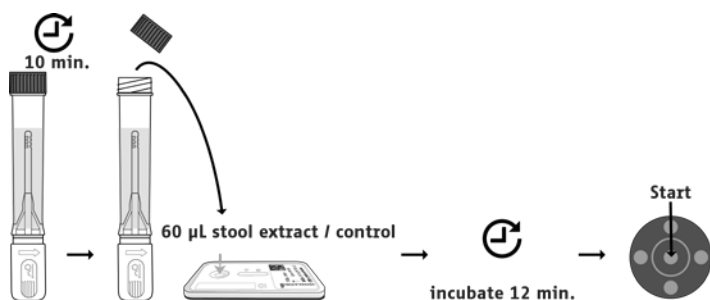
3.1. Method <B-CALE-RCC720> with internal timer

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



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

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



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

QUALITY CONTROL

- If the performance 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 of the instrument has to be valid.

STANDARDIZATION

- The Quantum Blue® fCAL extended is standardized with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL).
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the calprotectin concentration. The assay range is between 30 and 1000 µg/g.
- To receive quantitative results for calprotectin concentration between 850-1800 µg/g, high samples reading above 850 µg/g can be re-tested with the BÜHLMANN Quantum Blue® high range test (order code: LF-CHR25).

VALIDATION OF RESULTS

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

LIMITATIONS

- Reagents delivered with the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values are intended as an aid to diagnosis in distinguishing organic disease from functional disease and as an aid to IBD monitoring. Results should always be interpreted in combination with other clinical and laboratory findings.
- For IBD disease monitoring, multiple fecal calprotectin measurements performed at up to 4 weeks intervals have been suggested to have best diagnostic accuracy in predicting clinical relapse in patients (ref. 21-22).
- In rare cases, when calprotectin levels are extremely high (above 4000 µg/g, ie. in acute UC), the test system may be prone to a high dose hook effect, that can result in values below the expected 850 µg/g upper limit of the linear range. It is advised to give particular attention to results above 300 µg/g when accompanied by strong symptoms, which could indicate acute inflammation. In this case retesting of a patient's stool sample by a laboratory in timely manner is recommended for confirmation.
- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevated fecal calprotectin levels.

INTERPRETATION OF RESULTS

DISTINGUISHING ORGANIC DISEASE FROM FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISEASE

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

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

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

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Values below 50 µg/g:

Calprotectin values below 50 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 (ref. 4).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:

Calprotectin values between 50 and 200 µg/g can represent mild organic disease such as inflammation caused by NSAIDs, mild diverticulitis and IBD in remission phase. The low inflammatory response shown within this range may suggest repeating the measurement and performing further investigations.

Elevated values above 200 µg/g:

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

The cut-off level suggested for adults (50 µg/g) can be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref. 8-9).

INTERPRETATION OF RESULTS

IBD MONITORING

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

Correlation of calprotectin levels and the inflammatory status of patient's intestinal mucosa, according to endoscopic evaluations, were determined in three independent studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 4). The diagnostic value of calprotectin in predicting clinical remission and relapse, according to patient's symptoms, clinical activity indices, unplanned need for therapy escalation, hospitalization or emergency was determined in three studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 5).

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

Values below 100 µg/g:

Fecal calprotectin levels below 100 µg/g can reliably indicate patients, with low risk of clinical relapse, in endoscopic remission for whom invasive endoscopic procedures can be avoided (ref. 10-20).

Values between 100-300 µg/g:

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

Values above 300 µg/g:

Fecal calprotectin levels above 300 µg/g should be repeated and, if raised levels are confirmed, prompt further investigative procedures (ref. 10-20).

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

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

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Method comparison

Bias at clinical decision points:

50 µg/g: 10.6 % (95 % CI: -2.1-36 %)

200 µg/g: -2.2 % (95 % CI: -4.9-4.7 %)

100 µg/g: 2.1 % (95 % CI: -2.7-14 %)

300 µg/g: -3.6 % (95 % CI: -7.0-2.3 %)

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. 186 extracted clinical stool samples were measured according to the instruction for use with the Quantum Blue® fCAL extended test and with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. Measurements were performed over three days using three Quantum Blue® fCAL extended test cassette lots (figure 2).

Recovery: 102 %-121 %

Six stool specimen extracts were spiked with 150 µg/g calprotectin in calibrator material of human serum origin. The baseline extract was spiked with the corresponding amount of extraction buffer. Baseline and spiked samples were measured in eight replicates. One test cassette lot was used. The results are summarized in table 6.

Repeatability: 15.3-19.1 % CV

Within-laboratory precision: 18.0-23.0 % CV

Repeatability and within-laboratory precision were determined according to CLSI guideline EP05-A2. Four extracted stool samples, including extracts with calprotectin levels close to clinical decision points, were measured over ten days, in two independent runs each day, with two replicates per run. A single reagent lot was used (table 7).

Inter-lot precision: 16.5-20.6 % CV

Inter-lot precision was determined according to CLSI guideline EP05-A2. Four extracted stool samples, including extracts with calprotectin levels close to clinical decision points, were measured using three different reagent lots. The measurements were performed over five days, in a single run each day, with two replicates per run (table 8).

Limit of Blank (LoB): 6.7 µg/g calprotectin.

The LoB was established according to CLSI guideline EP17-A using extraction buffer to obtain 60 blank values. The study was performed with two different test cassette lots.

Limit of Detection (LoD): 18 µg/g calprotectin.

The LoD was established according to CLSI guideline EP17-A. Two extracted stool samples with calprotectin concentrations of 58 and 62 µg/g were diluted in extraction buffer to obtain a total of six samples with concentrations ranging from 1 x LoB (6.3 µg/g) to 4 x LoB (25.1 µg/g). The samples were measured in ten replicates to obtain 60 values. The study was performed with two different test cassette lots.

Limit of Quantification (LoQ):

Lower LoQ: ≤30 (28.2) µg/g calprotectin.

Upper LoQ: ≥1000 (1002) µg/g calprotectin.

The LoQ was established according to CLSI guideline EP17-A. To determine the lower LoQ, four extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 19.1 to 37.3 µg/g were measured in ten replicates to produce 40 values (table 9). To determine the upper LoQ, four extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 628 to 1001.7 µg/g were measured in ten replicates to produce 40 values (table 10). The study was performed with two different test cassette lots. Reference calprotectin values of extracted stool samples were determined with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. The relative total error was calculated using the RMS model from estimates of precision and bias to the reference values, for each sample. The LoQ was defined as the lowest and highest sample concentration, for the lower LoQ and upper LoQ, respectively, which met the acceptance criterion of 30 % relative total error.

Linearity: 30-850 µg/g

The linear range of the Quantum Blue® fCAL extended assay was determined according to CLSI guideline EP06-A. Two extracted stool samples with low and high calprotectin concentrations were blended to obtain a total of 14 concentration levels covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in ten replicates on two test cassette lots. Mean calprotectin concentration values of each blend were plotted against the dilution factor used to obtain the blend. Linear as well as second and third order polynomial fitting was applied. Where coefficients of the second and third order polynomial fits were determined to be significant, the linear range was defined as the interval of calprotectin concentration in which deviation from the linear fit did not exceed 20 % relative concentration value or 20 µg/g (figure 3).

High dose hook effect

No high dose hook effect was observed for calprotectin concentrations up to 1500 µg/g. Decrease in mean signal below the 850 µg/g upper linear range limit was estimated for calprotectin concentrations above 4000 µg/g. No value below the highest clinical decision point of 300 µg/g was observed for any of the single replicate results for all high samples tested. Seven to eight extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 1361 µg/g to 13'817 µg/g were measured in five replicates on three different test cassette lots.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended ist ein *in vitro* Diagnosetest, für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben und ist zur Unterstützung der Beurteilung einer Entzündung der Darmschleimhaut vorgesehen. Die Testergebnisse können zur Unterstützung dienen bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen, entzündlichen Erkrankung des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen; z.B. Morbus Crohn; oder Colitis ulcerosa) von einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (Ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (Ref. 8-9). Die Testergebnisse können auch zur Unterstützung bei der Überwachung entzündlicher Darmerkrankungen (Ref. 10-20) verwendet werden.

Nur zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal geeignet.*

*Canada, Taiwan: Nur für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

Das Testprinzip beruht auf der selektiven Messung von Calprotectin mittels Sandwich Immunoassay. Ein monoklonaler Fangantikörper (mAk), der hoch spezifisch für Calprotectin ist, wird auf eine Testmembran gebunden. Ein zweiter monoklonaler Nachweisantikörper, welcher mit 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 und der Kontrollbande wird durch den Quantum Blue® Reader quantifiziert.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Test Kassette	25 Stück	B-LFCALUS-TC	Vakuumdicht In einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche, 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen Tief* / Hoch*	2 Fläschchen, 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC	Weisse Plastikkarte
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC720	Grüne 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 werden zur Stuhlextraktion benötigt, aber nicht mitgeliefert und müssen zusätzlich zum Kit bestellt werden.

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

Tabelle 2

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Die Kontrollen enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss „guter Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Alle Patientenproben sollten gemäß „guter Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung auftreten.
- Unbenutzte Lösungen sollten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kitkomponenten

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

Testablauf

- Lesen Sie die Bedienungsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von der beschriebenen Arbeitsanleitung abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Quantum Blue® fCAL extended Test: B-CALE-RCC bzw. B-CALE-RCC720 muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemäße Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen enthaltene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung für 5 Min. bei 3000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden. Mit CALEX® Cap Device können die Extrakte direkt im Device gelagert werden. Zur Wiederverwendung / erneuten Messung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Arbeitsanleitung.

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Wird ein Extraktionsröhrchen für die Extraktion verwendet, wird weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden.

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

Transport der Proben

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

Lagerung der Proben

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

Lagerung des Extraktes

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

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

ARBEITSANLEITUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in drei Schritten:

1. Extraktion der Stuhlproben:

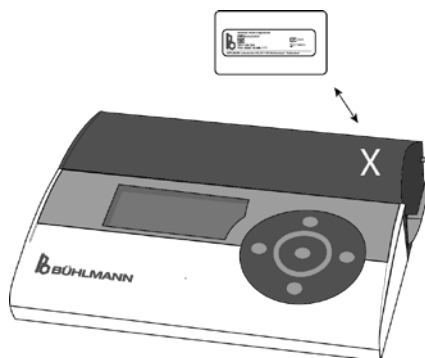
Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchens beschrieben.

2. Verarbeitung des Extraktes:

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

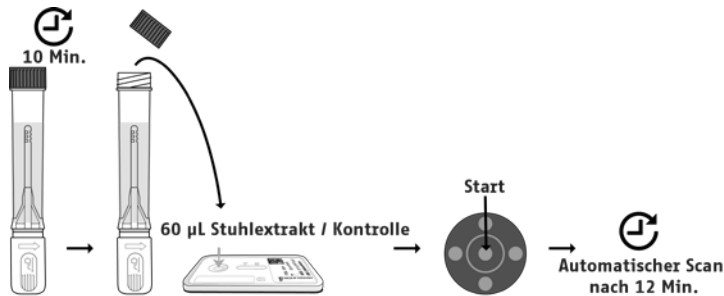
3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung

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



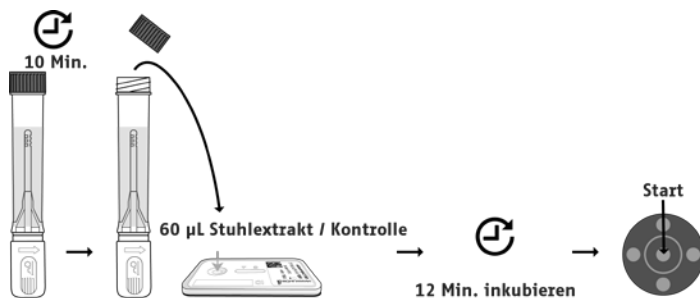
3.1 Methode <B-CALE-RCC720> mit internem Zeitmesser

- Verwenden Sie die grüne Chipkarte.
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® Readers laden.
- 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probenautragsstelle der Testkassette aufbringen.
- Den Kassettenhalter schliessen und den Startknopf drücken.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 12 Minuten (720 Sek.).
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



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

- Verwenden Sie die weisse Chipkarte.
- 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probenautragsstelle der Kassette aufbringen.
- Die Testkassette für 12 +/- 1 Minuten inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® laden
- Lesevorgang durch sofortiges Drücken auf den Startknopf starten.
- Für die Kontrollen Tief / Hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



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

QUALITÄTSKONTROLLE

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

STANDARDISIERUNG

- Der Quantum Blue® fCAL extended 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-spezifische Standardkurve. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 1000 µg/g.
- Um quantitative Ergebnisse für die Calprotectinkonzentrationen zwischen 850-1800 µg/g zu erhalten, können hohe Proben, die über 850 µg/g anzeigen, mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® high range Test (Bestellcode: LF-CHR25) erneut getestet werden.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Abbildungen 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 12 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Abbildung 1A), bedeutet dies, dass 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 nach 12 Minuten nicht nachweisbar sind (Abbildung 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation von 12 Minuten einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Quantum Blue® fCAL extended 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 und zur IBD-Überwachung vorgesehen. Die Interpretation der Resultate sollte stets in Kombination mit anderen klinischen Ergebnissen und Laborergebnissen erfolgen.
- Um bei der IBD-Überwachung die beste diagnostische Genauigkeit zu erzielen, einen klinischen Rückfall vorherzusehen, wurde empfohlen mehrere Messungen des Stuhlcalprotectins in bis zu 4 Wochen Intervallen durchzuführen (Ref. 21-22).
- In seltenen Fällen, wenn die Calprotectinkonzentrationen extrem hoch sind (über 4000 µg/g, d.h. bei akuter UC), könnte das Testsystem empfindlich für einen High-Dose-Hook-Effekt sein, was Werte unterhalb der erwarteten Obergrenze des linearen Bereichs von 850 µg/g ergeben könnte. Es wird geraten besondere Aufmerksamkeit auf Resultate oberhalb von 300 µg/g zu legen, wenn sie mit starken Symptomen einhergehen, was eine akute Entzündung anzeigen könnte. In diesem Falle wird für die Bestätigung eine zeitnahe erneute Messung der Patientenstuhlprobe empfohlen.
- Patienten, die regelmäßig NSAID einnehmen, könnten erhöhte fäkale Calprotectinkonzentrationen aufweisen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

UNTERSCHIEDEN EINER ORGANISCHEN ERKRANKUNG VON EINER FUNKTIONELLEN GASTROINTESTINALEN ERKRANKUNG

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

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

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

Die ROC Analyse (AUC: 0,962) ergab einen optimalen klinischen Grenzwert von 50 µg/g für die Differenzierung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen mit einer klinischen Spezifität von 88,8 % und einer Sensitivität von 93,6 % (Tabelle 3).

Calprotectinwerte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 8).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Werte unter 50 µg/g:

Calprotectinwerte unter 50 µg/g schliessen eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes weitgehend aus. Patienten mit niedrigen Calprotectinkonzentrationen benötigen vermutlich keine invasiven Untersuchungen, um die Entzündungsursache zu bestimmen (Ref. 4).

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 µg/g:

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

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectinwerte oberhalb von 200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung mit Entzündung des gastrointestinalen Traktes hin. Es werden entsprechende weitere Untersuchungen durch Spezialisten empfohlen.

Der für Erwachsene empfohlene Cut-off Wert von 50 µg/g kann auch für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden, unabhängig von deren Geschlecht (Ref. 8-9).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

IBD-ÜBERWACHUNG

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

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

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

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

Werte unterhalb von 100 µg/g:

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

Werte zwischen 100-300 µg/g:

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

Werte oberhalb von 300 µg/g:

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

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

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

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

LEISTUNGSMERKMALE

Methodenvergleich

Bias an den klinischen Entscheidungspunkten:

50 µg/g: 10,6 % (95 % CI: -2,1-36 %)

200 µg/g: -2,2 % (95 % CI: -4,9-4,7 %)

100 µg/g: 2,1 % (95 % CI: -2,7-14 %)

300 µg/g: -3,6 % (95 % CI: -7,0-2,3 %)

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. 186 extrahierte klinische Stuhlproben wurden entsprechend der Gebrauchsanweisung mit dem Quantum Blue® fCAL extended und dem BÜHMANN fCAL® ELISA Test gemessen. Die Messungen wurden an drei Tagen mit drei Testkassetten-Lots für den Quantum Blue® fCAL extended Test durchgeführt (Abbildung 2).

Recovery: 102 %-121 %

Sechs Stuhlprobenextrakte wurden mit 150 µg/g Calprotectin in Kalibratormaterial aus humanem Serum aufgestockt. Das ursprüngliche Extrakt wurde mit der entsprechenden Menge an Extraktionspuffer aufgestockt. Ursprüngliche und aufgestockte Proben wurden in acht Replikaten gemessen. Es wurde ein Testkassetten-Lot verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Wiederholbarkeit: 15,3-19,1 % CV

Präzision innerhalb des Labors (within-laboratory precision): 18,0-23,0 % CV

Die Wiederholpräzision und Präzision innerhalb des Labors wurden nach der CLSI-Richtlinie EP05-A2 durchgeführt. Vier extrahierte Stuhlproben, einschliesslich Extrakten mit Calprotectinwerten nahe an klinischen Entscheidungspunkten, wurden über 10 Tage in zwei unabhängigen Testläufen täglich mit zwei Replikaten pro Messung gemessen. Dabei wurde ein einzelnes Reagenzienlot verwendet (Tabelle 7).

Inter-Lot-Präzision: 16,5-20,6 % CV

Die Inter-Lot-Präzision wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP05-A2 durchgeführt. Vier extrahierte Stuhlproben, einschliesslich Extrakten mit Calprotectinkonzentrationen nahe an klinischen Entscheidungspunkten, wurden mit drei unterschiedlichen Reagenzienlots gemessen. Die Messungen wurden über fünf Tage in einem Testlauf täglich mit zwei Replikaten pro Messung durchgeführt (Tabelle 8).

Limit of Blank (LoB): 6,7 µg/g Calprotectin.

Der LoB-Wert wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A mit Extraktionspuffer bestimmt um 60 Blankwerte zu erhalten. Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt.

Limit of Detection (LoD): 18 µg/g Calprotectin.

Der LoD-Wert wurden gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt. Zwei extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen von 58 und 62 µg/g wurden in Extraktionspuffer verdünnt, um insgesamt sechs Proben mit Konzentrationen zwischen 1 x LoB (6,3 µg/g) und 4 x LoB (25,1 µg/g) zu erhalten. Die Proben wurden in zehn Replikaten gemessen um 60 Werte zu erhalten. Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt.

Limit of Quantification (LoQ)

Unterer LoQ: ≤30 (28,2) µg/g Calprotectin.

Oberer LoQ: ≥1000 (1002) µg/g Calprotectin.

Der LoQ-Wert wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt. Um den unteren LoQ-Wert zu bestimmen, wurden vier extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 19,1 und 37,3 µg/g in zehn Replikaten gemessen um 40 Werte zu erhalten (Tabelle 9). Um den oberen LoQ-Wert zu bestimmen, wurden fünf extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 628 und 1001,7 µg/g in zehn Replikaten gemessen um 40 Werte zu erhalten (Tabelle 10). Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt. Referenzwerte für Calprotectin für die extrahierten Stuhlproben wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA bestimmt. Unter Verwendung des RMS-Modells, das aus den Präzisions- und Abweichungsschätzungen für jede Probe hervorging, wurde der relative Gesamtfehler berechnet. Der LoQ wurde als die niedrigste und höchste Probenkonzentration definiert, für den unteren und oberen LoQ-Wert, der für das Akzeptanzkriterium von 30 % relativen Gesamtfehlers erhalten wurde.

Linearität: 30-850 µg/g

Der lineare Bereich des Quantum Blue® fCAL extended Tests wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP06-A durchgeführt. Um insgesamt 14 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und höher sind, wurden zwei extrahierte Stuhlproben, mit niedriger und hoher Calprotectinkonzentration, gemischt. Die Mischungen wurden mit jeweils zehn Replikaten auf zwei Testkassetten-Lots gemessen. Gemittelte Werte der Calprotectinkonzentrationen wurden für jede Mischung gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen, der zur Herstellung der Mischungen verwendet wurde. Es wurde sowohl eine lineare Anpassung als auch eine polynomiale Anpassung zweiter und dritter Ordnung angewendet. Wenn Koeffizienten der polynomialen Anpassung eines Polynoms der zweiten und dritten Ordnung als signifikant bestimmt wurden, wurde der lineare Bereich als das Intervall der Calprotectinkonzentration bestimmt, in dem eine Abweichung von der linearen Anpassung, 20 % des relativen Konzentrationswerts bzw. 20 µg/g nicht überschreitet (Abbildung 3).

High-Dose-Hook Effekt

Bei Calprotectinkonzentrationen bis zu 1500 µg/g wurde kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet. Eine Abnahme des gemittelten Signals unter die obere lineare Bereichslimite von 850 µg/g wurde für Calprotectinkonzentrationen über 4000 µg/g abgeschätzt.

Es wurde für keines der einzelnen Replikatmessungen ein Wert unterhalb des höchsten klinischen Entscheidungspunktes von 300 µg/g beobachtet. Sieben bis acht extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 1361 µg/g und 13'817 µg/g wurden in fünf Replikaten auf drei Testkassetten-Lots gemessen.

UTILISATION PRÉVUE

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

Uniquement pour utilisation professionnelle*.

*Canada, Taiwan : Utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

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

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cassette test	25 pièces	B-LFCALUS-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon d'extraction	1 flacon 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Contrôles Bas* / Élevé*	2 flacons, 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Prêts à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC	Carte en plastique blanche
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC720	Carte en plastique verte

Tableau 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.

Tubes d'extraction	Quantité	Code
CALEX® Cap	50, 200 ou 500 dispositifs pré-remplis avec 5 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubes, comprenant chacun spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes comprenant chacun cône & embout du doseur, pré-remplis avec 1.3 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CAL-SO50

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

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

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 et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- Réactifs : Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau pour éviter tout risque d'irritation.

- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

Précautions techniques

Composants du kit

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

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le Quantum Blue® fCAL extended. B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720 à utiliser avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Il est important de centrifuger les extraits avec Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ avant de les conserver, 5 min à 3000 x g. Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation. Avec les tubes CALEX® Cap, les extraits peuvent être stockés directement dans le dispositif d'extraction. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l'étape 2 dans le chapitre Procédure de dosage.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure nécessite moins de 1 g de selle native par extraction en utilisant un dispositif d'extraction.

Le prélèvement de selles se fait dans des tubes ordinaires.

Important : Les échantillons doivent être prélevés sans additifs, ni de nature chimique ni de nature biologique, dans le dispositif de prélèvement.

Transport des échantillons

Les échantillons doivent être reçus par le laboratoire dans les 3 jours suivant le prélèvement. Leur transport peut se faire à température ambiante (23 °C).

Conservation des échantillons

À réception, les échantillons de selles doivent être stockés à 2-8 °C et soumis à une extraction dans les 3 jours.

Conservation des extraits

La calprotectine dans les extraits obtenus au moyen du dispositif BÜHLMANN CALEX® Cap est stable à température ambiante pendant 3 jours, à 2-8 °C pendant 6 jours et à -20 °C pendant 18 mois.

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 6 jours et à -20 °C pendant 18 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.

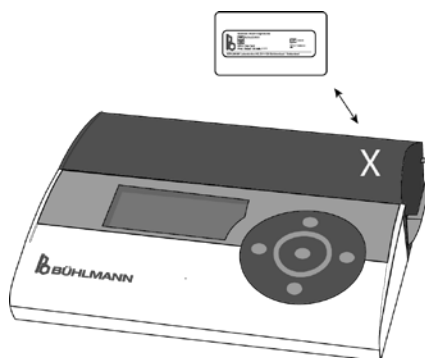
2. Préparation des extraits :

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

3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat

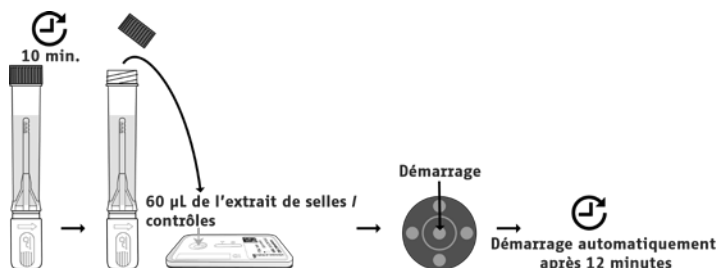
Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective < B-CALE-RCC > et < B-CALE-RCC720 >. Sélectionner l'une des cartes à puce RFID avant de procéder au test.

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



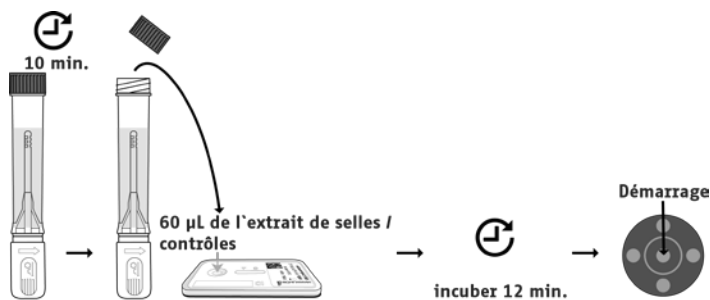
3.1. Méthode < B-CALE-RCC720 > avec minuteur interne

- Utilisez la carte en plastique verte.
- Déposer la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Ajouter 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Fermer le tiroir et lancer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 12 minutes (720 s).
- Pour les Contrôles Bas / Élevé : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.



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

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



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

CONTROLE DE QUALITE

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

STANDARDISATION

- Le dosage de Quantum Blue® fCAL extended est calibré avec le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. La gamme de mesure se situe entre 30 et 1000 µg/g.
- Pour obtenir des résultats quantitatifs de concentration en calprotectine entre 850 et 1800 µg/g, les échantillons mesurés supérieurs à élevés dépassant 850 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le coffret test de haute gamme BÜHLMANN Quantum Blue® high range (code de commande: LF-CHR25).

VALIDATION DES RESULTATS

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

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse Quantum Blue® fCAL extended sont uniquement destinés à la détermination des taux de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les dosages de la calprotectine fécale visent à contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer une maladie organique d'une maladie fonctionnelle et, d'autre part, au suivi d'une MICI. Les résultats devraient toujours être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire.
- Pour le suivi d'une MICI, il a été suggéré que de multiples dosages de la calprotectine fécale, effectués à des intervalles allant jusqu'à 4 semaines, permettent une meilleure exactitude diagnostique pour anticiper une rechute clinique chez les patients (réf. 21-22).
- Dans de rares cas, lorsque les taux de calprotectine sont extrêmement élevés (supérieurs à 4 000 µg/g, à savoir dans la RCH aiguë), le système de test peut être sujet à un effet crochet à haute concentration. Cet effet peut se traduire par des valeurs en dessous de la limite supérieure attendue, 850 µg/g, de la plage de linéarité. Il est conseillé d'accorder une attention particulière aux résultats dépassant 300 µg/g lorsqu'ils s'accompagnent de symptômes marqués, susceptibles de traduire un état inflammatoire aigu. Dans ce cas, il est recommandé, à titre de confirmation, de faire réaliser rapidement un nouveau dosage de l'échantillon de selles du patient par un laboratoire.
- Les patients qui prennent des AINS de façon régulière peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés.

INTERPRETATION DES RESULTATS

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

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

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

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

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

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

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

Valeurs inférieures à 50 µg/g :

Les valeurs de calprotectine inférieures à 50 µg/g ne sont pas indicatives d'une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les patients présentant de faibles taux de calprotectine n'ont vraisemblablement pas besoin de procédures invasives pour la détermination de l'origine inflammatoire (réf. 4).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g :

Les valeurs de calprotectine obtenues entre 50 et 200 µg/g peuvent représenter une maladie organique telle qu'une inflammation causée par les AINS, une diverticulite non sévère ou un syndrome de l'intestin irritable en phase de rémission. La faible réponse inflammatoire observée dans cette gamme de concentration suggère de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200µg/g :

Les valeurs de calprotectine dépassant 200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Des investigations supplémentaires appropriées par des spécialistes sont souhaitables.

La valeur seuil proposée pour les adultes (50 µg/g) peut également être utilisée comme référence chez les enfants âgés de 4 à 17 ans, quel que soit le sexe (réf. 8-9).

INTERPRETATION DES RESULTATS

SUIVI D'UNE MICI

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

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

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

Valeurs inférieures à 100 µg/g :

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

Valeurs entre 100 et 300 µg/g :

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

Valeurs supérieures à 300 µg/g :

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

Les catégories de résultats ci-dessus sont des recommandations. Il est conseillé aux praticiens médicaux d'établir des seuils individuels propres au patient à partir de la détermination, lors d'une période de rémission de la maladie, de sa propre concentration de base en calprotectine. Un résultat faux-négatif, à savoir une valeur de calprotectine dans la catégorie moins de 100 µg/g alors qu'il devrait dépasser 300 µg/g, dans le cas d'un patient montrant une inflammation endoscopique, bien que cela soit peu probable, risque de retarder des décisions cliniques et un traitement appropriés du patient. Par conséquent, il importe que le patient reste sous la surveillance d'un médecin et l'informe de tout symptôme clinique.

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

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Comparaison des méthodes

Biais aux points de décision clinique :

50 µg/g : 10,6 % (IC à 95 % : -2,1-36 %)

200 µg/g : -2,2 % (IC à 95 % : -4,9-4,7 %)

100 µg/g : 2,1 % (IC à 95 % : -2,7-14 %)

300 µg/g : -3,6 % (IC à 95 % : -7,0-2,3 %)

L'étude de comparaison des méthodes a été réalisée conformément à la ligne directrice EP09-A3 du CLSI. 186 échantillons cliniques d'extraits de selles ont été mesurés au moyen des tests BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended et BÜHLMANN fCAL® ELISA, dans le respect de leurs instructions d'utilisation. Les mesures ont été effectuées sur trois jours avec trois lots de cassettes test de test Quantum Blue® fCAL extended (figure 2).

Récupération : 102 %-121 %

Six extraits d'échantillons de selles ont été artificiellement enrichis à l'aide de calprotectine provenant de matériel d'étalonnage d'origine sérique humaine, à raison de 150 µg/g. L'extrait de ligne de base a été traité à l'aide de la quantité correspondante de tampon d'extraction. Les échantillons de ligne de base et enrichis ont été chacun mesurés en huit répliquats. Un seul lot de cassette test a été employé. Le tableau 6 rassemble les résultats obtenus.

Répétabilité : CV entre 15,3 % et 19,1 %

Fidélité intra-laboratoire : CV entre 18,0 % et 23,0 %

La répétabilité et la fidélité intra-laboratoire ont été déterminées selon la ligne directrice EP05-A2 du CLSI. Quatre échantillons d'extraits de selles, y compris des extraits dont les taux de calprotectine étaient proches de points de décision clinique, ont été testés pendant 10 jours, au moyen de deux dosages indépendants quotidiens, à raison de deux répliquats par dosage. Un seul lot de réactifs a été utilisé (tableau 7).

Fidélité inter-lots : CV entre 16,5 % et 20,6 %

La fidélité inter-lots a été déterminée selon la ligne directrice EP05-A2 du CLSI. Quatre échantillons d'extraits de selles, y compris des extraits dont les taux de calprotectine étaient proches de points de décision clinique, ont été mesurés à l'aide de trois lots de réactifs différents. Les mesures ont été réalisées pendant cinq jours au moyen d'un dosage quotidien, à raison de deux répliquats par dosage (tableau 8).

Limite de blanc (LoB) : 6,7 µg/g calprotectine.

La LoB a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI à l'aide de solution tampon d'extraction, ce qui a permis de constituer 60 valeurs de blanc. L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test différents.

Limite de détection (LoD) : 18 µg/g calprotectine.

La LoD a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Deux échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations en calprotectine de 58 et 62 µg/g ont été dilués dans du tampon d'extraction de manière à obtenir un total de six échantillons dont les concentrations allaient de 1 x LoB (6,3 µg/g) à 4 x LoB (25,1 µg/g). Les échantillons ont été mesurés à raison de 10 répliquats chacun, ce qui a permis d'obtenir 60 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test différents.

Limite de quantification (LoQ) :

LoQ inférieure : ≤ 30 (28,2) µg/g calprotectine.

LoQ supérieure : ≥ 1000 (1002) µg/g calprotectine.

La LoQ a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Afin de déterminer la LoQ inférieure, quatre échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 19,1 à 37,3 µg/g ont été mesurés à raison de 10 répliquats chacun, ce qui a permis de constituer 40 valeurs (tableau 9). Afin de déterminer la LoQ supérieure, cinq échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 628 à 1001,7 µg/g ont été mesurés à raison de 10 répliquats chacun, ce qui a permis de constituer 40 valeurs (tableau 10). L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test différents. Les concentrations de référence en calprotectine d'extraits de selles ont été déterminées au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA. L'erreur relative totale a été calculée selon le modèle de la moyenne quadratique à partir d'estimations d'erreur de fidélité et de biais des mesures comparées aux valeurs de référence, pour chaque échantillon. La LoQ a été définie comme étant les plus petite et plus grande concentrations de l'échantillon, correspondant respectivement aux LoQ inférieure et LoQ supérieure, ayant satisfait au critère d'acceptation de 30 % de l'erreur relative totale.

Linéarité : 30-850 µg/g

La plage de linéarité du test Quantum Blue® fCAL extended a été déterminée selon la ligne directrice EP06-A du CLSI. Deux échantillons d'extraits de selles, présentant une concentration faible et une concentration élevée en calprotectine, ont été mélangés de manière à obtenir 14 valeurs couvrant largement la plage de mesures attendue. Les mélanges ont été testés en 10 réplicats chacun sur deux lots de cassettes test. Les concentrations moyennes en calprotectine de chaque mélange ont été représentées graphiquement en fonction du facteur de dilution utilisé pour l'obtention du mélange. Les points ont été soumis à des ajustements de courbe par régression linéaire et régression polynomiale des deuxième et troisième degrés. Lorsque les coefficients des deuxième et troisième degrés des ajustements polynomiaux ont été déterminés comme étant significatifs, la plage de linéarité a été définie comme l'intervalle de concentrations en calprotectine dans lequel la déviation par rapport à l'ajustement linéaire ne dépassait pas 20 % de la valeur de concentration relative ou 20 µg/g (figure 3).

Effet crochet à haute concentration

Aucun effet crochet à haute concentration n'est observé pour des concentrations jusqu'à 1500 µg/g. Une diminution du signal moyen en dessous de la limite supérieure de la plage linéaire, 850 µg/g, a été estimée pour les concentrations en calprotectine dépassant 4000 µg/g. Aucune valeur inférieure au point de décision clinique le plus élevé, 300 µg/g, n'a été observée pour aucun des résultats de réplicats individuels pour tous les échantillons hauts testés. Sept à huit échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 1361 µg/g à 13 817 µg/g ont été mesurés en cinq réplicats chacun sur trois lots de cassettes test différents.

USO PREVISTO

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

Solo per uso professionale*.

*Canada, Taiwan: Solo per uso nel laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

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

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Cassetta di rilevazione	25 unità	B-LFCALUS-TC	Sigillata a vuoto in busta laminata
Tampone di estrazione	1 flacone 125 mL	B-CAL-EX	Pronto per l'uso
Controlli Alto* / Basso*	2 flaconi, 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Pronto all'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC	Carta RFID bianca
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC720	Carta RFID verde

Tabella 1

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

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

REAGENTI E MATERIALI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di estrazione delle feci

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

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

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

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

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

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

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

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

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, gestiti o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il Quantum Blue® fCAL extended. Utilizzare B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720 prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID per modificare i parametri di test specifici per del lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- È importante che gli estratti con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3.000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta. Con il dispositivo CALEX® Cap è possibile conservare gli estratti direttamente con il dispositivo. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo Procedura del Test.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per la procedura di estrazione è sufficiente un campione di feci native di meno di 1 g se si utilizzano i dispositivi di estrazione.

I campioni di materiale fecale devono essere raccolti in provette semplici.

Importante: il campione deve essere raccolto senza alcuna aggiunta di sostanze chimiche o biologiche nel dispositivo di raccolta.

Trasporto dei campioni

I campioni di feci devono raggiungere il laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. È possibile trasportare i campioni a temperatura ambiente (23 °C).

Conservazione dei campioni

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

Conservazione dell'estratto

La calprotectina contenuta negli estratti ottenuti con BÜHLMANN CALEX® Cap rimane stabile a temperatura ambiente per 3 giorni, a 2-8 °C per 6 giorni e a -20 °C per 18 mesi.

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 6 giorni o a -20 °C per 18 mesi.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

1. Estrazione dei campioni di feci:

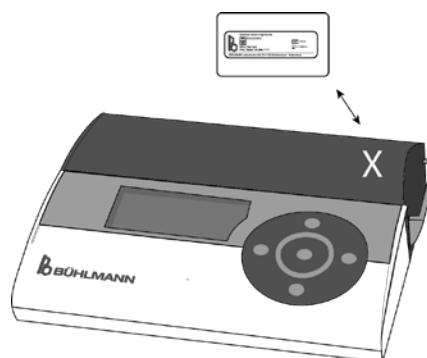
L'estrazione è descritta nelle istruzioni per l'uso fornite con i rispettivi sistemi di estrazione.

2. Trattamento del campione:

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

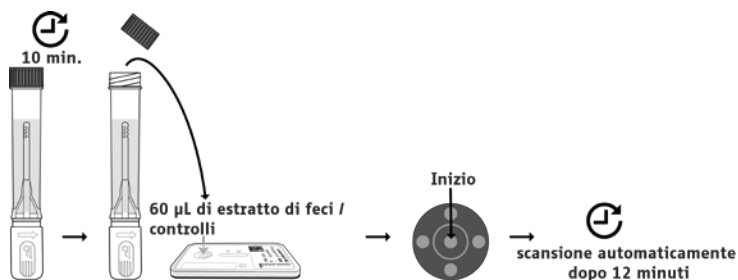
3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:

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



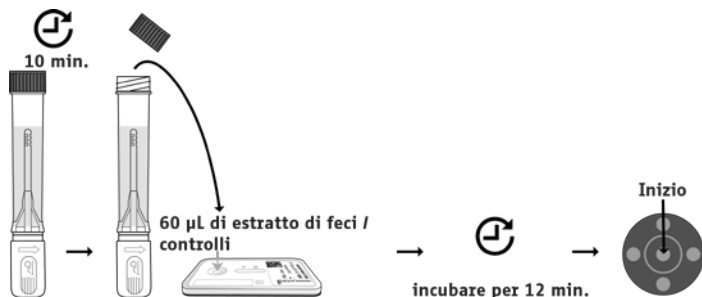
3.1 Metodo < B-CALE-RCC720 > con timer interno

- Utilizzare la carta di plastica verde.
- Caricare la cassetta nell' apposito vano a scorrere per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.
- Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 12 minuti (720 secondi).
- Per i Controlli Basso / Alto: Ripetere il punto 3.1 utilizzando 60 µL di controllo, invece del estratto di feci diluito.



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

- Utilizzare la carta di plastica bianca.
- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta
- Incubare per 12 minuti +/-1 minuto (impostare un timer manuale).
- Caricare la cassetta nell' apposito vano a scorrere per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Scansionare la cassetta con il Quantum Blue® Reader premendo immediatamente il pulsante.
- Per i Controlli Basso / Alto: Ripetere il punto 3.2 utilizzando 60 µL di controllo, invece del estratto di feci diluito.



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

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

STANDARDIZZAZIONE

- Il saggio Quantum Blue® fCAL extended è stato calibrato utilizzando come riferimento il saggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL).
- Il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione di calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 30 e 1000 µg/g.
- Per ottenere risultati quantitativi per la concentrazione di calprotectina tra 850 e 1800 µg/g, i campioni con concentrazione superiori a 850 µg/g possono essere riesaminati con il saggio BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range (codice: LF-CHR25).

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 d'incubazione (figura 1B), la concentrazione di calprotectin presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 12 minuti d'incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 12 minuti d'incubazione, il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL extended 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 e come supporto per il monitoraggio di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). I risultati devono essere sempre interpretati in abbinamento ad altri esami clinici e di laboratorio.
- Per il monitoraggio delle MICI si consiglia di eseguire più misure di calprotectina fecale ad intervalli massimi di 4 settimane, al fine di ottenere la migliore accuratezza diagnostica per la previsione di recidive cliniche nei pazienti (rif. 21-22).
- In rari casi in cui i livelli di calprotectina sono estremamente elevati (oltre 4000 µg/g, es. nel caso di colite ulcerosa acuta), il sistema di test potrebbe esibire un effetto gancio a dose elevata e misurare valori inferiori al limite superiore previsto di 850 µg/g in regime lineare. Si consiglia di prestare particolare attenzione in caso di misure superiori a 300 µg/g qualora accompagnate da forti sintomi, in quanto questo potrebbe indicare un'infezione acuta. In questo caso si consiglia di sottoporre tempestivamente il campione di feci del paziente a un nuovo test in laboratorio per conferma.
- I pazienti che assumono regolarmente farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) possono esibire livelli elevati di calprotectina fecale.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

DISTINGUERE MALATTIE ORGANICHE DA DISORDINI FUNZIONALI GASTROINTESTINALI

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

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

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

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

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

Valori inferiori a 50 µg/g:

I valori di calprotectina inferiori a 50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Per pazienti con bassi livelli di calprotectina probabilmente non necessitano di ulteriori procedure invasive per determinare la causa dell'infiammazione (rif. 4).

Valori tra 50 µg/g e 200 µg/g:

I valori di calprotectina compresi tra i 50 e i 200 µg/g possono indicare malattia di lieve entità, una infiammazione causata da FANS, una debole diverticolite e una IBD in fase di remissione. La bassa risposta infiammatoria mostrata in questo intervallo può suggerire di ripetere la misurazione e di eseguire ulteriori indagini.

Valori superiore a 200 µg/g:

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

La soglia suggerito per gli adulti (50 µg/g) può essere anche usato per i bambini con età compresa tra i 4 e i 17 anni senza differenziazione di sesso (rif. 8-9).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

MONITORAGGIO DI MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (MICI)

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

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

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

Valori inferiori a 100 µg/g:

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

Valori compresi tra 100 e 300 µg/g:

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

Valori superiori a 300 µg/g:

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

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

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

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

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Confronto metodi

Scostamento ai valori decisionali clinici:

50 µg/g: 10,6 % (95 % CI: -2,1-36 %)

200 µg/g: -2,2 % (95 % CI: -4,9-4.7 %)

100 µg/g: 2,1 % (95 % CI: -2,7-14 %)

300 µg/g: -3,6 % (95 % CI: -7,0-2.3 %)

Lo studio sul confronto dei metodi è stato condotto secondo le linee guida CLSI EP09-A3. 186 campioni clinici di estratti fecali sono stati misurati secondo le istruzioni per l'uso con il test Quantum Blue® fCAL extended e con BÜHMANN fCAL® ELISA. Le misurazioni sono state eseguite nell'arco di tre giorni usando le cassette di test Quantum Blue® fCAL extended provenienti da tre lotti (figura 2).

Recupero: 102 %-121 %

Sei campioni di estratti fecali sono stati addizionati con una concentrazione di calprotectina pari a 150 µg/g di materiale calibratore estratto da siero umano. L'estratto basale è stato addizionato con una quantità adeguata di tampone di estrazione. I campioni basale e addizionati sono stati misurati in otto ripetizioni. Per le misure sono state utilizzate cassette di test provenienti da un unico lotto. I risultati sono riepilogati nella tabella 6.

Ripetibilità: 15,3-19,1 % CV

Precisione intra-laboratorio: 18,0-23,0 % CV

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida CLSI EP05-A2. Quattro campioni di materiale fecale estratto, inclusi estratti con livelli di calprotectina prossimi a valori decisionali clinici, sono stati misurati nell'arco di dieci giorni in due sessioni indipendenti ogni giorno, con due ripetizioni per sessione. È stato utilizzato reagente proveniente da un unico lotto (tabella 7).

Precisione inter-lotto: 16,5-20,6 % CV

La precisione inter-lotto è stata determinata secondo le linee guida CLSI EP05-A2. Quattro campioni di materiale fecale estratto, inclusi estratti con livelli di calprotectina prossimi a valori decisionali clinici, sono stati misurati usando reagenti provenienti da tre diversi lotti. Le misure sono state eseguite nell'arco di cinque giorni, in un'unica sessione ogni giorno, con due ripetizioni per sessione (tabella 8).

Limite del bianco (Limit of Blank, LoB): livello di calprotectina 6.7 µg/g.

Il LoB è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A usando un tampone di estrazione per ottenere 60 valori di bianco. Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti.

Limite di rilevabilità (Limit of Detection, LoD): livello di calprotectina 18 µg/g.

Il LoD è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Due campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina pari a 58 e 62 µg/g sono stati diluiti in tampone di estrazione per ottenere un totale di sei campioni con concentrazioni nell'intervallo tra 1 x LoB (6,3 µg/g) e 4 x LoB (2,1 µg/g). I campioni sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 60 valori. Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti.

Limite di quantificabilità (Limit of Quantification, LoQ)

LoQ inferiore: livello di calprotectina ≤30 (28,2) µg/g.

LoQ superiore: livello di calprotectina ≥1000 (1002) µg/g.

Il LoQ è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Per determinare il LoQ inferiore, quattro campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina nell'intervallo tra 19,1 e 37,3 µg/g sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 40 valori (tabella 9). Per determinare il LoQ superiore, cinque campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina nell'intervallo da 628 a 1001,7 µg/g sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 40 valori (tabella 10). Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti. I valori di riferimento del livello di calprotectina nei campioni di estratti fecali sono stati determinati mediante BÜHMANN fCAL® ELISA. Per ciascun campione, l'errore relativo totale è stato calcolato usando il modello RMS da stime di precisione e lo scostamento dai valori di riferimento. Il LoQ è stato definito come il valore di concentrazione dei campioni rispettivamente minimo e massimo per LoQ inferiore e LoQ superiore, che soddisfano il criterio di accettazione di errore totale relativo del 30 %.

Linearità: 30-850 µg/g

L'intervallo di linearità del campionamento con Quantum Blue® fCAL extended è stato determinato secondo le linee guida CLSI EP06-A. Due campioni di estratti fecali con concentrazione di calprotectina bassa ed elevata sono stati miscelati per ottenere un totale di 14 livelli di concentrazione su una gamma che copriva ed eccedeva l'intervallo previsto di misura. Le miscele sono state campionate in dieci ripetizioni su cassette di test provenienti da due lotti. I valori medi di concentrazione di calprotectina per ciascuna miscela sono stati messi in grafico verso i fattori di diluizione usati per ottenere la miscela. Al grafico sono stati applicati fit lineare e polinomiale di secondo e terzo ordine. Laddove i coefficienti del fit polinomiale di secondo e terzo ordine sono stati determinati significativi, l'intervallo di linearità è stato definito come l'intervallo di concentrazioni di calprotectina in cui la deviazione dal fit lineare non è superiore a un valore di concentrazione relativo del 20 % o pari a 20 µg/g (figura 3).

Effetto gancio a dose elevata

Non è stato osservato un effetto gancio ad alte dosi per le concentrazioni di calprotectina fino a 1500 µg/g. Una riduzione del segnale medio sotto al limite superiore dell'intervallo di linearità di 850 µg/g è stata stimata per concentrazioni di calprotectina superiori a 4000 µg/g. Nessun valore inferiore al punto di decisione clinica più elevato di 300 µg/g è stato osservato per ciascuno dei risultati singoli in replicato per tutti gli alti campioni testati. Da sette a otto campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina nell'intervallo da 1361 µg/g a 13'817 µg/g sono stati misurati in cinque ripetizioni su cassette di test provenienti da tre diversi lotti.

INDICACIONES DE USO

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

Solo para uso profesional*.

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

PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Casetes de prueba	25 unidades	B-LFCALUS-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de extracción	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Controles Alto* / Bajo*	2 viales, 0,5 mL	B-CALE- CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC	Tarjeta de plástica blanca
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC720	Tarjeta de plástica verde

Tabla 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 SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

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

Dispositivos de extracción	Cantidad	Código
Dispositivos CALEX® Cap	50, 200 o 500 dispositivos, contienen 5 mL tampón de extracción, listos 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 de extracción constan de tubo, cono y punta de dosificación contienen 1,3 mL de tampón de extracción, listos para usar.	B-CAL-SO50

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Vórtex para la extracción de heces
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 µL, 100-1000 µL y 250-2500 µL
- Centrífuga
- Tubos de 5 mL desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de la dilución de los extractos
- Cronómetro (optativo)
- Lector Quantum Blue® 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 tomando las precauciones apropiadas.

- **Reactivos:** Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con agua abundante; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

Precauciones técnicas

Componentes del kit

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

Procedimiento de análisis

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El lector Quantum Blue® debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de calprotectina. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720 debe usarse antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue®).
- Utilizare la tarjeta con chip RFID para cambiar los parámetros de prueba específicos de lote.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción. Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- Con BÜHLMANN Smart Prep y ScheBo® Quick-Prep™, es importante centrifugar los extractos antes del almacenamiento. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3000 x g. Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo. Con el dispositivo CALEX® Cap puede almacenar los extractos directamente en el dispositivo. Para la reutilización / nueva medición de los extractos de ver el paso 2 en el capítulo Procedimiento del análisis.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

Las muestras de heces deben recogerse en tubos sencillos.

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

Transporte de las muestras

El laboratorio debe recibir las muestras de heces en un plazo de 3 días desde su recogida. Las muestras se pueden transportar a temperatura ambiente (23 °C).

Almacenamiento de las muestras

Las muestras de heces recibidas deben ser almacenadas a entre 2 y 8 °C y deben ser extraídas en un plazo de 3 días.

Almacenamiento de los extractos

La calprotectina de los extractos obtenidos con el dispositivo BÜHLMANN CALEX® Cap es estable a temperatura ambiente durante 3 días, a entre 2 y 8 °C durante 6 días, y a -20 °C durante 18 meses.

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 6 días o a -20 °C durante 18 meses.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

El procedimiento del análisis consiste en tres pasos:

1. Extracción de las muestras de heces:

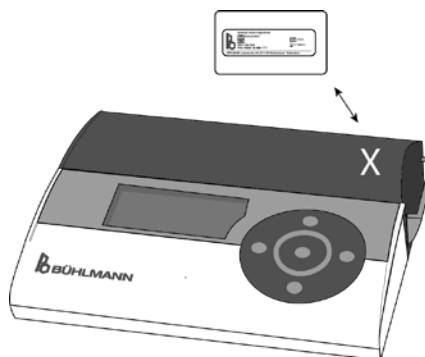
La extracción se describe en las instrucciones de uso entregadas con los respectivos dispositivos de extracción.

2. Procesamiento de las muestras:

- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Después de la extracción, deje que el extracto de materia fecal se asiente durante 10 minutos. Se diluye el sobrenadante 1:10 con tampón de extracción (por ejemplo, 50 µL de extracto y 450 µL de tampón de extracción) y se mezcla 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 el tapón blanco del dispositivo hacia abajo. Desenrosque el tapón de color azul. El sobrenadante se puede utilizar sin dilución adicional en el ensayo de flujo lateral.

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

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



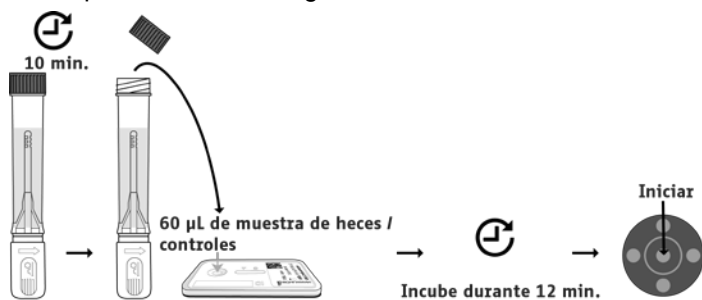
3.1. Método <B-CALE-RCC720> con cronómetro interno

- Use la tarjeta de plástico verde.
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Agregue 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El barrido se inicia automáticamente pasados 12 minutos (720 segundos).
- Para Controles Bajo / Alto: Repita el paso 3.1 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.



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

- Use la tarjeta de plástico blanca
- Agregue 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 soporte del casete de prueba del lector Quantum Blue® Reader.
- Inicie el barrido del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio inmediatamente.
- Para Controles Bajo / Alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.



Observación: Consulte el manual del 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 los parámetros específicos del lote desde la tarjeta de chip RFID para para obtener las muestras medidas.

CONTROL DE CALIDAD

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

ESTANDARIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Quantum Blue® fCAL extended está estandarizado con el BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para orden: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® de BÜHLMANN utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. El rango de ensayo es entre 30 y 1000 µg/g.
- Para recibir resultados cuantitativos para la concentración de calprotectina entre 850-1800 µg/g, las muestras de alta lectura por encima de 850 µg/g pueden volver a probarse con la prueba de BÜHLMANN Quantum Blue® high range (código de orden: LF-CHR25).

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit Quantum Blue® fCAL extended sirven únicamente para la determinación de niveles de calprotectina en muestras de heces humanas.
- Los valores de calprotectina fecal son una ayuda para facilitar el diagnóstico distinguiendo entre enfermedad orgánica y enfermedad funcional y para facilitar el control de la EII. Los resultados deben interpretarse siempre en combinación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Para el control de la EII, se ha sugerido que el uso de múltiples determinaciones de calprotectina fecal obtenidas a intervalos de hasta 4 semanas proporciona la mejor exactitud diagnóstica en la predicción de una recaída clínica de los pacientes (ref. 21-22).
- En casos raros, cuando los niveles de calprotectina son extremadamente altos (por encima de 4000 µg/g; esto es, en casos de CU aguda), el sistema de análisis puede adolecer de un efecto gancho de dosis altas, lo que puede dar lugar a valores por debajo del límite superior del rango lineal esperado de 850 µg/g. Se aconseja prestar especial atención a los resultados por encima de 300 µg/g cuando vayan acompañados por síntomas intensos, lo que podría indicar una inflamación aguda. En ese caso, se recomienda repetir oportunamente el análisis de una muestra de heces del paciente en un laboratorio para su confirmación.
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener niveles de calprotectina fecal elevados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

DISTINGUIR ENTRE ENFERMEDAD ORGÁNICA Y ENFERMEDAD FUNCIONAL GASTROINTESTINAL

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

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

Análisis de la curva ROC (AUC:0,962) resulta en un punto de corte clínico óptimo a 50 µg/g para diferenciar entre enfermedades gastrointestinales orgánicas y funcionales, con valores de sensibilidad y especificidad de 88,8 % y 93,6 % respectivamente (véase la tabla 3). Los niveles de calprotectina fecal de adultos y niños son comparables, mientras que los niveles de recién nacidos pueden aumentar significativamente (ref. 8).

Estos datos respaldan la siguiente recomendación para la interpretación de los resultados :

Valores por debajo de 50 µg/g:

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

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

Valores de calprotectina entre 50-200 µg/g pueden indicar trastorno orgánico leve, como inflamación causada por anti-inflamatorios no esteroideos, diverticulitis en grado medio y enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en fase de remisión. La presencia de una respuesta inflamatoria leve dentro de este rango, puede requerir la repetición del test e investigaciones adicionales.

Valores elevados por encima de 200 µg/g:

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

El nivel de corte sugerido para adultos (50 µg/g) se puede utilizar también para niños de entre 4 y 17 años de edad con independencia del sexo (ref. 8-9).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONTROL DE LA EII

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

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

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

Valores por debajo de 100 µg/g:

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

Valores entre 100 y 300 µg/g:

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

Valores por encima de 300 µg/g:

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

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

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

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

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Comparación de métodos

Sesgo en los puntos de decisión clínica:

50 µg/g: 10,6 % (IC 95 %: -2,1-36 %)

200 µg/g: -2,2 % (IC 95 %: -4,9-4,7 %)

100 µg/g: 2,1 % (IC 95 %: -2,7-14 %)

300 µg/g: -3,6 % (IC 95 %: -7,0-2,3 %)

El estudio de comparación de métodos se ha realizado de conformidad con la directriz CLSI EP09-A3. Se midieron 186 muestras de heces clínicas extraídas según las instrucciones de uso con el ensayo Quantum Blue® fCAL de rango ampliado y con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA. Las determinaciones se realizaron a lo largo de tres días utilizando tres lotes de casete de prueba Quantum Blue® fCAL de rango ampliado (figura 2).

Recuperación: 102 %-121 %

Se adicionaron con 150 µg/g de calprotectina en material calibrador de origen sérico humano seis extractos de muestras de heces. El extracto basal se adicionó con la cantidad correspondiente de tampón de extracción. Las muestras basales y adicionadas se midieron en ocho réplicas. Se utilizó un lote de casete de prueba. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Repetibilidad: 15,3-19,1 % CV

Precisión intralaboratorio: 18,0-23,0 % CV

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se han determinado de conformidad con la directriz CLSI EP05-A2. Se midieron cuatro muestras de heces extraídas, incluyendo extractos con niveles de calprotectina próximos a puntos de decisión clínica, a lo largo de diez días, en dos tandas independientes cada día, con dos réplicas por tanda. Se utilizó un único lote de reactivo (tabla 7).

Precisión interlote: 16,5-20,6 % CV

La precisión interlote se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP05-A2. Se midieron cuatro muestras de heces extraídas, incluyendo extractos con niveles de calprotectina próximos a puntos de decisión clínica, utilizando tres lotes de reactivo diferentes. Las determinaciones se realizaron a lo largo de cinco días, en una única tanda al día, con dos réplicas por tanda (tabla 8).

Límite para el blanco (LoB): 6,7 µg/g de calprotectina.

El LoB se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A utilizando tampón de extracción para obtener 60 valores de blanco. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba diferentes.

Límite de detección (LoD): 18 µg/g de calprotectina.

El LoD se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Se diluyeron en tampón de extracción dos muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina de 58 y 62 µg/g para obtener un total de seis muestras con concentraciones de entre una vez el LoB (6,3 µg/g) y cuatro veces el LoB (25,1 µg/g). Las muestras se midieron en diez réplicas para obtener 60 valores. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba diferentes.

Límite de cuantificación (LoQ):

LoQ inferior: ≤30 (28,2) µg/g de calprotectina.

LoQ superior: ≥1000 (1002) µg/g de calprotectina.

El LoQ se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Para determinar el LoQ inferior, se midieron cuatro muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina entre 19,1 y 37,3 µg/g en diez réplicas para obtener 40 valores (tabla 9). Para determinar el LoQ superior, se midieron cinco muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina entre 628 y 1001,7 µg/g en diez réplicas para obtener 40 valores (tabla 10). El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba diferentes. Se determinaron valores de calprotectina de referencia de las muestras de heces extraídas con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA. El error total relativo se calculó utilizando el modelo RMS a partir de cuatro estimaciones de precisión y sesgo con respecto a los valores de referencia para cada muestra. El LoQ se definió como la concentración de muestra más baja y más alta, para el LoQ inferior y el LoQ superior respectivamente, que cumplía el criterio de aceptación de un 30 % de error total relativo.

Linealidad: 30-850 µg/g

El rango lineal del ensayo Quantum Blue® fCAL de rango ampliado se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se mezclaron dos muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina baja y alta para obtener un total de 14 niveles de concentración que cubrían y excedían el rango de medición esperado. Las mezclas se ensayaron en diez réplicas con dos lotes de casete de prueba. Los valores de concentración media de calprotectina de cada mezcla se representaron gráficamente frente al factor de dilución empleado para obtener la mezcla. Se aplicaron ajustes tanto lineal como polinómico de segundo y tercer orden. Cuando los coeficientes de los ajustes polinómicos de segundo y tercer orden se determinaron como significativos, el rango lineal se definió como el intervalo de concentraciones de calprotectina en el que la desviación con respecto al ajuste lineal no excedía el 20 % del valor de concentración relativa o 20 µg/g (figura 3).

Efecto gancho de alta dosis

No se observó ningún efecto gancho de alta dosis para las concentraciones de calprotectina de hasta 1500 µg/g. Se calculó una disminución de la señal media inferior al límite de rango lineal superior de 850 µg/g para las concentraciones de calprotectina de más de 4000 µg/g. No se observó ningún valor inferior al punto de decisión clínica más alto de 300 µg/g para ninguno de los resultados de cada réplica de todas las muestras altas analizadas. Se midieron de siete a ocho muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina que variaban entre 1361 µg/g y 13'817 µg/g en cinco réplicas correspondientes a tres lotes de casetes de análisis diferentes.

PORTUGUÊS

USO PRETENDIDO

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

Para uso profissional*.

*Canada, Taiwan: Somente para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

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

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

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Observações
Cassete do Teste	25 unidades	B-LFCALUS-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de Extração	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Controles Baixo* / Alto*	2 frascos, 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1 pedaço	B-CALE-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão Chip RFID	1 pedaço	B-CALE-RCC720	Cartão de plástico verde

Tabela 1

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

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

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

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

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

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

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Os controles 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 infecções 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.
- **Reagentes:** Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, leve imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a regulamentação das entidades governamentais locais.

Precauções técnicas

Componentes do kit

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

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O leitor Quantum Blue® tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL extended. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720 deve ser utilizado antes do início do teste (ver manual do Leitor Quantum Blue®).
- Utilize o cartão RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de pacientes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados erróneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente a amostra no tubo de extração.
- É importante centrifugar os extratos com Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3000 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo. Com dispositivo Cap CALEX® pode armazenamento os extratos diretamente com o dispositivo. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo Procedimento de Ensaio.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Se os dispositivos de extração forem usados com menos de 1 g da amostra nativa de fezes será necessário para o procedimento de extração.

As amostras de fezes devem ser coletadas em tubos comuns.

Importante: A amostra deve ser coletada sem nenhuma adição química ou biológica no dispositivo de coleta.

Transporte das amostras

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório até 3 dias depois da coleta. Elas podem ser transportadas à temperatura ambiente (23 °C).

Armazenamento das amostras

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

Armazenamento dos extratos

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

A calprotectina nos extratos obtida pelo método de pesagem manual, com o Smart-Prep ou o ScheBo® Quick-Prep™ da BÜHLMANN, permanece estável por 6 dias a 2-8 °C ou por 18 meses a -20 °C.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

1. Extração das amostras de fezes:

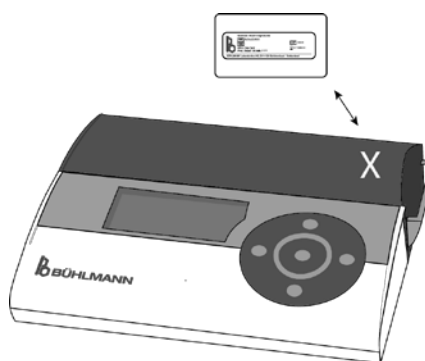
O procedimento de extração está descrito nas instruções de uso fornecidas com os tubos de extração.

2. Processamento de amostras:

- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, abrir a tampa azul. O sobrenadante pode ser utilizado sem qualquer diluição adicional com o ensaio de escoamento lateral.

3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

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



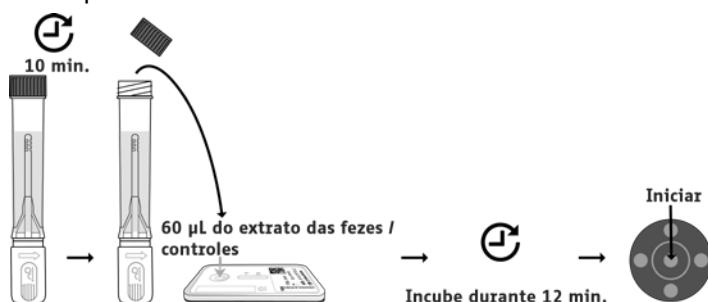
3.1. Método <B-CALE-RCC720> com cronómetro interno

- Use o cartão de plástico verde.
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do 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 no leitor e inicie a medição pressionando o botão Iniciar.
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 12 minutos (720 segundos).
- Para Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.1 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



3.2. Método <B-CALE-RCC > sem cronómetro interno

- Use o cartão de plástico branco.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no orifício de carga da amostra de cassete do 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 Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.2 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



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

CONTROLE DE QUALIDADE

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

ESTANDARDIZAÇÃO

- O Quantum Blue® fCAL extended está calibrado com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O leitor BÜHLMANN Quantum Blue® utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. A gama de calibração varia de 30 a 1000 µg/g.
- Para receber resultados quantitativos para a concentração de calprotectina entre 850-1800 µg/g, as amostras elevadas acima de 850 µg/g podem ser testadas novamente com o teste BÜHLMANN Quantum Blue® high range (código de ordem: LF-CHR25).

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a Linha de Controlo (C) tem que ser sempre visível (ver figuras 1A e 1B). É um teste de controlo/validação que não pode ser usado para interpretar a Linha de Teste (T). Se a Linha de Teste (T) não for detectável após os 12 min de incubação (figura 1A), a concentração de calprotectina presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a Linha de Teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo leitor Quantum Blue®.
- Se apenas a Linha de Teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL extended 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 de Quantum Blue® fCAL extended tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o leitor Quantum Blue® permite a avaliação quantitativa das Linhas de Teste (T) e de Controlo (C), há uma validação adicional da Linha de Controlo (C). Se a intensidade do sinal da Linha de Controlo (C) for inferior à determinada para esse lote após os 12 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL extended tem que ser repetido com outro cassete.

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL extended destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais humanas.
- Os valores da calprotectina fecal servem para auxiliar no diagnóstico e facilitar a distinção entre doenças orgânicas e doenças funcionais, e para auxiliar no monitoramento de DII (doenças inflamatórias intestinais). Os resultados devem sempre ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais.
- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam a melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 21-22).
- Em casos raros, quando os níveis de calprotectina são extremamente altos (acima de 4000 µg/g, i.e., em colite ulcerativa aguda), o sistema de teste pode tender a apresentar um efeito gancho com dose elevada, o que pode resultar em valores abaixo do limite superior de 850 µg/g esperado para a faixa linear. Aconselha-se a prestar particular atenção a resultados acima de 300 µg/g quando acompanhados de sintomas marcantes, o que pode indicar inflamação aguda. Neste caso, recomenda-se repetir oportunamente o teste com uma amostra de fezes do paciente em um laboratório, a título de confirmação.
- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) regularmente podem apresentar níveis elevados de calprotectina fecal.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

COMO DISTINGUIR DOENÇAS ORGÂNICAS DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS FUNCIONAIS

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

Os dados a seguir foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN (código de pedido: EK-CAL). Em um estudo clínico, valores de calprotectina fecal de 344 pacientes sintomáticos foram comparados a resultados endoscópicos.

Exames endoscópicos mostraram que dos 264 pacientes com doenças funcionais, 80 pacientes tinham diversas doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, úlceras, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças infecciosas) (ref. 5).

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

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

Esses dados apoiam a seguinte recomendação para interpretação de resultados :

Valores inferiores a 50 µg/g:

Valores de calprotectina abaixo de 50 µg/g não são indicativos da inflamação do trato gastrointestinal. Os pacientes com baixos níveis de calprotectina provavelmente não requerem procedimentos invasivos para determinação da causa da inflamação (ref. 4).

Valores elevados entre 50 e 200 µg/g:

Valores de calprotectina entre 50 e 200 µg/g podem significar uma doença leve orgânica como inflamação do trato gastrointestinal. A fraca resposta inflamatória nesta gama sugere a repetição da quantificação e outras investigações.

Valores elevados superiores a 200 µg/g:

Valores de calprotectina acima de 200 µg/g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação do trato gastrointestinal. Sugere-se a execução de procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas.

O nível de corte sugerido para adultos (50 µg/g) podem também ser usados por crianças de 4 a 17 anos, independente de sexo (ref. 8-9).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

MONITORAMENTO DE DII

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

A correlação entre níveis de calprotectina e o status inflamatório da mucosa intestinal do paciente, de acordo com avaliações endoscópicas, foi determinada em três estudos independentes usando testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 4).

O valor diagnóstico da calprotectina na predição da remissão clínica e da recaída, de acordo com os sintomas do paciente, os índices de atividade clínica, a necessidade não planejada de escalação terapêutica, hospitalização ou emergência foi determinado em três estudos usando testes de BÜHLMANN de calprotectina (tabela 5).

O conhecimento condensado dos valores de corte publicados e os estudos de desempenho clínico acima respaldam as seguintes categorias de resultados:

Valores abaixo de 100 µg/g:

Níveis de calprotectina fecal abaixo de 100 µg/g podem indicar confiavelmente pacientes com baixo risco de recidiva clínica que estão em remissão endoscópica e para os quais procedimentos endoscópicos invasivos devem ser evitados (ref. 10-20).

Valores entre 100 e 300 µg/g:

Níveis de calprotectina fecal entre 100 e 300 µg/g podem indicar a necessidade de um controle mais rigoroso no período seguinte, para avaliar as tendências de desenvolvimento da doença.

Valores acima de 300 µg/g:

Níveis de calprotectina fecal acima de 300 µg/g requerem a repetição do teste e, se confirmados os níveis elevados, indicam a execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 10-20).

As categorias de resultados acima são recomendações. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limites individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença.

Embora improvável, um resultado falso negativo de calprotectina abaixo de 100 µg/g para um paciente com inflamação endoscópica, onde o valor deveria ser acima 300 µg/g, pode atrasar a tomada de decisões clínicas apropriadas e o tratamento do paciente. Assim, é importante que o paciente permaneça sob os cuidados de um profissional de saúde e informe todos os sintomas clínicos.

Estudos demonstraram que níveis altos de calprotectina, acima de 300 µg/g, nem sempre indicam o desenvolvimento de uma recidiva clínica (ref. 10-20). Altos níveis de calprotectina devem ser tratados como um sinal de alerta, requerendo a repetição do teste. A confirmação desses níveis indica a necessidade de procedimentos adicionais de investigação.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Comparação de métodos

Desvio nos pontos de decisão clínica:

50 µg/g: 10,6% (ic de 95 %: -2,1-36 %)

200 µg/g: -2,2 % (ic de 95 %: -4,9-4,7 %)

100 µg/g: 2,1 % (ic de 95 %: -2,7-14 %)

300 µg/g: -3,6 % (ic de 95 %: -7,0-2,3 %)

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. 186 amostras clínicas de fezes foram medidas de acordo com as instruções do teste fCAL Quantum Blue® ampliado e com o fCAL® ELISA BÜHLMANN. As medições foram realizadas por três dias usando-se três lotes de cassetes do teste fCAL Quantum Blue® ampliado (figura 2).

Recuperação: 102-121 %

Seis extratos de amostras de fezes foram fortificados com 150 µg/g de calprotectina em material de origem de soro humano do calibrador. O extrato de referência foi fortificado com a quantidade correspondente do tampão de extração. As amostras de referência e fortificadas foram medidas em oito replicações. Um único lote de cassete de testes foi usado. Os resultados estão resumidos na tabela 6.

Repetibilidade: 15,3-19,1 % do CV

Precisão intralaboratorial: 18,0-23,0 % do CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI. Quatro amostras de fezes extraídas, incluindo extratos com níveis de calprotectina próximos dos pontos de decisão clínica, foram medidas por dez dias em duas corridas independentes por dia, com duas replicações por corrida. Um único lote de reagentes foi usado (tabela 7).

Precisão intralotes: 16,5-20,6 % do CV

A precisão intralotes foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI. Quatro amostras de fezes extraídas, incluindo extratos com níveis de calprotectina próximos dos pontos de decisão clínica, foram medidas usando-se três lotes diferentes de reagentes. As medições foram realizadas por cinco dias em uma única corrida por dia, com duas replicações por corrida (tabela 8).

Limite do branco (LoB): 6,7 µg/g de calprotectina.

O LoB foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI, empregando-se um tampão de extração para obter 60 valores de branco. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes.

Limite de detecção (LoD): 18 µg/g de calprotectina.

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Duas amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina de 58 e 62 µg/g, foram diluídas em um tampão de extração para gerar um total de seis amostras com concentrações variando entre 1 x LoB (6,3 µg/g) e 4 x LoB (25,1 µg/g). As amostras foram medidas em dez replicações para se obter 60 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes.

Limite de quantificação (LoQ):

LoQ inferior ≤30 (28,2) µg/g de calprotectina.

LoQ superior ≥1000 (1002) µg/g de calprotectina.

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Para determinar o LoQ inferior, quatro amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina variando entre 19,1 e 37,3 µg/g, foram medidas em dez replicações, para gerar 40 valores (tabela 9). Para determinar o LoQ superior, cinco amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina variando entre 628 e 1001,7 µg/g, foram medidas em dez replicações, para gerar 40 valores (tabela 10). O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. Os valores de referência de calprotectina para as amostras de fezes extraídas foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio para os valores de referência de cada amostra. O LoQ foi definido como a mais baixa e a mais alta concentração das amostras – para o LoQ inferior e superior, respectivamente – que atenderam ao critério de aceitação de 30 % do erro relativo total.

Linearidade: 30-850 µg/g

A faixa linear do teste ampliado fCAL Quantum Blue® foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras extraídas com concentrações altas e baixas de calprotectina foram misturados para se obter 14 níveis de concentração, abrangendo e ultrapassando a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em dez replicações com dois lotes de cassetes de teste. Os valores médios de concentração de calprotectina de cada mistura foram então plotados contra o fator de diluição usado para se obter a mistura. Foram aplicados ajustes lineares e polinomiais de segundo e terceiro grau. Nos casos em que os coeficientes dos ajustes polinomiais de segundo e terceiro grau foram considerados significativos, a faixa linear foi definida como o intervalo da concentração de calprotectina no qual o desvio em relação ao ajuste linear não ultrapassou 20 % em relação ao valor da concentração ou 20 µg/g (figura 3).

Efeito gancho com dose elevada

Não foi observado incidência de efeito gancho elevado para calprotectina em concentrações até 1500 µg/g. Decréscimo na linha mediana abaixo de 850 µg/g e acima do limite de alcance linear foi estimado para concentração de calprotectina acima de 4000 µg/g. Nenhum valor abaixo do maior ponto de decisão clínica de 300 µg/g foi observado para qualquer resultado repetido em todas as amostras altas testadas. Sete a oito amostras de fazes extraídas com concentração de calprotectina variando de 1361 µg/g a 13`817 µg/g foram mensuradas em cinco repetições e em 3 lotes de cassetes de testes diferentes.

APPENDIX I

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

Test results

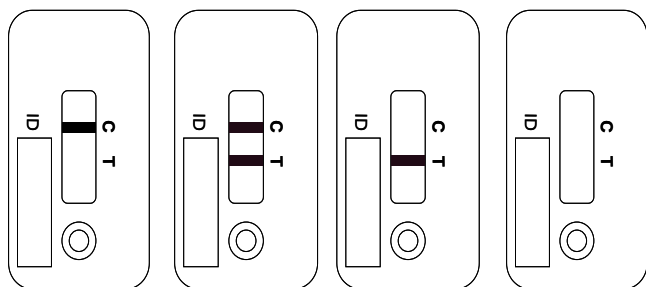


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

Figure 1

Clinical study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

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

Table 3

¹ Results were obtained with the BÜHLMANN fCAL® ELISA.

Clinical studies – IBD monitoring

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

Table 4

¹ Results for studies 1 and 2 were obtained with the BÜHLMANN lateral flow assays (Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range). Results in study 3 were obtained with the BÜHLMANN fCAL® ELISA.

² CD = Crohn's disease patients

³ UC = Ulcerative Colitis patients

Clinical studies – IBD monitoring

Calprotectin ¹ vs future clinical remission or relapse	Study 4 UK (ref. 13)	Study 5 Spain (ref. 14)	Study 6 Spain (ref. 15)
Patient number and demographics	92 (CD ²) 38 % male	30 (CD ³) adalimumab therapy Ages: 24-64 43.3 % male	33 (CD ²) 20 (UC ³) infliximab therapy Ages: 18-68 47.2 % male
Follow-up time after calprotectin measurement	12 months	4 months	12 months
Patients in clinical relapse after follow-up	11 %	30 %	23 %
Cut-off	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96.8 %	100 %	96.1 %
PPV	27.6 %	75 %	68.7 %

Table 5

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

² CD = Crohn's disease patients

³ UC = Ulcerative Colitis patients

Method comparison

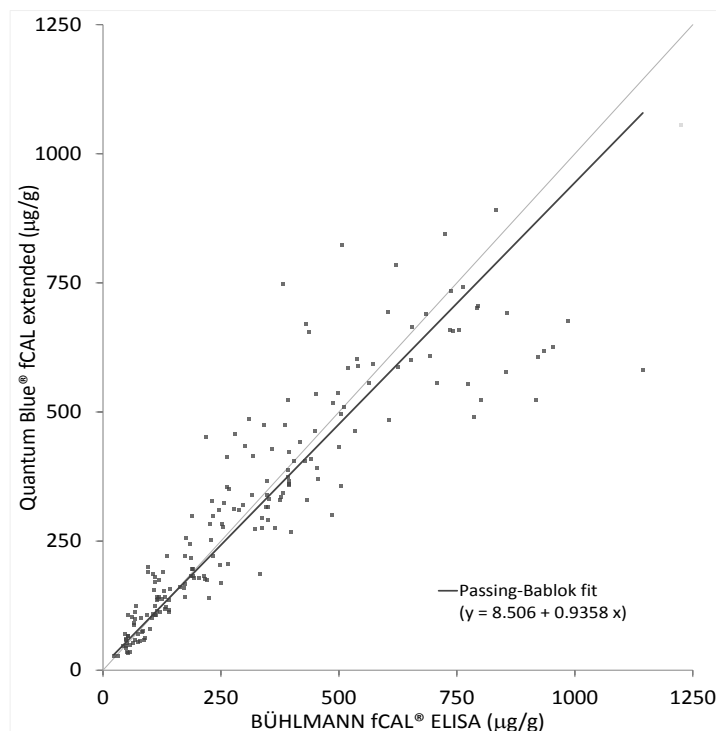


Figure 2

APPENDIX I

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

Recovery

Sample	1	2	3	4	5	6
Base value [µg/g]	77	111	141	240	232	349
Spike value [µg/g]	150	150	150	150	150	150
Expected value (base + spike) [µg/g]	227	261	291	390	382	499
Observed value (base + spike) [µg/g]	260	267	345	409	441	605
% Recovery (observed/expected)	115	102	118	105	115	121

Table 6

Within-laboratory precision

Mean Conc. [µg/g]	Repeatability CV [%]	Between -run Precision CV [%]	Between -day Precision CV [%]	Within-lab Precision CV [%]
51.7	19.1	10.2	7.6	23.0
118.6	18.3	0.0	3.3	18.6
295.0	15.3	5.3	7.9	18.0
647.8	16.8	11.1	5.9	21.0

Table 7

Reproducibility

Mean Conc. [µg/g]	Inter-lot precision CV [%]
49.2	16.5
112.2	17.0
278.4	20.1
682.1	20.6

Table 8

Limit of Quantification

Lower LoQ	Reference value (R) [µg/g]	Mean value obtained (O) [µg/g]	Bias [µg/g] (R-O)	Precision [% CV]	Total Error [%]
Lot M0527	37.3	29.2	-8.1	17.5	25.7
	28.2	21.3	-6.9	16.7	27.8
	23.6	17.6	-6.0	25.6	31.9
	19.1	13.6	-5.5	20.6	32.2
Lot M2128	37.3	37.4	0.2	24.1	24.2
	28.2	25.1	-3.1	15.8	17.8
	23.6	21.0	-2.6	29.1	28.2
	19.1	18.5	-0.6	20.7	20.3

Table 9

Upper LoQ	Reference value (R) [µg/g]	Mean value obtained (O) [µg/g]	Bias [µg/g] (R-O)	Precision [% CV]	Total Error [%]
Lot M0527	1001.7	752.6	-249.1	18.4	28.4
	746.0	706.9	-39.1	16.2	16.2
	678.6	704.2	25.6	14.0	15.1
	628.0	668.4	40.4	21.3	23.5
Lot M2128	1001.7	783.0	-218.7	22.6	28.1
	746.0	670.4	-75.6	13.9	16.1
	678.6	629.9	-48.7	17.2	17.5
	628.0	636.8	8.8	20.9	21.1

Table 10

Linearity

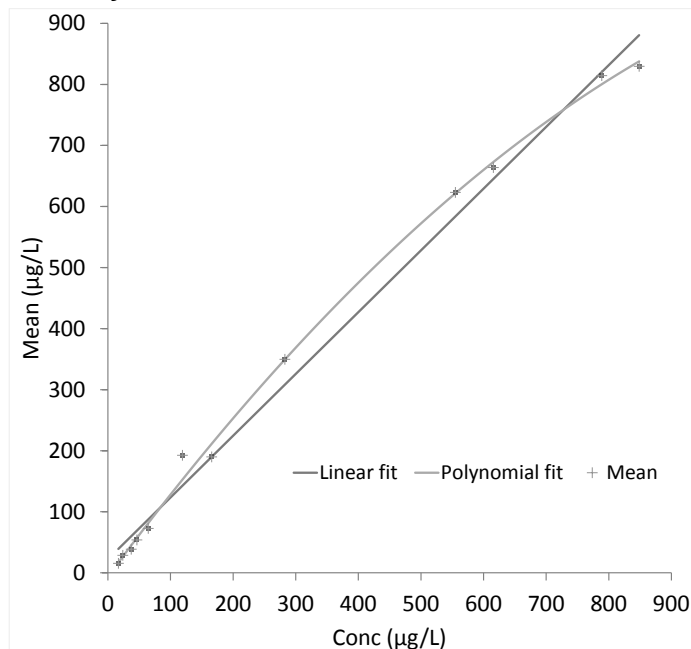


Figure 3





APPENDIX II

REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47,506-513 (2000).
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces*. Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al. *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al. *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
8. Qingling Zhu et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
9. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
10. Lin JF et al. *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
11. Lobatón T et al. *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
12. Lobatón T et al. *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
13. Wright EK et al., *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
14. Naismith GD et al. *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
15. Ferreiro-Iglesias R et al. *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
16. Ferreiro-Iglesias R1 et al. *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
17. Guardiola J. et al. *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
18. Lasso A et al. *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
19. Bressler B et al. *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
20. Peyrin-BL et al. *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
21. Molander P et al. *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
22. De Vos M et al. *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 9, 2111-2117 (2013)

APPENDIX IV

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

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