



# Quantum Blue<sup>®</sup> fCAL high range

**Quantitative  
Lateral Flow Assay**

LF-CHR25

25 tests

Revision date: 2017-05-02



**INTENDED USE**

The Quantum Blue® fCAL high range is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid in the assessment of intestinal mucosal inflammation. The test results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, e.g. Crohn's disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-6), in patients with chronic abdominal pain, above the age of four (ref. 7-8), and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 9-10).

For professional use only\*.

\*Canada, Taiwan: For laboratory use only.

**PRINCIPLE OF THE ASSAY**

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

**REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION**

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

Table 1

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

**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,	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 tubes consisting of spatulas and base caps	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip. Filled with 1.3 mL Extraction Buffer, ready to use	B-CAL-SO50

Table 2

**STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS**

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

**PRECAUTIONS**

**Safety Precautions**

- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

**Technical Precautions**

**Kit Components**

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

**Test Procedure**

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL high range test (CHR\_0 or CHR\_900) before starting the test (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the red RFID chip card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device.

- If not used directly, diluted samples should be stored at 2-8 °C and should be used within twelve hours.
- With BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3'000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube. The extracts can be stored directly in the CALEX® Cap Device. For re-use/ re-measurement of the extracts see step 2 under the chapter assay procedure.

---

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-200 µL and 3 mL
- Centrifuge
- 5 mL polypropylene or polystyrene tubes for dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Soft tissues or blotting paper

---

## SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

Stool specimens should be collected into plain tubes.

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

### Specimen Transport

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

### Specimen Storage

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

### Extract Storage

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

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

---

## ASSAY PROCEDURE

The assay procedure consists of three steps:

### 1. Extraction of Stool Samples:

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

### 2. Sample Processing:

Smart Prep or ScheBo® Quick Prep™: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes. Dilute the supernatant 1:100 with extraction buffer (e.g. 20 µL extract and 1980 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step. 3).

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

### 3. Lateral Flow Assay Procedure and Readout:

There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CHR\_900> and <CHR\_0>. Select one of these methods before starting the experiments.

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

#### 3.1. Method <CHR\_900> with internal timer

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

#### 3.2. Method <CHR\_0> without internal timer

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

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

---

## QUALITY CONTROL

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

---

## VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see Figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for

the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1A), the concentration of calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1B), the calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.

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

---

### STANDARDIZATION

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

---

### LIMITATIONS

- Reagents delivered with the Quantum Blue® fCAL high range kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values can be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- A calprotectin test result obtained with the Quantum Blue® fCAL high range test can be confirmed by measuring other biomarkers (such as C-Reactive Protein) or by repeating the calprotectin test (with the BÜHLMANN fCAL® ELISA or using a second test cassette) and comparing to the CDAI score and the

clinical status of the patient, before any clinical and/or therapeutic decision is made

- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevated fecal calprotectin levels.

---

### INTERPRETATION OF RESULTS

Estimation of fecal calprotectin is a reliable and easy way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases. Interpretation of results:

#### Values below 100 $\mu\text{g/g}$ :

Calprotectin values  $<100 \mu\text{g/g}$  are indicative of either non-inflammatory situation or mild inflammation in the gut. Further investigations and retesting the sample with EK-CAL or LF-CAL25 can be taken into consideration.

#### Elevated values between 100 and 200 $\mu\text{g/g}$ :

Calprotectin values between 100 and 200  $\mu\text{g/g}$  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 $\mu\text{g/g}$ :

Calprotectin values  $>200 \mu\text{g/g}$  are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested.

---

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### Repeatability: 20.0 – 22.7 %

#### Within-Laboratory Precision: 22.4 – 28.1 %.

Repeatability and within-laboratory precision were established according to CLSI guideline EP05-A3. Five (5) extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 180 and 1'224  $\mu\text{g/g}$ , were evaluated by one operator over 20 days, in two independent runs per day with two replicates per run. The test results are summarized in Table 13.

#### Reproducibility: 19.2 - 28.9 %

Reproducibility was established according to CLSI guideline EP05-A3 by performing measurements on three different Quantum Blue® Reader instruments with three different test cassette lots. Five (5) extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 202 and 1328  $\mu\text{g/g}$ , were tested over 5 days, in one run with five replicates per run. Each Quantum Blue® Reader instrument was operated by a different operator on three different sites. The results are summarized in Table 14.

**Limit of Blank (LoB): 60  $\mu\text{g/g}$  calprotectin.** The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four stool samples diluted to a target concentration below 10  $\mu\text{g/g}$  calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 blank values. The study was performed on two different test cassette lots. The LoB was evaluated by using non-parametric analysis.

**Limit of Detection (LoD): 100 µg/g calprotectin** The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with five clinical samples with concentrations of 59, 70, 82, 117 and 148 µg/g calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 75 values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoD was calculated using parametric analysis.

**Limit of Quantification (LoQ): 100 µg/g calprotectin** The LoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with six clinical samples with reference concentrations of 59, 70, 82, 117, 148 and 166 µg/g calprotectin established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 90 values. The study was performed with two different test cassette lots. The relative total error was calculated using the RMS model from precision and bias estimates for each sample. The relative total error values were log transformed and plotted against the reference calprotectin concentration of the samples. The LoQ was defined as the intersection of the linear regression model obtained for the plot and the acceptance criterion of 30 % relative total error. The results are summarized in Table 15.

**Linear Range: 67 – 2153 µg/g calprotectin** The linear range of the Quantum Blue® fCAL high range test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Two sample pools, low and high, were blended to obtain 17 concentration levels covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in 10 replicates on two test cassette lots. The linear range was defined as the interval of concentration levels in which coefficients of the second and third order fits were determined as not significant. Results for one test cassette lot are shown in Figure 2.

**Dilution Linearity: 1:10 - 1:106.** A clinical sample with an estimated concentration of 18'000 µg/g calprotectin was diluted in extraction buffer to obtain target concentrations of 12'500, 10'000, 7'500, 5'000, 2'500 and 1'700 µg/g calprotectin. The samples were further diluted 1:10 to obtain calprotectin concentrations covering the measuring range of the assay. The dilutions were measured in five replicates in the Quantum Blue® fCAL high range test on two test cassette lots. The linearity of the obtained dilutions was assessed according to CLSI guideline EP6-A. Where coefficients of second or third order fits were determined to be significant, a maximum deviation from linearity of 20 % was allowed, with no deviation above 10 % observed. Results for one test cassette lot are shown in Figure 3.

**High Dose Hook Effect:** A high dose hook effect was not observed for samples with calprotectin concentrations of up to 18'931 µg/g.

**Method Comparison**  
**Bias at clinical decision point (200 µg/g): -1.6 % (95 % confidence interval)**

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and three (103) clinical samples were measured according to the instruction for use with the Quantum Blue® fCAL high range test and with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. Measurements were performed over three days using two Quantum Blue® fCAL high range test cassette lots. The correlation data is illustrated in Figure 4.

**ANWENDUNGSZWECK**

Der Quantum Blue® fCAL high range ist ein *in-vitro*-diagnostischer Test für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben als Hilfsmittel bei der Einschätzung von Entzündungen der Darmschleimhaut. Die Testresultate können als Diagnose-Hilfsmittel verwendet werden zur Unterscheidung zwischen organisch-, entzündlichen Magen-Darm-Trakt Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (CD) oder Colitis ulcerosa (UC) und einer funktionellen Erkrankung (Reizdarmsyndrom) (Ref. 1-6) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen, die älter als vier Jahre sind (Ref. 7-8). Der Quantum Blue® fCAL high range Test dient auch als Hilfsmittel bei der Überwachung von CEDs (Ref. 9-10).

Nur für zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal geeignet.\*

\*Canada, Taiwan: Nur für Laborzwecke geeignet.

**PRINZIP DER METHODE**

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

**GELIEFERTE REAGENZIERN UND VORBEREITUNG**

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Testkassette	25 Stück	B-CAL-TC	Vakuumdicht in einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen, 0.5 mL	B-CHR- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	B-CHR-RCC	Rote Chipkarte

Tabelle 3

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

**Stuhlextraktionsröhrchen**

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

Extraktionsröhrchen	Menge	Produkt Code
CALEX® Cap Device	50, 200 oder 500 Röhrchen gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 Röhrchen bestehend aus Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, gefüllt mit 1.3 mL Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Tabelle 4

**LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIERN**

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

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

**Sicherheitsmassnahmen**

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

**Technische Vorsichtsmassnahmen**

**Kit Komponenten**

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

**Testablauf**

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Calprotectin high range (CHR\_0 bzw. CHR\_900) muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die rote RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.

- Unsachgemäße Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen befindliche Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Wenn die verdünnten Proben nicht direkt verwendet werden, sollten sie bei 2-8 ° C gelagert und innerhalb von zwölf Stunden verwendet werden.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3.000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden. Beim CALEX® Cap Device können die Extrakte direkt im Extraktionsröhrchen gelagert werden. Zur Weiterverwendung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Arbeitsanleitung.

## ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µL und 3 mL
- Zentrifuge
- 5 mL Polypropylen oder Polystyrol Einwegröhrchen zur Durchführung von Extraktverdünnung
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Papiertücher und Fliesspapier

## GEWINNUNG UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

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

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden.

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

### Transport der Proben

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

### Lagerung der Proben

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

### Lagerung des Extraktes

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

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

## TESTDURCHFÜHRUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritte:

### 1. Extraktion der Stuhlproben:

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchen beschrieben.

### 2. Verarbeitung des Extraktes:

- Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:100 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 1'980 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (3).

- CALEX® Cap Device: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:10 (z.B. 50 µL Extrakt + 450 µL Extraktionspuffer) verdünnen. Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (3).

### 3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung:

Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CHR\_900> und <CHR\_0>. Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Test starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der roten RFID Chipkarte.

#### 3.1 Methode <CHR\_900> mit internem Zeitmesser

- Testkassette auf den Kassettenhalter des Readers laden.
- 60 µL verdünntes Extrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Den Kassettenhalter schliessen und den Start (<ENTER>) Knopf drücken.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 15 Minuten (900 Sek.).
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie die den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

#### 3.2 Methode <CHR\_0> ohne internen Zeitmesser

- 60 µL verdünntes Extrakt auf die Ladevorrichtung der Testkassette aufbringen.
- Die Testkassette für 15 ± 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Readers laden und auslesen durch Drücken auf den Start (<ENTER>) Knopf.
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie die den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.

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



---

## QUALITÄTSKONTROLLE

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

---

## VALIDIERUNG DER RESULTATE

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

---

## STANDARDISIERUNG

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

---

## EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in dem Quantum Blue® fCAL high range Kit gelieferten Reagenzien sind nur zur Bestimmung der Calprotectin-Konzentration in menschlichen Stuhlproben bestimmt.
- Diese Calprotectin-Werte sollten als zusätzliches Hilfsmittel genutzt werden, um die Diagnosestellung des Arztes zu erleichtern.
- Ein Wert, der mit dem Quantum Blue® fCAL high range Test ermittelt wurde, kann mit der Messung anderer Biomarker (wie des C-reaktiven Protein) oder durch Wiederholung der Calprotectin-Messung bestätigt werden (mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA oder unter Verwendung einer zweiten Testkassette). Die Ergebnisse können mit dem CDAI Score und der Klinik des Patienten verglichen werden, bevor eine klinische oder therapeutische Entscheidung getroffen wird.
- Patienten, die regelmässig NSAIDs einnehmen, könnten erhöhte Calprotectin-Werte aufweisen.

---

## INTERPRETATION DER RESULTATE

Die Bestimmung von fäkalem Calprotectin ist eine einfache und zuverlässige Methode, um organische von funktionellen Erkrankungen zu unterscheiden.

### Normalwerte unter 100 µg/g:

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

### Erhöhte Werte zwischen 100 und 200 µg/g:

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

### Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectin-Werte >200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch einen Gastroenterologen werden empfohlen.

---

## LEISTUNGSMERKMALE

### Wiederholbarkeit: 20.0 - 22.7 % CV

### Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 22.4 - 28.1 % CV

Die Wiederholbarkeit und die Präzision innerhalb des Labors wurden gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 durchgeführt. Fünf (5) extrahierte Stuhlproben mit Calprotectin-Konzentrationen zwischen 180 und 1'224 µg/g, wurden über 20 Tage in zwei unabhängigen Messungen mit zwei Replikaten pro Messung durchgeführt. Die Resultate sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

**Reproduzierbarkeit: 19.2 - 28.9 %**

Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde auf drei verschiedenen Quantum Blue® Reader Instrumenten mit drei verschiedenen Testkassetten-Lots gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 bestimmt. Fünf (5) extrahierte Stuhlproben mit Calprotectin-Konzentrationen zwischen 202 und 1328 µg/g, wurden über 5 Tage in einer Messung mit fünf (5) Replikaten pro Messung durchgeführt. Jeder Quantum Blue® Reader wurde von je einem Operateur an drei verschiedenen Standorten bedient. Die Resultate sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

**Limit of Blank (LoB): 60 µg/g Calprotectin.** Der LoB-Wert wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit vier (4) Stuhlproben, die verdünnt wurden um eine Zielkonzentration unter 10 µg/g Calprotectin zu erhalten, durchgeführt. Um 60 Blankwerte zu erhalten, wurden die Stuhlproben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf (5) Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer non-parametrischen Analyse wurde der LoB berechnet.

**Limit of Detection (LoD): 100 µg/g Calprotectin.** Der LoD wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP17-A2 mit fünf (5) Proben mit Konzentrationen von 59, 70, 82, 117 and 148 µg/g Calprotectin bestimmt. Um 75 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Mit Hilfe einer parametrischen Analyse wurde der LoD berechnet.

**Limit of Quantification (LoQ): 100 µg/g Calprotectin.** Der LoQ wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP 17-A2 mit sechs (6) klinischen Proben mit Konzentrationen von 59, 70, 82, 117, 148 und 166 µg/g Calprotectin evaluiert auf dem BÜHLMANN fCAL® ELISA, bestimmt. Um 90 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Messungen mit jeweils fünf (5) Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Unter Verwendung des RMS-Modells, das aus den Präzisions- und Abweichungsschätzungen für jede Probe hervorging, wurde der relative Gesamtfehler berechnet. Die Werte des relativen Gesamtfehlers wurden logarithmisch transformiert und gegen die Referenz Calprotectin-Konzentration der Proben aufgetragen. Der LoQ wurde als der Schnittpunkt des linearen Regressionsmodells definiert, das für den Plot und das Akzeptanzkriterium von 30% relativen Gesamtfehlers erhalten wurde. Resultate, die mit einem Testkassetten-Lot gemessen wurden, sind in der Tabelle 15 zusammengefasst.

**Linearer Bereich: 67 - 2153 µg/g Calprotectin.**

Der lineare Bereich des Quantum Blue® fCAL high range Tests wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP06-A durchgeführt. Um mindestens 17 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und höher sind, wurden zwei Probenpools, niedrig und hoch, gemischt. Die Mischungen wurden mit jeweils 10 Replikaten auf zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Der lineare Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen Koeffizienten der zweiten und dritten Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. Resultate für ein Testkassetten-Lot sind in Figur 2 abgebildet.

**Verdünnungslinearität: 1:10 - 1:106.** Eine klinische Probe mit einer geschätzten Konzentration von 18'000 µg/g Calprotectin wurde in Extraktionspuffer verdünnt, um Zielkonzentrationen von 12'500, 10'000, 7'500, 5'000, 2'500 und 1'700 µg/g Calprotectin zu erhalten. Die Proben wurden weiter 1:10 verdünnt, um Calprotectin-Konzentration zu erhalten, die den erwarteten Messbereich des Tests abdecken. Die Verdünnungen wurden mit jeweils fünf Replikaten auf dem Quantum Blue® fCAL high range Test mit zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Die Linearität der erhaltenen Verdünnungen wurde nach der CLSI-Richtlinie EP6-A bestimmt. Wurden Koeffizienten der zweiten oder dritten Ordnung als signifikant deklariert, wurde eine maximale Abweichung von der Linearität von 20% erlaubt, wobei keine Abweichung über 10% beobachtet wurde. Resultate für ein Testkassetten Lot sind in Figur 3 abgebildet.

**“Hook Effect” bei hohen Dosen:** Bis zu einer Konzentration von 18'931 µg/g Calprotectin wurde kein Hook-Effekt bei hohen Dosen beobachtet.

**Methodenvergleich:****Bias am klinischen Entscheidungspunkt (200 µg/g): -1.6 % (95 % Konfidenz Intervall)**

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertdrei (103) klinische Proben wurden mit dem Quantum Blue® fCAL high range und dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Test gemäss der Gebrauchsanweisung evaluiert. Messungen wurden über drei Tage auf zwei verschiedenen Quantum Blue® fCAL high range Testkassetten-Lots durchgeführt. Die Korrelationsdaten sind in der Figur 4 illustriert.

## UTILISATION PREVUE

Le test Quantum Blue® fCAL high range est un test diagnostique *in vitro* de dosage quantitatif de la calprotectine dans les échantillons de selles humaines, conçu pour aider à évaluer l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale. Les résultats du test peuvent contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer – chez les patients de plus de quatre ans (ref. 7-8) souffrant de douleurs abdominales chroniques – une maladie inflammatoire du tractus gastro-intestinal de type organique (maladie inflammatoire chronique de l'intestin MICI, par ex. maladie de Crohn ou recto-colite hémorragique, RCH) (ref. 1-6) d'une maladie fonctionnelle (syndrome de l'intestin irritable, SII) et, d'autre part, à la surveillance d'une MICI (ref. 9-10).

Uniquement pour utilisation professionnelle\*.

\*Canada, Taiwan : Utilisation en laboratoire uniquement.

## PRINCIPE DU TEST

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

## REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

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

Tableau 5

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

## REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

## Dispositifs d'extraction de selles

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

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

Tableau 6

## STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

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

## PRÉCAUTIONS

## Précautions de sécurité

- Aucun des réactifs de ce test ne contient de composants d'origine humaine.
- Les échantillons des patients doivent être manipulés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

## Précautions techniques

## Composants du kit

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

## Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le dosage de la Quantum Blue® fCAL high range (CHR\_0 ou CHR\_900) avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).

- Utiliser la carte à puce RFID rouge pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Si elle n'est pas utilisée directement, les échantillons dilués doivent être conservés à 2-8 ° C et doivent être utilisés dans douze heures.
- Il est important de centrifuger les extraits avec BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ avant de les conserver, 5 min à 3000 x g. Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation. Avec les tubes CALEX® Cap, les extraits peuvent être stockés directement dans le dispositif d'extraction. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l'étape 2 dans le chapitre procédure de dosage.

### MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

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

### RELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

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

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

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

#### Transport des échantillons

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

#### Conservation des échantillons

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

#### Conservation des extraits

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

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

## PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage se déroule en 3 étapes :

### 1. Extraction des échantillons de selles :

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

### 2. Préparation des extraits :

- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : après extraction, laisser les extraits sédimenter pendant 10 minutes. Diluer l'extrait au 1/100ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 20 µL d'extrait et 1'980 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).
- Tube d'extraction CALEX® Cap : après extraction, laisser sédimenter les extraits pendant 10 minutes, embout blanc vers le bas. Dévissez le bouchon bleu et diluer l'extrait au 1/10ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 50 µL d'extrait et 450 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28 °C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).

### 3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat :

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective <CHR\_900> et <CHR\_0>. Sectionner l'une des méthodes avant de procéder au test.

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

#### 3.1. Méthode <CHR\_900> avec minuteur interne

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

#### 3.2. Méthode <CHR\_0> sans minuteur interne

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

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

---

### CONTROLE DE QUALITE

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

---

### VALIDATION DES RESULTATS

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

---

### STANDARDISATION

- Le dosage en flux latéral est standardisé contre le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe est générée avec les valeurs moyennes ( $n \geq 20$  mesures à chaque fois) provenant de 13 points de calibrage et d'échantillons de selles différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de mesure se situe entre 100 et 1800 µg/g.

- Pour des mesures quantitatives, la lecture d'échantillons inconnus au-dessus de 1800 µg/g pourrait s'accompagner d'une dilution 1/10 supplémentaire avec le tampon d'extraction et le dosage devrait être effectué à nouveau selon la procédure. Le facteur de dilution résultant doit être pris en compte pour les calculs finaux.
- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs inférieures à 100 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage Quantum Blue® fCAL (code de commande respectifs: LF-CAL25).

---

### LIMITES

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

---

### INTERPRETATION DES RESULTATS

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

#### Valeurs inférieures à 100 µg/g :

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

#### Valeurs élevées entre 100 et 200 µg/g :

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

#### Valeurs élevées supérieures à 200 µg/g :

Les valeurs de calprotectine >200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires sous le suivi de médecins spécialistes.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

**Répétabilité : 20.0 – 22.7 %**

**Précision intra-laboratoire : 22.4 – 28.1 %**

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Cinq (5) échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 180 et 1 224 µg/g ont été testés par un opérateur quotidiennement pendant 20 jours, dans deux dosages indépendants, à raison de deux répétitions par dosage. Le Tableau 13 rassemble les résultats de tests ainsi obtenus.

**Reproductibilité : 19.2 – 28.9 %**

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Pour ce faire, des mesures ont été réalisées sur trois instruments Quantum Blue® Reader différents à l'aide de trois lots de cassettes test différents. Cinq (5) échantillons d'extraits de selles, présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 202 et 1 328 µg/g, ont été testés pendant 5 jours, à raison d'un dosage quotidien répété cinq fois. Chacun des lecteurs Quantum Blue® Reader a été utilisé par un opérateur différent, dans trois sites différents. Le Tableau 14 rassemble les résultats obtenus.

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

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

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

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

**Limite de quantification (LoQ) 100 µg/g calprotectine**

La LoQ a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de six échantillons cliniques dont les concentrations de référence en calprotectine, mesurées au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA, étaient de 59, 70, 82, 117, 148 et 166 µg/g. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 90 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots différents de cassettes tests. L'erreur relative totale a été calculée à l'aide du modèle de la moyenne quadratique à partir d'estimations d'erreur de précision et de biais pour chaque échantillon. Les valeurs d'erreur relative totale ont été transformées en log et portées graphiquement en fonction de la concentration de référence en calprotectine des échantillons. La LoQ a été déterminée par la valeur correspondant à l'intersection de la droite d'ajustement obtenue par régression linéaire avec le niveau d'erreur relative totale de 30 % défini comme critère d'acceptation. Le Tableau 15 rassemble les résultats obtenus.

**Plage de linéarité : 67 – 2 153 µg/g calprotectine**

La plage de linéarité du test Quantum Blue® fCAL et Quantum Blue® fCAL high range a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A. Deux groupes d'échantillons, de niveau haut et bas, ont été regroupés de manière à obtenir au moins 17 niveaux de concentration couvrant et excédant la gamme de mesure attendue. Les mélanges ont été testés sous forme de 10 répétitions d'échantillons, en deux analyses indépendantes réalisées avec deux lots de cassettes tests. La plage de linéarité a été définie comme l'intervalle des concentrations dont les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres étaient déterminés comme non significatifs. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la Figure 2.

**Linéarité de dilution : 1:10 – 1:106**

Un échantillon clinique dont la concentration de calprotectine était estimée à 18 000 µg/g a été dilué dans la solution tampon d'extraction pour donner des concentrations cibles en calprotectine de 12 500, 10 000, 7 500, 5 000, 2 500 et 1 700 µg/g. Les échantillons ont été encore dilués au 1:10, ce qui a permis d'obtenir des concentrations finales en calprotectine couvrant la plage de mesure de l'essai. Ils ont alors été mesurés en cinq réplicas au moyen du test Quantum Blue® fCAL high range pratiqué sur deux lots de cassettes tests différents. La linéarité des dilutions obtenues a été évaluée selon la ligne directrice CLSI EP6-A. Dans les cas où les coefficients des ajustements de courbe des deuxième ou troisième ordres étaient déterminés comme significatifs, un taux de déviation de linéarité de 20 % maximum était autorisé, aucune déviation supérieure à 10 % n'étant observée. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la Figure 3.

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

**Comparaison de méthodes :**

**Biais au point de décision clinique (200 µg/g) : -1,6 % (intervalle de confiance à 95 %)**

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent trois (103) échantillons cliniques ont été mesurés conformément aux instructions d'utilisation au moyen des tests BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range et fCAL® ELISA. Les mesures ont été réalisées pendant trois jours avec deux lots de cassettes tests Quantum Blue® fCAL high range. Les données de corrélation sont illustrées sur la Figure 4.

**USO PREVISTO**

Quantum Blue® fCAL high range è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina umana nei campioni di feci impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto per la diagnosi nel distinguere delle malattie infiammatorie organiche del tratto gastrointestinale (malattia infiammatoria intestinale, MII (IBD) (ref. 1-6), ad es. morbo di Crohn o colite ulcerosa, CU), malattie funzionali (sindrome dell'intestino irritabile, SII (IBS)), in pazienti con dolore addominale cronico di età superiore ai Quattro anni (ref. 7-8). Inoltre contribuisce al monitoraggio dello stato della malattia IBD (ref. 9-10).

Solo per uso professionale\*.

\*Canada, Taiwan: Solo per uso nel laboratorio.

**PRINCIPIO DEL TEST**

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

**REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE**

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

Tabella 7

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

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

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

Dispositivi di estrazione	Quantità	Codice
CALEX® Cap Device	50, 200 o 500 dispositivi contenenti 5 mL di tampone di estrazione, pronto all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
BÜHLMANN Smart-Prep	50 dispositivi, costituiti da spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore, contenenti 1.3 mL di tampone di estrazione / pronto all'uso	B-CAL-SO50

Tabella 8

**CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI**

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

**PRECAUZIONI****Precauzioni di sicurezza**

- Nessuno dei reagenti di questo test contiene componenti di origine umana.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone prassi di laboratorio (BPL).
- La soluzione inutilizzata va smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

**Precauzioni tecniche****Componenti del kit**

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

**Procedura del test**

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, gestiti o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il dosaggio della Quantum Blue® fCAL high range (CHR\_0 o CHR\_900) prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID rossa per modificare i parametri del test specifici per ogni lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.

- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- Se non viene utilizzato direttamente, i campioni diluiti devono essere conservati a 2-8 °C e devono essere utilizzati entro dodici ore.
- È importante che gli estratti con BÜHLMANN Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3.000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta. Con il dispositivo CALEX® Cap è possibile conservare gli estratti direttamente con il dispositivo. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo procedura del test.

### MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 µL e 3 mL
- Centrifuga
- Provette in polipropilene o polistirene di 5 mL per la diluizione degli estratti
- Timer (facoltativo)
- Quantum Blue® Reader fornito da BÜHLMANN (codice: BI-POCTR-ABS)
- Salviette o carta da blotting

### RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

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

I campioni di feci devono essere raccolti in provette semplici.

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

#### Trasporto campioni

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

#### Conservazione dei campioni

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

#### Conservazione degli estratti

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

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

### PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

#### 1. Estrazione dei campioni di feci:

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

#### 2. Trattamento del campione:

- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:100 con il tampone di

estrazione (es. 20 µL di estratto e il 1'980 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).

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

#### 3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:

Esistono due metodi alternativi disponibili sul Quantum Blue® Reader: <CHR\_900> e <CHR\_0>. Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno di questi metodi.

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

##### 3.1 Metodo <CHR\_900> con timer interno

- Caricare la card sul supporto per cassetta test del Reader.
- Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella card.
- Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 15 minuti (900 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 <CHR\_0> senza timer interno

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

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

### CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori tecnici, si controllino gli aspetti seguenti: i) dispositivi di pipettaggio, controllo della temperatura e timer, ii) data di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.



- Il self-test, che viene eseguito quando si accende il Quantum Blue® Reader, deve essere valido.

## VALIDAZIONE DEI RISULTATI

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

## STANDARDIZZAZIONE

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

## LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL high range è utilizzato per la determinazione dei livelli di calprotectina in soli campioni di feci umane.
- I valori di calprotectina dovrebbero essere utilizzati come ausilio supplementare a disposizione del medico per poter effettuare una diagnosi.
- Prima di prendere qualsiasi decisione clinica e/o terapeutica, il risultato del test della calprotectina ottenuto con il dosaggio rapido Quantum Blue® fCAL high range può essere confermato misurando altri biomarcatori (come ad esempio la proteina reattiva C) o ripetendo il test della calprotectina BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL, o utilizzando una seconda card) e confrontando i risultati con il punteggio CDAI e lo stato clinico del paziente.
- I pazienti che assumono regolarmente FANS possono avere un aumento nei loro livelli della calprotectina fecale.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La determinazione quantitativa della calprotectina nelle feci è un metodo facile ed attendibile, per distinguere tra malattie gastrointestinali organiche e funzionali. Interpretazione dei risultati:

### Valori <100 µg/g:

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

### Valori tra 100 µg/g e 200 µg/g:

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

### Valori superiore 200 µg/g:

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

## PERFORMANCE CARATTERISTICA

**Ripetibilità: 20.0–22.7%**

**Precisione interna del laboratorio: 22.4–28.1%.**

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate in base alla norma CLSI EP05-A3. Cinque (5) campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 180 e 1 224 µg/g sono stati analizzati da un operatore in un periodo di 20 giorni, in due esecuzioni indipendenti al giorno con due ripetizioni per esecuzione. I risultati del test sono riportati in Tabella 13.

**Riproducibilità: 19.2–28.9%**

La riproducibilità è stata determinata in base alla norma CLSI EP05-A3 effettuando misurazioni su tre strumenti Quantum Blue® Reader diversi con tre lotti diversi di cassette del test. Cinque (5) campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 202 e 1 328 µg/g sono stati analizzati in un periodo di 5 giorni, in un'esecuzione unica con cinque ripetizioni per esecuzione. Ogni strumento Quantum Blue® Reader è stato adoperato da un operatore diverso presso tre sedi diverse. I risultati sono riportati in Tabella 14.

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

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

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

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

Il LoQ è stato determinato in base alla norma CLSI EP17-A2 su sei campioni clinici con concentrazioni di riferimento di calprotectina di 59, 70, 82, 117, 148 e 166 µg/g, stabilite con il test BÜHLMANN fCAL® ELISA. I campioni sono stati misurati in un periodo di tre giorni in cinque ripetizioni ogni giorno, ottenendo 90 valori. Lo studio è stato condotto con due lotti diversi di cassette del test. L'errore relativo totale è stato calcolato usando il modello RMS dalle stime di precisione e distorsione di ciascuna campione. I valori dell'errore relativo totale sono stati trasformati logaritmicamente e diagrammati contro la concentrazione di riferimento di calprotectina dei campioni. Il LoQ è stato definito come l'intersezione del modello di regressione lineare ottenuto per il grafico e il criterio di accettazione del 30% di errore relativo totale. I risultati sono riportati in Tabella 15.

**Intervallo lineare: 67–2 153 µg/g di calprotectina**

L'intervallo lineare del test Quantum Blue® fCAL high range è stato determinato in base alla norma CLSI EP06-A. Due gruppi di campioni, a concentrazione bassa e alta, sono stati mescolati per ottenere 17 livelli di concentrazione che rientravano e superavano l'intervallo di misurazione previsto. Le miscele sono state analizzate in 10 ripetizioni con due lotti di cassette del test. L'intervallo lineare è stato definito come l'intervallo dei livelli di concentrazione nei quali coefficienti dell'adattamento di secondo e terzo ordine sono stati ritenuti non significativi. I risultati per una cassetta del test sono illustrati in Figura 2.

**Linearità della diluizione: 1:10–1:106.** Un campione clinico con concentrazione stimata di calprotectina di 18 000 µg/g è stato diluito con tampone di estrazione per ottenere concentrazioni bersaglio di calprotectina di 12 500, 10 000, 7 500, 5 000, 2 500 e 1 700 µg/g. I campioni sono stati ulteriormente diluiti 1:10 per ottenere concentrazioni di calprotectina che coprissero l'intervallo di misurazione del dosaggio. Le diluizioni sono state misurate in cinque ripetizioni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. La linearità delle diluizioni ottenute è stata valutata in base alla norma CLSI EP6-A. Quando i coefficienti dell'adattamento di secondo o terzo ordine sono stati ritenuti significativi, è stata consentita una deviazione massima dalla linearità del 20%, senza osservare deviazioni superiori al 10%. I risultati di un lotto di cassette del test sono illustrati in Figura 3.

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

**Confronto del metodo****Distorsione al punto di decisione clinica (200 µg/g): -1,6% (intervallo di confidenza al 95 %)**

Lo studio di confronto del metodo è stato condotto in base alla norma CLSI EP09-A3. Centotré (103) campioni clinici sono stati misurati secondo le istruzioni per l'uso con il test Quantum Blue® fCAL high range e con il test BÜHLMANN fCAL® ELISA. Le misurazioni sono state effettuate in un periodo di tre giorni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. I dati di correlazione sono illustrati in Figura 4.

**INDICACIONES DE USO**

El Quantum Blue® fCAL high range es un ensayo diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas a fin de facilitar la valoración de una inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo se pueden utilizar para facilitar el diagnóstico, permitiendo distinguir una enfermedad inflamatoria orgánica del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, por ejemplo la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa) (ref. 1-6) de una enfermedad funcional (síndrome del intestino irritable, SII), en pacientes con dolor abdominal crónico mayores de cuatro años (ref. 7-8), y para facilitar el control de la EII (ref. 9-10).

. Sólo para uso profesional\*.

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

**PRINCIPIO DEL ANÁLISIS**

El análisis permite la determinación selectiva del antígeno calprotectina mediante inmunoanálisis tipo sándwich. La membrana de análisis lleva un recubrimiento de un anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para calprotectina. Un segundo anticuerpo de detección monoclonal, conjugado con coloides de oro, se deposita en la almohadilla de liberación del conjugado y se libera en el sistema de reacción tras la adición de la muestra de suero diluida. El conjugado de oro anticapprotectina con calprotectina se une al anticuerpo anti-calprotectina que recubre una zona de la membrana de análisis (línea de test; T) mientras que el resto del conjugado de oro anticapprotectina libre se une al anticuerpo de cabra antirratón que recubre asimismo otra zona de la membrana de análisis (línea de control; C). Las intensidades de señal de la línea de test y la línea de control se miden cuantitativamente con el lector Quantum Blue® Reader.

**REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Casetes de prueba	25 unidades	B-CAL-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de extracción	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Controles (alto/bajo)*	2 viales, 0.5 mL	B-CHR- CONSET	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CHR-RCC	Tarjeta de plástica roja

Tabla 9

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

**Dispositivos de extracción fecal**

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

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

Tabla 10

**CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS**

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

**PRECAUCIONES**

**Precauciones de seguridad**

- Ninguno de los reactivos de esta prueba tiene componentes de origen humano.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a buenas prácticas de laboratorio (BPL) tomando las precauciones apropiadas.
- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

**Precauciones técnicas**

**Componentes del kit**

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

**Procedimiento de análisis**

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El lector Quantum Blue® Reader debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de Quantum Blue® fCAL high range (CHR\_0 o CHR\_900) antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue® Reader).

- Utilizare la tarjeta roja con chip RFID para modificare los parámetros de prueba específicos de lote.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción.
- Si no se usa directamente, las muestras diluidas deben almacenarse a 2-8 ° C y deben usarse dentro de las doce horas.
- Es importante centrifugar los extractos con BÜHLMANN Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ antes de la conservación (5 minutos a 3 000 x g). Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo. Con CALEX® Cap dispositivo puede almacenar los extractos directamente con el dispositivo. Para la reutilización / nueva medición de los extractos de ver el paso 2 en el capítulo procedimiento del análisis.

### MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Vórtex para la extracción de heces.
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 a 200 µL y 3 mL.
- Centrifuga.
- Tubos de 5 mL desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones los extractos
- Cronómetro (optativo).
- Lector Quantum Blue® Reader disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS).
- Pañuelos suaves o papel secante.

### OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

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

Las muestras de heces se deberán recoger en tubos lisos.

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

#### Transporte de muestras

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

#### Almacenamiento de muestras

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

#### Almacenamiento de extractos

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

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

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El procedimiento del ensayo consiste en tres pasos:

### 1. Extracción de las muestras de heces:

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

### 2. Procesamiento de las muestras:

- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir los extractos de heces 1:100 con tampon de extracción (e.g. 20 µL extracto y 1'980 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Después de la extracción, dejar que el extracto de heces asiente durante 10 minutos con la cabeza blanca del dispositivo hacia abajo. Desenrosque la tapa de color azul e diluir el sobrenadante 1:10 con tampon de extracción (e.g. 50 µL extracto y 450 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso 3).

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

En el lector Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CHR\_900> y <CHR\_0>. Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

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

#### 3.1. Método <CHR\_900> con cronómetro interno

- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Añada 80 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El escaneo se inicia automáticamente pasados 15 minutos (900 segundos).
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.1 usando 80 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.

#### 3.2 Método <CHR\_0> sin cronómetro interno

- Añada 80 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 15 minutos ± 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Inicie el escaneo del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<ENTER>) inmediatamente.
- Para controles cajo / alto: Repita el paso 3.2 usando 80 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.

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

---

## CONTROL DE CALIDAD

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

---

## VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

---

## ESTANDARIZACIÓN

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

- Para mediciones cuantitativas, las muestras desconocidas con lecturas por encima de 1800 µg/g puede diluirse adicionalmente 1:10 con tampón de extracción y ensayarse de nuevo.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por debajo de 100 µg/g pueden repetirse con el ensayo Quantum Blue® fCAL ( código: LF-CAL25).

---

## LIMITACIONES

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

---

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La estimación de la calprotectina fecal es un modo fiable y sencillo de distinguir los trastornos gastrointestinales orgánicos de los funcionales. Interpretación de los resultados:

### Valores por debajo de 100 µg/g:

Estos valores de calprotectina <100 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. Se puede considerar la posibilidad de realizar investigaciones adicionales o repetir el ensayo de la muestra con EK-CAL o LF-CAL25..

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

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

### Valores elevados por encima de 200 µg/g:

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

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

**Repetibilidad: 20.0-22.7 %**

**Precisión intralaboratorio: 22.4-28.1 %.**

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se establecieron conforme a la norma EP05-A3 del CLSI. Cinco (5) muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina de entre 180 y 1 224 µg/g fueron analizadas por un mismo operador durante un período de 20 días en dos series independientes cada día de dos copias cada una. En la tabla 13 se resumen los resultados.

**Reproducibilidad: 19.2-28.9 %**

La reproducibilidad se determinó conforme a la norma EP05-A3 del CLSI realizando mediciones en tres distintos instrumentos Quantum Blue® Reader con tres distintos lotes de cartuchos de prueba. Cinco (5) muestras de heces con concentraciones de calprotectina de entre 202 y 1 328 µg/g fueron analizadas durante un período de 5 días en una única serie de cinco copias. Cada uno de los instrumentos Quantum Blue® Reader fue manejado por un operador distinto situado en tres sitios distintos. En la tabla 14 se resumen los resultados.

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

**Límite de detección (LoD): 100 µg/g de calprotectina** El LoD se determinó con cinco muestras clínicas con concentraciones de calprotectina de 59, 70, 82, 117 y 148 µg/g, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra por día durante un período de tres días, por un total de 75 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. El LoD se calculó mediante un análisis paramétrico.

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

El LoQ se determinó con seis muestras clínicas con concentraciones de referencia de calprotectina de 59, 70, 82, 117, 148 y 166 µg/g, determinadas con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra por día durante un período de tres días, por un total de 90 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. Se determinó el error relativo total mediante el modelo de RMS a partir de estimaciones del sesgo y la precisión de cada muestra. Se representó el logaritmo del error relativo total frente a la concentración de calprotectina de referencia de las muestras. Se determinó el LoQ como el valor de intersección del modelo de regresión lineal obtenido de la gráfica con un criterio de aceptación del error relativo total del 30 %. En la tabla 15 se resumen los resultados.

**Intervalo de linealidad: 67 – 2 153 µg/g de calprotectina**

El intervalo de linealidad del ensayo Quantum Blue® fCAL high range se determinó conforme a la norma EP06-A del CLSI. Dos mezclas de muestra, con concentración alta y baja respectivamente, se mezclaron hasta obtener 17 valores distintos de concentración que abarcaran un intervalo que comprendiera todo el intervalo esperado. Se analizaron diez copias de las mezclas en dos lotes de cartuchos de prueba. El intervalo de linealidad se definió como el intervalo de valores de concentración en el cual los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden resultan despreciables. En la figura 2 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

**Linealidad de la dilución: 1:10-1:106.** Una muestra clínica con una concentración estimada de calprotectina de 18 000 µg/g se diluyó en un tampón de extracción para obtener unas concentraciones predeterminadas de calprotectina de 12 500, 10 000, 7500, 5000, 2500 y 1700 µg/g. Se practicó una ulterior dilución 1:10 de las muestras para obtener concentraciones de calprotectina que abarcaran el intervalo de medición del ensayo. Se analizaron cinco copias de las diluciones en dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. La linealidad de las diluciones obtenidas se determinó conforme a la norma EP6-A del CLSI. En los casos en los que los coeficientes de los ajustes de segundo o tercer orden resultaran no despreciables, se estableció un valor máximo aceptado de desviación de la linealidad del 20 %, observándose una desviación máxima del 10 %. En la figura 3 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

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

**Comparación de los métodos**

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

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se midieron ciento tres (103) muestras clínicas con el ensayo Quantum Blue® fCAL high range y con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, siguiendo las instrucciones de uso. Se realizaron mediciones durante un período de tres días con dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. En la figura 4 se muestran los datos de correlación.

**USO PRETENIDO**

O Quantum Blue® fCAL high range é um teste de diagnóstico *in vitro* para a determinação quantitativa da calprotectina em amostras fecais humanas, sendo indicado ao uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do ensaio podem ser utilizados com o auxílio no diagnóstico, ajudando a distinguir doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças inflamatórias intestinais [DII], p.ex., doença de Crohn ou colite ulcerativa [CU]) de doenças funcionais (síndrome do intestino irritável [SII]) (ref. 1-6), em pacientes com dor abdominal crônica com mais de quatro anos de idade (ref. 7-8), e como auxiliar do monitoramento de DII (ref. 9-10).

Para uso profissional\*.

\*Canada, Taiwan: só para uso laboratorial.

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

Tabela 12

**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 Quantum Blue® Reader.

**ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES**

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

**PRECAUÇÕES**

**Precauções de segurança**

- Nenhum reagente deste kit contém componentes de origem humana.
- Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais (BPL).
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a Regulamentação das Entidades Governamentais Locais.

**Precauções técnicas**

**Componentes do kit**

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

**Procedimento do teste**

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O leitor Quantum Blue® Reader tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® fCAL high range (CHR\_0 o CHR\_900), antes do início do teste (ver manual do Leitor Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão vermelho RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de doentes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados erróneos.

**REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO**

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

Tabela 11

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

- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente o amostra no tubo de extração.
- Se não for utilizado directamente, as amostras diluídas devem ser armazenadas a 2-8 ° C e devem ser utilizadas dentro de doze horas.
- É importante centrifugar os extratos com BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3.000 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo. Com CALEX® Cap dispositivo pode armazenamento os extratos directamente com o dispositivo. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo Procedimento de Ensaio.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECEDOS

- Vortex para extração das fezes
- Pipetas com pontas descartáveis: 10-200 µL e 3 mL
- Centrífuga
- Tubos de propileno ou poliestereno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronómetro (opcional)
- Leitor Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

## COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

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

As amostras de fezes devem ser coletadas em tubos lisos.

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

### Transporte da amostra

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

### Armazenamento de amostras

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

### Armazenamento do extratos

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

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

## PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

### 1. Extração das amostras de fezes:

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

### 2. Processamento de amostras:

- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:100 com tampão de extração (por exemplo: 20 µL do extrato e 1'980 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante 5 minutos a 18-28° antes de continuar com o procedimento do teste (passo 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, antes de continuar com o procedimento do teste. Abrir a tampa azul. Diluir os extratos 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28° antes de continuar com o procedimento do teste (passo 3.).

### 3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

Existem disponíveis dois métodos alternativos no leitor Quantum Blue® Reader: <CHR\_900> e <CHR\_0>. Selecione um deles antes de iniciar o processo de leitura. Proceda à leitura do cartão chip RFDI vermelho, de forma a atualizar os parâmetros específicos do lote.

#### 3.1. Método <CHR\_900> com cronómetro interno

- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Adicione 80 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Feche o dispositivo do cassete no leitor e inicie a medição pressionando ENTER (<START>).
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 15 minutos (900 segundos).
- Para Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.1 usando 80 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído

#### 3.2. Método <CHR\_0> sem cronómetro interno

- Adicione 80 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Incube durante 15 minutos ± 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Precione ENTER (<START>) no leitor Quantum Blue® Reader para fazer a leitura da cassete.
- Para Controles Baixo / Alto: Repita a etapa 3.2 usando 80 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



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

## CONTROLE DE QUALIDADE

- Se a precisão do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições 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® Reader (calibration check) quando é iniciado tem que ser válida.

## VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

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

## ESTANDARDIZAÇÃO

- O teste de imunocromatografia está em conformidade com a BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O leitor Quantum Blue® Reader utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. Esta curva específica do lote é gerada com os valores medianos ( $n \geq 20$  medições cada) de 13 pontos de calibração obtidos a partir de diferentes amostras de fezes com concentrações de calprotectina conhecidas. A gama de calibração varia de 100 a 1800 µg/g.
- Para medições quantitativas, as amostras desconhecidas com valores superiores a 1800 µg/g podem ser diluídas 1:10 com o tampão de extração, e analisadas de acordo com o procedimento. O fator de diluição deve ser multiplicado pelo valor de concentração medido para obter o resultado final.

- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras abaixo de 100 µg/g podem ser re-testadas no Quantum Blue® fCAL (referência: LF-CAL25).

## LIMITAÇÕES

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

## INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

O valor da calprotectina fecal permite distinguir corretamente e facilmente a doença gastrointestinal orgânica da funcional. Interpretação dos resultados:

### Valores inferiores a 100 µg/g:

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

### Valores elevados entre 100 e 200 µg/g:

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

### Valores elevados superiores a 200 µg/g:

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

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

**Repetibilidade: 20.0 – 22.7 %**

**Precisão intralaboratorial: 22.4 – 28.1 %**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI. Cinco (5) amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 180 e 1 224 µg/g foram avaliadas por um operador por 20 dias em duas corridas independentes por dia, com duas replicações por corrida. Os resultados do teste estão resumidos na Tabela 13.

**Reprodutibilidade: 19.2 – 28.9 %**

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, através de medições executadas em três leitores Quantum Blue® Reader diferentes, com três lotes de cassetes de teste diferentes. Cinco (5) amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 202 e 1 328 µg/g foram testadas por 5 dias em uma corrida com cinco replicações por corrida. Cada um dos leitores Quantum Blue® Reader foi operado por um operador diferente em três locais diferentes. Os resultados estão resumidos na Tabela 14.

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

**Limite de detecção (LoD): 100 µg/g de calprotectina.** O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se cinco amostras clínicas com concentrações de 59, 70, 82, 117 e 148 µg/g de calprotectina. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 75 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O LoD foi calculado usando-se análise paramétrica.

**Limite de quantificação (LoQ): 100 µg/g de calprotectina.** O LoQ foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se seis amostras clínicas com concentrações de referência de 59, 70, 82, 117, 148 e 166 µg/g de calprotectina determinadas com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 90 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio de cada amostra. Os valores de erro relativo total foram transformados logaritmicamente e plotados contra as concentrações de referência de calprotectina das amostras. O LoQ foi definido como a intersecção do modelo de regressão linear obtido para a plotagem e o critério de aceitação de 30% do erro relativo total. Os resultados estão resumidos na Tabela 15.

**Faixa linear: 67 – 2 153 µg/g de calprotectina**

A faixa linear do teste Quantum Blue® fCAL high range foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras, alto e baixo, foram misturados para se obter 17 níveis de concentração abrangendo toda a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em 10 replicações com dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de níveis de concentração nos quais os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na Figura 2.

**Linearidade da diluição: 1:10 - 1:106.** Uma amostra clínica com uma concentração estimada de 18 000 µg/g de calprotectina foi diluída no tampão de extração para se obter concentrações de 12 500, 10 000, 7 500, 5 000, 2 500 e 1 700 µg/g de calprotectina. As amostras foram submetidas a uma diluição adicional de 1:10 para se obter concentrações de calprotectina que correspondessem à faixa de medição do teste. As diluições foram então medidas em cinco replicações no teste Quantum Blue® fCAL high range, com dois lotes de cassetes de teste. A linearidade das diluições obtidas foi avaliada de acordo com a diretriz EP6-A do CLSI. Nos pontos em que os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordem foram considerados significativos, um desvio máximo da linearidade de 20% foi permitido, sendo que nenhum desvio acima de 10% foi observado. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na Figura 3.

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

**Comparação de métodos**

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

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Centro e três (103) amostras clínicas foram medidas de acordo com as instruções do teste Quantum Blue® fCAL high range e com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As medições foram realizadas por três dias usando-se dois lotes de cassetes de teste Quantum Blue® fCAL high range. Os dados de correlação podem ser vistos na Figura 4.

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

Test Cassette Results

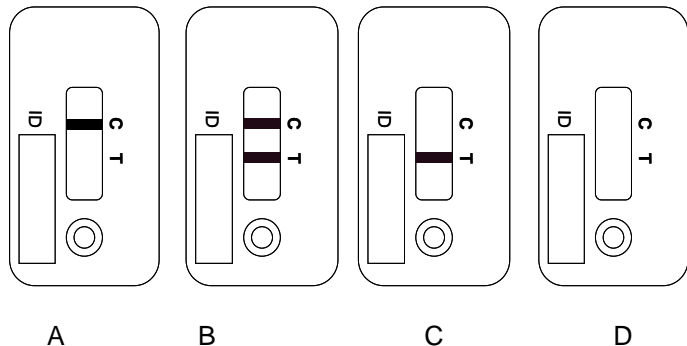


Figure 1

Within-laboratory precision

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

Table 13

Reproducibility

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

Table 14

Limit of Quantification

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

Table 15

<sup>1</sup> Lot/Op/Inst. = Lot, Operator and Instrument

<sup>2</sup> The relative total error and the acceptance criterion were log transformed

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

Linearity

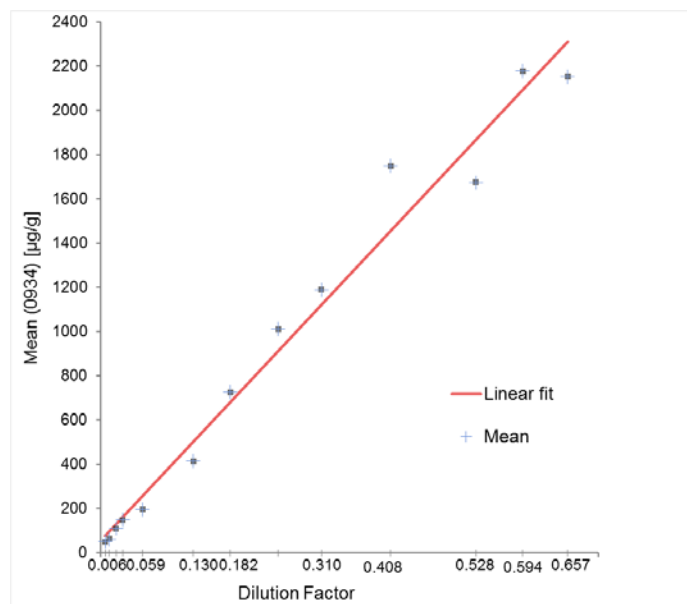


Figure 2

Method Comparison

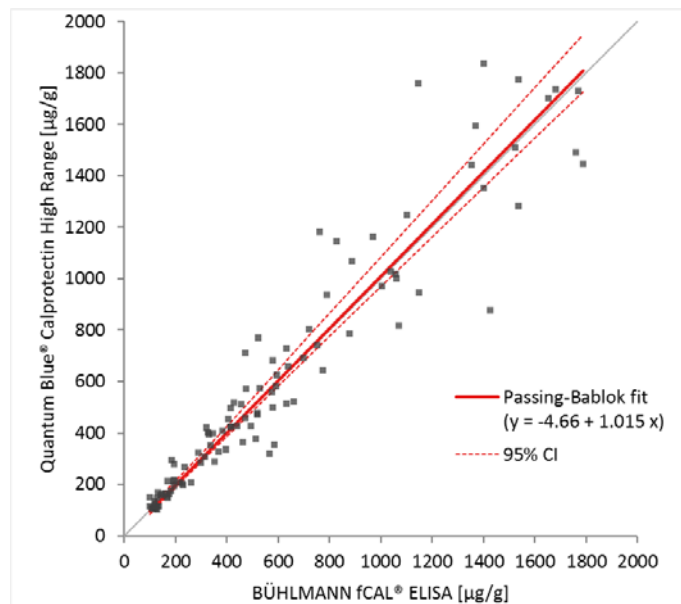


Figure 4

Dilution Linearity

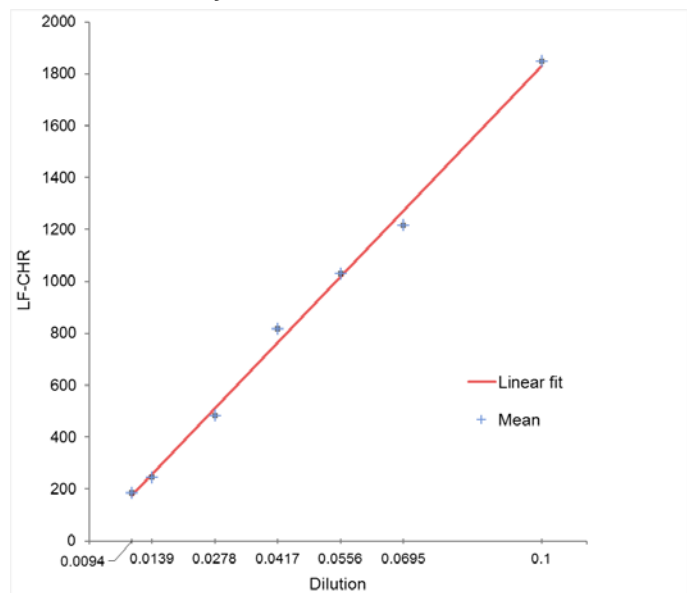


Figure 3




## REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / REFERENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS


1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet **356**, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut **47**, 506-513 (2000).
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol **123**, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.. Tidsskr Nor Legeforen* **128**, 743–5 (2008)
5. Manz M et al. *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology **12**, 5 (2012).
6. Pavlidis P. et al. *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. **48**, 1048-54 (2013)
7. Qingling Zhu et al. *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE **11** (3) (2016)
8. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis **12**(6), 524-34 (2006)
9. Lin JF et al. *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. **20**,1407-15, 2014
10. Goebeler M et al.: *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation **58**(3), 355-361 (1994).





## SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

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

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