Quantum Blue®
fCAL extended

Quantitative Lateral Flow Assay

For In Vitro Diagnostic Use.

LF-CALE25 25 tests

Release date: 2019-12-20
Version A1
INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended is an in vitro diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid in the assessment of intestinal mucosal inflammation. The assay results can be used as an aid to diagnosis in distinguishing organic, inflammatory disease of the gastrointestinal tract (inflammatory bowel disease, IBD, specifically Crohn’s disease or ulcerative colitis, UC) from functional disease (irritable bowel syndrome, IBS) (ref. 1-7), in patients with chronic abdominal pain and as an aid to IBD disease monitoring (ref. 7-18).

For laboratory use only.
EU: For professional use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

<table>
<thead>
<tr>
<th>Reagents</th>
<th>Quantity</th>
<th>Code</th>
<th>Comments</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Test Cassette</td>
<td>25 pieces</td>
<td>B-LFCALUS-TC</td>
<td>vacuum-sealed in a foil pouch</td>
</tr>
<tr>
<td>Extraction Buffer</td>
<td>1 bottle</td>
<td>B-CAL-EX</td>
<td>Ready to use</td>
</tr>
<tr>
<td>Controls Low* / High*</td>
<td>2 vials</td>
<td>B-CALE-CONSET</td>
<td>Ready to use</td>
</tr>
<tr>
<td>RFID Chip Card</td>
<td>1 piece</td>
<td>B-CALE-RCC</td>
<td>White plastic card</td>
</tr>
<tr>
<td>RFID Chip Card</td>
<td>1 piece</td>
<td>B-CALE-RCC720</td>
<td>Green plastic card</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Table 1

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal extraction devices

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Extraction device Kits</th>
<th>Quantity</th>
<th>Code</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>CALEX® Cap device</td>
<td>Packages of 50, 200 or 500 tubes available, filled with 5 mL extraction buffer Ready to use</td>
<td>B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500</td>
</tr>
<tr>
<td>Smart-Prep</td>
<td>50 tubes consisting of spatulas and base caps</td>
<td>B-CAL-RD</td>
</tr>
<tr>
<td>ScheBo® Quick-Prep™</td>
<td>50 tubes consisting of tube, cone &amp; dosing tip, each filled with 1.3 mL extraction buffer Ready to use</td>
<td>B-CAL-SO50</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

PRECAUTIONS

Safety precautions

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

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

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

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

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

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

Extract storage
Fecal calprotectin extracts obtained with CALEX® Cap device are stable at room temperature for 3 days and at 2-8 °C for up to 6 days. For longer storage, freeze extracts at -20 °C. Frozen extracts are stable for a period of up to 23 months.

CALEX® Cap extracts can be stored and frozen directly within the CALEX® Cap device. Extracts can be subject to four freeze-thaw cycles. Prior to measurement, allow frozen extracts to equilibrate to room temperature. For re-use / re-measurement of the extracts see step 2 under the chapter assay procedure.

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

ASSAY PROCEDURE

The assay procedure consists of three steps:

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

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

3. Lateral flow assay procedure and readout
   Two alternative methods can be loaded from the respective RFID chip card: B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720. Select one of the RFID chip cards before starting the experiments. Load the test method from the RFID chip card on the Quantum Blue® Reader.

3.1. Method <B-CALE-RCC720> with internal timer
   - Use the green RFID chip card.
   - Load the test cassette onto the test cassette holder of the reader.
   - Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
   - Close the test cassette holder and start the measurement by pressing the start button.
   - The scan starts automatically after 12 minutes (720 seconds).
For low / high controls: Repeat step 3.1 with 60 µL controls instead of diluted stool extract.

3.2. Method <B-CALE-RCC> without internal timer
- Use the white RFID chip card.
- Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Incubate for 12 minutes +/- 1 minute (set a timer manually).
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the reader.
- Scan the test cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start button immediately.
- For low / high controls: Repeat step 3.2 with 60 µL of controls instead of diluted stool extract.

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

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

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

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

LIMITATIONS
- Reagents delivered with the BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values are intended as an aid to diagnosis in distinguishing organic disease from functional disease and as an aid to IBD monitoring. Results should always be interpreted in combination with other clinical and laboratory findings.
- For IBD disease monitoring, multiple fecal calprotectin measurements performed at up to 4 weeks intervals have been suggested to have best diagnostic accuracy in predicting clinical relapse in patients (ref. 19-20).
- In rare cases, when calprotectin levels are extremely high (above 4000 µg/g, i.e. in acute UC), the test system may be prone to a high dose hook effect, that can result in values below the expected 850 µg/g upper limit of the linear range. It is advised to give particular attention to results above 300 µg/g when accompanied by strong symptoms, which could indicate acute inflammation. In this case retesting of a patient’s stool sample by a laboratory in timely manner is recommended for confirmation.
- Patients who are taking NSAIDs regularly may have elevated fecal calprotectin levels.
- Results may not be clinically applicable to children less than 4 years of age who have mildly increased fecal calprotectin levels (ref. 21-24).
I. Distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

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

Clinical thresholds

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Calprotectin concentration</th>
<th>Interpretation</th>
<th>Follow-up</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
<td>Normal</td>
<td>None</td>
</tr>
<tr>
<td>80 - 160 µg/g</td>
<td>Gray-zone/Borderline</td>
<td>Follow-up within 4 – 6 weeks</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt; 160 µg/g</td>
<td>Elevated</td>
<td>Repeat as needed</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Fecal calprotectin values below 80 µg/g

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

Fecal calprotectin values between and equal to 80 and 160 µg/g

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

Fecal calprotectin values above 160 µg/g

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

Clinical evaluation

The ability of the BÜHLMANN fCAL® ELISA to discriminate between patients with IBD and other non-inflammatory GI disorders, including IBS, was tested in a clinical study with a total of 337 adult and pediatric patients. One hundred and thirty five (135) patients had a final diagnosis of IBD (Crohn’s disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis), 130 patients suffered from IBS and 72 patients presented with abdominal pain and/or diarrhea, or other GI-related non-inflammatory conditions (refer to table 4). Final diagnosis was supported by endoscopic as well as other clinical findings.

A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 83.7% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and GI-related non-inflammatory conditions, including IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.923 (refer to table 5). A clinical sensitivity of 93.3% at 80 µg/g and a clinical specificity of 85.4% at 160 µg/g, can be reached in the differentiation between IBD and IBS. ROC curve analysis resulted in an AUC of 0.933 (refer to table 6).

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

II. IBD monitoring

Clinical thresholds and evaluation

The determination of fecal calprotectin is also a reliable and simple way to assist the monitoring of IBD patients (ref. 7-18).

Correlation of calprotectin levels and the inflammatory status of patients’ intestinal mucosa, according to endoscopic evaluations, was determined in three independent studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 9). The diagnostic value of calprotectin in predicting clinical remission and relapse, according to patient’s symptoms, clinical activity indices, unplanned need for therapy escalation, hospitalization or emergency was determined in three studies using BÜHLMANN calprotectin tests (table 10). The result categories shown are recommendations and their establishment is based on condensed knowledge of published cut-offs and clinical performance studies. It is advised that healthcare practitioners establish individual patient thresholds by determining the patient’s baseline calprotectin level during disease remission.

Fecal calprotectin levels below 100 µg/g:

Fecal calprotectin levels below 100 µg/g can reliably indicate patients, with low risk of clinical relapse, in endoscopic remission for whom invasive endoscopic procedures can be avoided (ref. 7-18).

Fecal calprotectin levels between 100 and 300 µg/g:

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

Fecal calprotectin levels above 300 µg/g:

Fecal calprotectin levels above 300 µg/g should be repeated and, if raised levels are confirmed, prompt further investigative procedures (ref. 7-18).
**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Method comparison**

Bias at clinical decision points:

- 50 µg/g: 10.6% (95% CI: -2.1-36%)
- 200 µg/g: -2.2% (95% CI: -4.9-4.7%)
- 100 µg/g: 2.1% (95% CI: -2.7-14%)
- 300 µg/g: -3.6% (95% CI: -7.0-2.3%)

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

Recovery: 102%-121%

Six stool specimen extracts were spiked with 150 µg/g calprotectin in calibrator material of human serum origin. The baseline extract was spiked with the corresponding amount of extraction buffer. Baseline and spiked samples were measured in eight replicates. One test cassette lot was used. The results are summarized in table 11.

**Repeatability: 15.3-19.1% CV**

**Within-laboratory precision: 18.0-23.0% CV**

Repeatability and within-laboratory precision were determined according to CLSI guideline EP05-A2. Four extracted stool samples, including extracts with calprotectin levels close to clinical decision points, were measured over ten days, in two independent runs each day, with two replicates per run. A single reagent lot was used (table 12).

**Inter-lot precision: 16.5-20.6% CV**

Inter-lot precision was determined according to CLSI guideline EP05-A2. Four extracted stool samples, including extracts with calprotectin levels close to clinical decision points, were measured using three different reagent lots. The measurements were performed over five days, in a single run each day, with two replicates per run (table 13).

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

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

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

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

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

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

The LoQ was established according to CLSI guideline EP17-A. To determine the lower LoQ, four extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 19.1 to 37.3 µg/g were measured in ten replicates to produce 40 values (table 14). To determine the upper LoQ, four extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 628 to 1001.7 µg/g were measured in ten replicates to produce 40 values (table 15). The study was performed with two different test cassette lots. Reference calprotectin values of extracted stool samples were determined with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. The relative total error was calculated using the RMS model from estimates of precision and bias to the reference values, for each sample. The LoQ was defined as the lowest and highest sample concentration, for the lower LoQ and upper LoQ, respectively, which met the acceptance criterion of 30% relative total error.

**Linearity: 30-850 µg/g**

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

**High dose hook effect**

No high dose hook effect was observed for calprotectin concentrations up to 1500 µg/g. Decrease in mean signal below the 850 µg/g upper linear range limit was estimated for calprotectin concentrations above 4000 µg/g. No value below the highest clinical decision point of 300 µg/g was observed for any of the single replicate results for all high samples tested. Seven to eight extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging from 1361 µg/g to 13’817 µg/g were measured in five replicates on three different test cassette lots.
ANWENDUNGszWECK
Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended ist ein in vitro-Diagnosetest für die quantitative Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben, der als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Darmschleimhautentzündung dient. Die Testergebnisse dienen bei der Diagnose als Hilfsmittel zur Unterscheidung zwischen organischen, entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (entzündliche Darmerkrankungen (CED), speziell Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (UC)) und funktionellen Erkrankungen (Reizdarmsyndrom (RDS)) (Ref. 1-7) bei Patienten mit chronischen Bauchschmerzen und als Hilfsmittel bei der Überwachung der CED (Ref. 7-18).

Für den Laborgebrauch.
Europa: Für den professionellen Gebrauch.

PRINZIP DER METHODE

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

<table>
<thead>
<tr>
<th>Reagenz</th>
<th>Menge</th>
<th>Art.-Nr.</th>
<th>Kommentar</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Testkassette</td>
<td>25 Stück</td>
<td>B-LFCALUS-TC</td>
<td>Vakuumdicht In einem Folienbeutel</td>
</tr>
<tr>
<td>Extraktionspuffer</td>
<td>1 Flasche, 125 mL</td>
<td>B-CALEX-EX</td>
<td>Gebrauchsleifer</td>
</tr>
<tr>
<td>Kontrollen tief* / hoch*</td>
<td>2 Flüsschlen, 0,5 mL</td>
<td>B-CALE-CONSET</td>
<td>Gebrauchsleifer</td>
</tr>
<tr>
<td>RFID Chipkarte</td>
<td>1 Stück</td>
<td>B-CALE-RCC</td>
<td>Weisse Plastikkarte</td>
</tr>
<tr>
<td>RFID Chipkarte</td>
<td>1 Stück</td>
<td>B-CALE-RCC720</td>
<td>Grüne Plastikkarte</td>
</tr>
</tbody>
</table>


LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN
Sämtliche Kitkomponenten sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar.

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICH

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Extraktions-</th>
<th>Menge</th>
<th>Art.-Nr.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>produkte Kits</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>CALEX® Cap</td>
<td>Packungen mit 50, 200 oder 500 Röhrchen erhältlich, gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer</td>
<td>B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500</td>
</tr>
<tr>
<td>Smart-Prep</td>
<td>50 Röhrchen bestehend aus Spatel und Böden</td>
<td>B-CALED-RD</td>
</tr>
<tr>
<td>ScheBo™ Quick-Prep™</td>
<td>50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, gefüllt mit 1,3 mL Extraktionspuffer</td>
<td>B-CALED-SO50</td>
</tr>
</tbody>
</table>

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN
- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-100 µL, 100-1000 µL und 250-2500 µL
- Zentrifuge
- 5 mL Polypolpropylen oder Polystyrol Einwegröhrchen zur Durchführung von Extraktverdünning
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Papiertücher und Fliespapier

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen
- Alle Patientenproben sollten gemäss Guter Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheits-vorkehrungen sollten getroffen werden.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung auftreten.
- Die Reagenzien und Chemikalien müssen gemäss den nationalen Richtlinien und Bestimmungen als gefährlicher Abfall behandelt werden.
Technische Vorsichtsmassnahmen

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

Testablauf
- Lesen Sie die 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 der beschriebenen Arbeitsanleitung abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet und für den Quantum Blue® fCAL extended Test programmiert werden: Laden Sie die Testmethode mithilfe der RFID Chipkarte (B-CALE-RCC oder B-CALE-RCC720), bevor Sie den Test starten (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemässe Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen enthaltene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung für 5 Min. bei 3000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden.

PROBENENTNAHME UND LAGERUNG
Für das Extraktionsverfahren werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt. Die Stuhlproben in Röhrchen ohne Zusatzstoffe füllen.
Wichtiger Hinweis: Den Proben dürfen keine chemische oder biologische Zusatzstoffe beigefügt werden.

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

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

Lagerung des Extraktes

TESTDURCHFÜHRUNG
Der Arbeitsablauf gliedert sich in drei Schritte:

1. Extraktion der Stuhlproben:
Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchens beschrieben.

2. Verarbeitung des Extraktes:
- Smart-Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten ruhen lassen. Den Überstand mit Extraktionspuffer 1:10 verdünnen (z.B. 50 µL Extrakt + 450 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird (Schritt Nr. 3).

3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung
3.1 Methode <B-CALE-RCC720> mit internem Zeitmesser

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

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

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

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

QUALITÄTSKONTROLLE

- Der Selbsttest, der beim Einschalten des Quantum Blue® Readers durchgeführt wird, muss gültig sein.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

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

- Der Quantum Blue® fCAL extended wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL® ELISA (Art.-Nr.: EK-CAL) standardisiert.

- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectinkonzentration eine lot-spezifische Standardkurve. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 1000 µg/g.

- Um quantitative Ergebnisse für die Calprotectinkonzentrationen zwischen 850-1800 µg/g zu erhalten, können hohe Proben, die über 850 µg/g anzeigen, mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® high range Test (Bestellcode: LF-CHR25) erneut getestet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Quantum Blue® fCAL extended Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.

- Fäkale Calprotectinwerte sind als Hilfe bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen Erkrankung von einer funktionalen Erkrankung und zur IBD-Überwachung vorgesehen. Die Interpretation der Resultate sollte stets in Kombination mit anderen klinischen Ergebissen und Laborergebnissen erfolgen.

- Um bei der IBD-Überwachung die beste diagnostische Genauigkeit zu erzielen, einen klinischen Rückfall vorherzusehen, wurde empfohlen mehrere Messungen des Stuhlcalprotectins in bis zu 4 Wochen Intervallen durchzuführen (Ref. 19-20).

- In seltenen Fällen, wenn die Calprotectinkonzentrationen extrem hoch sind (über 4000 µg/g, d.h. bei akuter UC), könnte das Testsytem empfindlich für einen High-Dose-Hook-Effekt sein, was Werte unterhalb der erwarteten Obergrenze des linearen Bereichs von 850 µg/g ergeben könnte. Es wird geraten besondere Aufmerksamkeit auf Resultate oberhalb von 300 µg/g zu legen, wenn sie mit starken Symptomen einhergehen, was eine akute Entzündung anzeigen könnte. In diesem Falle wird für die Bestätigung eine zeitnahe erneute Messung der Patientenstuhlprobe empfohlen.

- Patienten, die regelmässig NSAID einnehmen, könnten erhöhte fäkale Calprotectinkonzentrationen aufweisen.

- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinwerte im Stuhl aufweisen (Ref. 21-24).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

I. Unterscheiden einer organischen Erkrankung von einer funktionalen gastrointestinalen Erkrankung

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

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

Klinische Schwellenwerte

Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA erhoben (Bestellcode: EK-CAL). Ergebnisse aus 58 klinischen Proben von mit RDS diagnostizierten Patienten und aus 131 klinischen Proben von mit CED diagnostizierten Patienten aus einer internationalen klinischen Studie wurden herangezogen, um die in Tabelle 3 angegebenen Werte zu erhalten.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Calprotectin- Konzentration</th>
<th>Interpretation</th>
<th>Nachuntersuchung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
<td>Normal</td>
<td>Keine</td>
</tr>
<tr>
<td>80 – 160 µg/g</td>
<td>Grauzone/ grenzwertig</td>
<td>Nachbeobachtung innerhalb von 4-6 Wochen</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt; 160 µg/g</td>
<td>Erhöht</td>
<td>Bei Bedarf wiederholen</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Calprotectinwerte unterhalb 80 µg/g

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

Calprotectinwerte zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g

Calprotectinwerte sind im Stuhl im Mittelbereich zwischen oder gleich 80 und 160 µg/g, die auch als Grauzonenwerte bezeichnet werden, deuten nicht direkt auf eine aktive Entzündung hin, die eine sofortige Nachuntersuchung mit invasiven Tests erfordert. Das Vorliegen einer Entzündung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Entzündungsstatus wird eine erneute Überprüfung der Calprotectinwerte im Stuhl nach 4 bis 6 Wochen empfohlen.

Calprotectinwerte oberhalb von 160 µg/g

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

Klinische Beurteilung

160 µg/g erreicht. Die ROC-Kurvenanalyse ergab einen AUC von 0,923 (siehe Tabelle 5).

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

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

II. CED-Überwachung

Klinische Schwellenwerte und Beurteilung


Calprotectin-Werte unterhalb 100 µg/g

Calprotectin-Spiegel im Stuhl unterhalb 100 µg/g können Patienten mit niedrigem Risiko eines klinischen Rezidivs in endoskopischer Remission verlässlich identifizieren. Invasive endoskopische Verfahren können bei Patienten vermieden werden (Ref. 7-18).

Calprotectinwerte zwischen 100 und 300 µg/g

Calprotectin-Spiegel im Stuhl von 100 bis 300 µg/g können auf die Notwendigkeit einer engmaschigeren Überwachung im folgenden Zeitraum hinweisen, um Tendenzen der Krankheitsentwicklung zu beurteilen.

Calprotectinwerte oberhalb 300 µg/g

Bei Calprotectinspiegeln im Stuhl von über 300 µg/g sollte die Bestimmung wiederholt und bei Bestätigung erhöhter Spiegel weitere Untersuchungsverfahren veranlasst werden (Ref. 7-18).

LEISTUNGSMERKMALE

Methodenvergleich

Bias an den klinischen Entscheidungspunkten:

- 50 µg/g: -10,6% (95% CI: -2,1-36%)
- 200 µg/g: -2,2% (95% CI: -4,9-4,7%)
- 100 µg/g: 2,1% (95% CI: -2,7-14%)
- 300 µg/g: -3,6% (95% CI: -7,0-2,3%)


Wiederfindung: 102%-121%


Präzision (Wiederholbarkeit): 15,3-19,1% CV

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


Inter-Lot-Präzision: 16,5-20,6% CV


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


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

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

**Limit of Quantification (LoQ)**

**Unterer LoQ: ≤30 (28,2) µg/g Calprotectin.**
**Oberer LoQ: ≥1000 (1002) µg/g Calprotectin.**


**Linearität: 30-850 µg/g**


**High-Dose-Hook Effekt**

Bei Calprotectinkonzentrationen bis zu 1500 µg/g wurde kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet. Eine Abnahme des gemittelten Signals unter die obere lineare Bereichslimite von 850 µg/g wurde für Calprotectin-Konzentrationen über 4000 µg/g abgeschätzt. Es wurde für keines der einzelnen Replikatmessungen ein Wert unterhalb des höchsten klinischen Entscheidungspunktes von 300 µg/g beobachtet. Sieben bis acht extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 1361 µg/g und 13’817 µg/g wurden in fünf Replikaten auf drei Testkassetten-Lots gemessen.
**FRANÇAIS**

**UTILISATION PRÉVUE**

Le BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended est un test de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de la calprotectine dans les prélèvements de selles humains destiné à aider à l'évaluation de l'inflammation de la muqueuse intestinale. Les résultats du dosage peuvent aider au diagnostic différenciant une maladie inflammatoire organique du tructus gastro-intestinal (maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou MICI, spécifiquement maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable ou SCI) (réf. 1-7), chez les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques et peuvent également aider au suivi d'une MICI (réf. 7-18). Pour utilisation en laboratoire uniquement.

**Europe : pour utilisation professionnelle.**

**PRINCIPE DU TEST**

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

**REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION**

**Tableau 1**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Réactifs</th>
<th>Quantité</th>
<th>Code</th>
<th>Commentaires</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Cassette test</td>
<td>25 pièces</td>
<td>B-LFCALUS-TC</td>
<td>Scellée sous vide dans un sac</td>
</tr>
<tr>
<td>Tampon d'extraction</td>
<td>1 flacon</td>
<td>B-CAL-EX</td>
<td>Prêt à l'emploi</td>
</tr>
<tr>
<td>Contrôles bas*/élevé*</td>
<td>2 flacons</td>
<td>B-CALE-CONSET</td>
<td>Prêts à l'emploi</td>
</tr>
<tr>
<td>Carte à puce RFID</td>
<td>1 pièce</td>
<td>B-CALE-RCC</td>
<td>Carte en plastique blanche</td>
</tr>
<tr>
<td>Carte à puce RFID</td>
<td>1 pièce</td>
<td>B-CALE-RCC720</td>
<td>Carte en plastique verte</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

**STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS**

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

**REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE**

**Dispositifs d'extraction de selles**

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

**Tableau 2**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kits de dispositifs d'extraction</th>
<th>Quantité</th>
<th>Code</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tube d’extraction CALEX® Cap</td>
<td>Paquets de 50, 200 ou 500 tubes disponibles, chaque tube contenant 5 mL de tampon d'extraction</td>
<td>B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500</td>
</tr>
<tr>
<td>Smart-Prep</td>
<td>50 tubes, comprenant chacun spatules et fonds de tube</td>
<td>B-CAL-RD</td>
</tr>
<tr>
<td>ScheBo® Quick-Prep₆*</td>
<td>50 tubes constitués d'un tube, d'un cône et d'un embout doseur, chacun rempli de 1,3 mL de tampon d'extraction</td>
<td>B-CAL-SO50</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI**

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

**PRECAUTIONS**

**Précautions de sécurité**

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

- Traiter les réactifs et les produits chimiques comme des déchets dangereux conformément aux lignes directrices ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

Précautions techniques

Composants du kit

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

Procédure de test

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

Conservation des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus avec le dispositif CALEX® Cap sont stables à température ambiante pendant 3 jours et à 2-8 °C jusqu’à 6 jours. Pour un stockage plus long, congelez les extraits à -20 °C. Les extraits congelés sont stables pendant une durée pouvant aller jusqu’à 23 mois. Les extraits CALEX® Cap peuvent être directement stockés et congelés dans le dispositif CALEX® Cap. Les extraits peuvent être soumis à quatre cycles de congélation-décongélation. Avant la mesure, laisser les extraits congelés s’équilibrer à température ambiante. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l’étape 2 dans le chapitre procédure de dosage. La calprotectine dans les extraits obtenus au moyen de la méthode par pesée manuelle ou au moyen des dispositifs BÜHLMANN Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ est stable à 2-8 °C pendant ≤ 7 jours et à -20 °C pendant 36 mois.

PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage se déroule en trois étapes :

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

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

3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat
   Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective < B-CALE-RCC > et < B-CALE-RCC720 >. Sélectionner l’une des cartes à puce RFID avant de procéder au test. Charger les paramètres spécifiques au lot de réactif au moyen de la carte à puce RFID sur le Quantum Blue® Reader.
3.1. Méthode <B-CALE-RCC720> avec minuteur interne

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

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

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

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

**CONTROLE DE QUALITE**

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

**VALIDATION DES RESULTATS**

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

**STANDARDISATION**

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

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse Quantum Blue® fCAL extended sont uniquement destinés à la détermination des taux de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les dosages de la calprotectine fécale visent à contribuer, d'une part, au diagnostic permettant de distinguer une maladie organique d'une maladie fonctionnelle et, d'autre part, au suivi d'une MICI. Les résultats devraient toujours être interprétés en association avec ceux d'autres investigations cliniques et de laboratoire.
- Pour le suivi des MICI, il a été suggéré que de multiples mesures de la calprotectine fécale réalisées à des intervalles pouvant aller jusqu'à 4 semaines permettent d'obtenir la meilleure précision diagnostique dans la prédiction de la rechute clinique des patients (réf. 19-20).
- Dans de rares cas, lorsque les taux de calprotectine sont extrêmement élevés (supérieurs à 4 000 µg/g, à savoir dans la RCH aiguë), le système de test peut être sujet à un effet crochet à haute concentration. Cet effet peut se traduire par des valeurs en dessous de la limite supérieure attendue, 850 µg/g, de la plage de linéarité. Il est conseillé de ne pas interpréter ces résultats de manière absolue.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

I. Differenciation entre maladie organique et maladie gastro-intestinale fonctionnelle

La détermination des niveaux de calprotectine fécale peut servir d'aide fiable et simple à la différenciation des maladies organiques des maladies gastro-intestinales fonctionnelles (réf. 1-7). Les catégories de résultats se basent sur les données d'études cliniques mises en œuvre par BÜHLMANN et constituent des recommandations de BÜHLMANN. Tous les résultats de test doivent être interprétés en conjonction avec les informations obtenues à partir des symptômes cliniques du patient, ses antécédents médicaux et les autres résultats cliniques et biologiques.

Valeurs seuils cliniques

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

### Valeurs de calprotectine inférieures à 80 µg/g

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

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

Des niveaux de calprotectine fécale moyens, compris entre 80 et 160 µg/g, bornes incluses, également qualifiés de niveaux dans la zone grise, ne sont pas directement corrélés à l'inflammation active ou inactive. Il est recommandé de réévaluer les niveaux de calprotectine fécale après 4 à 6 semaines pour déterminer l'état d'inflammation.

### Valeurs de calprotectine supérieures à 160 µg/g

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

#### Évaluation clinique

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Concentration en calprotectine</th>
<th>Interprétation</th>
<th>Suite</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
<td>Normale</td>
<td>Aucune</td>
</tr>
<tr>
<td>80 – 160 µg/g</td>
<td>Zone grise/frontière</td>
<td>Suite dans les 4 à 6 semaines</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt; 160 µg/g</td>
<td>Supérieure à la normale</td>
<td>Répéter le cas échéant</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

La combinaison optimale des seuils pour ces pools de patients a pu être définie par analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) à 80 µg/g et 160 µg/g de calprotectine, ce qui est légèrement plus restrictif que la combinaison du seuil plus sensible de 50 µg/g mais avec une performance de spécificité inférieure, et du seuil haut de 200 µg/g de sensibilité légèrement inférieure (tableaux 7 et 8).

II. Suivi des MICI

Seuils cliniques et évaluation
Le dosage de la calprotectine fécale constitue un moyen simple et fiable d'aider au suivi des patients atteints de MICI (réf. 7-18). La corrélation entre les niveaux de calprotectine et l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale du patient, évalué par endoscopie, a été déterminée dans trois études indépendantes utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 9). La valeur diagnostique de la calprotectine dans la prédiction de la rémission et de la rechute cliniques, en fonction des symptômes du patient, des indices d'activité clinique, du recours non planifié à une intensification thérapeutique, une hospitalisation ou une intervention d'urgence, a été déterminée dans trois études utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 10).

Les catégories de résultats indiquées sont des recommandations ; elles sont établies en condensant les connaissances des études publiées sur les seuils et performances cliniques. Il est recommandé aux praticiens de santé d'établir des seuils individuels pour chaque patient en déterminant le niveau "basal" de calprotectine du patient pendant les périodes de rémission.

Valeurs de calprotectine inférieures à 100 µg/g
Des niveaux de calprotectine fécale en dessous de 100 µg/g peuvent indiquer de façon fiable des patients à faible risque de rechute clinique, en rémission endoscopique pour lesquels des procédures endoscopiques invasives peuvent être évitées (réf. 7-18).

Valeurs de calprotectine comprises entre 100 et 300 µg/g
Des niveaux de calprotectine fécale entre 100 et 300 µg/g peuvent indiquer la nécessité d'un contrôle plus rapproché dans la période suivante pour évaluer les tendances d'évolution de la maladie.

Valeurs de calprotectine supérieures à 300 µg/g
En cas de niveau de calprotectine fécale supérieur à 300 µg/g, la mesure doit être répétée, et si ces niveaux élevés sont confirmés, des procédures d'investigation supplémentaires doivent être mises en œuvre (réf. 7-18).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Comparaison des méthodes
Biais aux points de décision clinique :
50 µg/g : 10,6% (IC à 95% : -2,1-36,3%)
200 µg/g : -2,2% (IC à 95% : -4,9-4,7%)
100 µg/g : 2,1% (IC à 95% : -2,7-14,3%)
300 µg/g : -3,6% (IC à 95% : -7,0-2,3%)

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

Récupération : 102%-121%
Six extraits d'échantillons de selles ont été artificiellement enrichis à l'aide de calprotectine provenant de matériel d'étalonnage d'origine sérique humaine, à raison de 150 µg/g. L'extrait de ligne de base a été traité à l'aide de la quantité correspondante de tampon d'extraction. Les échantillons de ligne de base et enrichis ont été chacun mesurés en huit réplicats. Un seul lot de cassette test a été employé. Le tableau 11 rassemble les résultats obtenus.

Précision (répétabilité) : CV entre 15,3% et 19,1%

Fidélité intra-laboratoire : CV entre 18,0% et 23,0%
La répétabilité et la fidélité intra-laboratoire ont été déterminées selon la ligne directrice EP05-A2 du CLSI. Quatre échantillons d'extraits de selles, y compris des extraits dont les taux de calprotectine étaient proches de points de décision clinique, ont été testés pendant 10 jours, au moyen de deux dosages indépendants quotidiens, à raison de deux réplicats par dosage. Un seul lot de réactifs a été utilisé (tableau 12).

Fidélité inter-lots : CV entre 16,5% et 20,6%
La fidélité inter-lots a été déterminée selon la ligne directrice EP05-A2 du CLSI. Quatre échantillons d'extraits de selles, y compris des extraits dont les taux de calprotectine étaient proches de points de décision clinique, ont été mesurés à l'aide de trois lots de réactifs différents. Les mesures ont été réalisées pendant cinq jours au moyen d'un dosage quotidien, à raison de deux réplicats par dosage (tableau 13).

Limite de blanc (LoB) : 6,7 µg/g calprotectine.
La LoB a été établie sur la ligne directrice EP17-A du CLSI. La LoB a été déterminée selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Deux échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations en calprotectine de 58 et 62 µg/g ont été dilués dans du tampon d'extraction de manière à obtenir un total de six échantillons dont les concentrations allaient de 1 x LoB (6,3 µg/g) à 4 x LoB (25,1 µg/g). Les échantillons ont été mesurés à raison de 10 réplicats chacun, ce qui a permis d'obtenir 60 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test différents.
**Limite de quantification (LoQ) :**

- **LoQ inférieure :** ≥ 30 (28,2) µg/g calprotectine.
- **LoQ supérieure :** ≤ 1000 (1002) µg/g calprotectine.

La LoQ a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Afin de déterminer la LoQ inférieure, quatre échantillons d'extrait de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 19,1 à 37,3 µg/g ont été mesurés à raison de 10 réplicats chacun, ce qui a permis de constituer 40 valeurs (tableau 14). Afin de déterminer la LoQ supérieure, cinq échantillons d'extrait de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 628 à 1001,7 µg/g ont été mesurés à raison de 10 réplicats chacun, ce qui a permis de constituer 40 valeurs (tableau 15). L'étude a été réalisée avec deux lots de cassettes test différents. Les concentrations de référence en calprotectine d'extraits de selles ont été déterminées au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA. L'erreur relative totale a été calculée selon le modèle de la moyenne quadratique à partir d'estimations d'erreur de fidélité et de biais des mesures comparées aux valeurs de référence, pour chaque échantillon. La LoQ a été définie comme étant les plus petite et plus grande concentrations de l'échantillon, correspondant respectivement aux LoQ inférieure et LoQ supérieure, ayant satisfait au critère d'acceptation de 30% de l'erreur relative totale.

**Linéarité : 30-850 µg/g**

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

**Effet crochet à haute concentration**

Aucun effet crochet à haute concentration n'est observé pour des concentrations jusqu'à 1500 µg/g. Une diminution du signal moyen en dessous de la limite supérieure de la plage linéaire, 850 µg/g, a été estimée pour les concentrations en calprotectine dépassant 4000 µg/g. Aucune valeur inférieure au point de décision clinique le plus élevé, 300 µg/g, n'a été observée pour aucun des résultats de réplicats individuels pour tous les échantillons hauts testés. Sept à huit échantillons d'extrait de selles présentant des concentrations en calprotectine allant de 1361 µg/g à 13'817 µg/g ont été mesurés en cinq réplicats chacun sur trois lots de cassettes test différents.
USO PREVISTO
BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended è un test diagnostico in vitro per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane e viene impiegato come supporto alla valutazione dell'inflammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere utilizzati come supporto alla diagnosi differenziale tra malattie gastrointestinale organiche infiammatorie (malattia infiammatoria intestinale (IBD), nello specifico la malattia di morbo di Crohn o colite ulcerosa (CU)) e funzionali (sindrome dell'intestino irritabile (IBS)) (rif. 1-7), in pazienti con dolore addominale cronico, nonché come supporto al monitoraggio dell'IBD (rif. 7-18).
Per l'uso in laboratorio. Europa: per uso professionale.

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

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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kit di disposizioni di estrazione</th>
<th>Quantità</th>
<th>Codice</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Dispositivo CALEX® Cap</td>
<td>Sono disponibili confezioni da 50, 200 o 500 provette contenenti 5 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso</td>
<td>B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500</td>
</tr>
<tr>
<td>Smart-Prep</td>
<td>50 provetti, costituiti da spatole e camere di raccolta feci</td>
<td>B-CAL-RD</td>
</tr>
<tr>
<td>ScheBo® Quick-Prep™</td>
<td>50 provette costituite da provetta, cono e tappo dosatore, contenenti 1,3 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso</td>
<td>B-CAL-SD50</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

PRECAUZIONI
Precauzioni di sicurezza
- I controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all’antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) utilizzando le dovute precauzioni.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone Pratiche di Laboratorio (BPL).
- Reagenti: Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbe verificarsi irritazione.
- I reagenti e gli agenti chimici devono essere trattati come rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.
Precauzioni tecniche

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

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

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI
Per la procedura di estrazione è necessario meno di 1 g di campione di feci native. Raccogliere il campione di feci in provette semplici.

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

Trasporto dei campioni
I campioni di feci devono essere ricevuti per il processamento da parte del laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni di feci possono essere spediti a 2-8 °C e conservati e congelati direttamente dentro il dispositivo CALEX® Cap. Gli estratti possono subire al massimo 4 cicli di congelamento/ scongelamento. Prima della misurazione, lasciare equilibrare gli estratti a temperatura ambiente. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo procedura del test.

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

PROCEDURA DEL TEST
La procedura si compone di tre fasi distinte:

1. Estrazione dei campioni di feci:
L'estrazione è descritta nelle istruzioni per l'uso fornite con i rispettivi sistemi di estrazione.

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

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

3. Dosaggio a flusso laterale e lettura:
Due metodi alternativi possono essere caricati dalla rispettiva carta chip RFID: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Selezionare una delle carte chip RFID prima di iniziare gli esperimenti. Caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID sul Quantum Blue® Reader.


1.1 Metodo < B-CALE-RCC720> con timer interno
- Utilizzare la carta chip RFID verde.
- Caricare la cassette nell’apposito vano a scorrere per 10 minuti con l’estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu. Il supernatante può essere utilizzato senza ulteriore diluizione nel test a flusso laterale.

1.2 Metodo < B-CALE-RCC720> con timer interno
- Utilizzare la carta chip RFID verde.
- Caricare la cassette nell’apposito vano a scorrere per 10 minuti con l’estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu. Il supernatante può essere utilizzato senza ulteriore diluizione nel test a flusso laterale.
Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.

Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.

La scansione inizia automaticamente dopo 12 minuti (720 secondi).

Per i controlli basso / alto: Ripetere il punto 3.1 utilizzando 60 µL di controllo, invece del estratto di feci diluito.

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

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

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

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

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

**VALIDAZIONE DEI RISULTATI**

- Per un risultato valido, la banda di controllo (C) deve in ogni caso essere visibile (vedere figure 1A e 1B). Tale banda rappresenta unicamente un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la banda di rilevazione (T). Se la banda di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (figura 1A), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci è al di sotto del limite di rilevazione. Se la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 12 minuti d’incubazione (figura 1B), la concentrazione di calprotectin presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 12 minuti d’ incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l’intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 12 minuti d’incubazione, il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL extended deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

**STANDARDIZZAZIONE**

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

**LIMITAZIONI**

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL extended sono destinati alla determinazione di livelli di calprotectina solo in campioni di feci umane.
- I valori di calprotectina fecale sono intesi come supporto per la diagnosi nel distinguere malattie organiche da malattie funzionali e come supporto per il monitoraggio di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). I risultati devono essere sempre interpretati in abbinamento ad altri esami clinici e di laboratorio.
- Per il monitoraggio delle MICI si consiglia di eseguire più misure di calprotectina fecale ad intervalli massimi di...
I valori di calprotectina composti tra o uguali a 80 e 160 µg/g
I livelli intermedi di calprotectina fecale composti tra o uguali a 80 e 160 µg/g, detti anche livelli nella zona griglia, non sono direttamente indicativi di un’infiammazione attiva che richieda un controllo immediato con l’esecuzione di test invasivi. Tuttavia non si può escludere la presenza di infiammazione. Si raccomanda di rivalutare il livello della calprotectina dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio.

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

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

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

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

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

II. Monitoraggio della IBD

Soglie cliniche e valutazione
La determinazione della calprotectina fecale è una procedura affidabile e semplice a supporto del monitoraggio dei pazienti con IBD (rif. 7-18). La correlazione tra livelli di calprotectina e stato infiammatorio della mucosa intestinale del paziente, valutato tramite endoscopia, è stata stabilita da tre studi indipendenti che si sono avvalsi di test Calprotectina BÜHLMANN per la (tabella 9). Il valore diagnostico della calprotectina nel prevedere la remissione e la recidiva clinica, in base ai sintomi del paziente, agli indici di attività clinica, alla necessità non pianificata di incrementare la terapia, al ricovero o all’emergenza, è stato determinato in

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

Tabella 3

Valori di calprotectina inferiori a 80 µg/g
I valori di calprotectina fecale <80 µg/g non sono indicative di infiammazione nel tratto gastrointestinale. È probabile che i pazienti con livelli bassi di calprotectina non necessitano di procedure invasive per determinare la causa dell’infiammazione.
Lo studio sul confronto dei metodi è stato condotto secondo le istruzioni per l’uso con il test Quantum Blue®. La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state misurate nell’arco di cinque giorni, in un’unica sessione ogni giorno, con due ripetizioni per sessione (tabella 13).

Valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g
I livelli di calprotectina fecale inferiori a 100 µg/g possono indicare in modo affidabile i pazienti, a basso rischio di recidiva clinica, in remissione endoscopica nei quali si possono evitare le procedure endoscopiche invasive (rif. 7-18).

Valori di calprotectina nella range 100-300 µg/g
I livelli di calprotectina fecale nel range 100-300 µg/g possono indicare la necessità di controlli più ravvicinati nel periodo successivo per valutare l’andamento della malattia.

Valori di calprotectina superiori a 300 µg/g
In caso di livelli di calprotectina fecale superiori a 300 µg/g l’esame va ripetuto e, se l’aumento dei livelli è confermato, è necessario eseguire altri accertamenti (rif. 7-18).

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE
Confronto metodi
Scostamento ai valori decisionali clinici:
50 µg/g: 10,6% (95% CI: -2,1-36%)
200 µg/g: -2,2% (95% CI: -4,9-4,7%)
100 µg/g: 2,1% (95% CI: -2,7-14%)
300 µg/g: -3,6% (95% CI: -7,0-2,3%)
Lo studio sul confronto dei metodi è stato condotto secondo le linee guida CLSI EP09-A3. Centoottantasei (186) campioni clinici di estratti fecalessi sono stati misurati secondo le istruzioni per l’uso con il test Quantum Blue® fCAL extended e con BÜHLMANN fCAL® ELISA. Le misurazioni sono state eseguite nell’arco di tre giorni usando le cassette di test Quantum Blue® fCAL extended provenienti da tre lotti (figura 2).

Recupero: 102%-121%
Sei campioni di estratti fecalessi sono stati addizionati con una concentrazione di calprotectina pari a 150 µg/g di materiale calibratore estratto da siero umano. L’estratto basale è stato addizionato con una quantità adeguata di tampone di estrazione. I campioni basale e addizionati sono stati misurati in otto ripetizioni. Per le misure sono state utilizzate cassette di test provenienti da un unico lotto. I risultati sono riepilogati nella tabella 11.

Precisione (ripetibilità): 15,3-19,1% CV
Precisione intra-laboratorio: 18,0-23,0% CV
La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida CLSI EP05-A2. Quattro campioni di materiale fecale estratto, inclusi estratti con livelli di calprotectina prossimi a valori decisionali clinici, sono stati misurati nell’arco di dieci giorni in due sessioni indipendenti ogni giorno, con due ripetizioni per sessione. È stato utilizzato reagente proveniente da un unico lotto (tabella 12).

Precisione inter-lotto: 16,5-20,6% CV
La precisione inter-lotto è stata determinata secondo le linee guida CLSI EP05-A2. Quattro campioni di materiale fecale estratto, inclusi estratti con livelli di calprotectina prossimi a valori decisionali clinici, sono stati misurati usando reagenti provenienti da tre diversi lotti. Le misure sono state eseguite nell’arco di cinque giorni, in un’unica sessione ogni giorno, con due ripetizioni per sessione (tabella 13).

Limite del bianco (Limit of Blank, LoB): livello di calprotectina 6.7 µg/g.
Il LoB è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A usando un tampone di estrazione per ottenere 60 valori di bianco. Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti.

Limite di rilevabilità (Limit of Detection, LoD): livello di calprotectina 18 µg/g.
Il LoD è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Due campioni di estratti fecalessi con concentrazioni di calprotectina pari a 58 e 62 µg/g sono stati diluiti in tampone di estrazione per ottenere un totale di sei campioni con concentrazioni nell’intervallo tra 1 x LoB (6,3 µg/g) e 4 x LoB (2,1 µg/g). I risultati sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 60 valori. Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti.

Limite di quantificabilità (Limit of Quantification, LoQ)
LoQ inferiore: livello di calprotectina ≤30 (28,2) µg/g.
LoQ superiore: livello di calprotectina ≥1000 (1002) µg/g.
Il LoQ è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Per determinare il LoQ inferiore, quattro campioni di estratti fecalessi con concentrazioni di calprotectina nell’intervallo tra 19,1 e 37,3 µg/g sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 40 valori (tabella 14). Per determinare il LoQ superiore, cinque campioni di estratti fecalessi con concentrazioni di calprotectina nell’intervallo da 628 a 1001,7 µg/g sono stati misurati in dieci ripetizioni per ottenere 40 valori (tabella 15). Lo studio è stato condotto con cassette di test provenienti da due diversi lotti. I valori di riferimento del livello di calprotectina nei campioni di estratti fecalessi sono stati determinati mediante BÜHLMANN fCAL® ELISA. Per ciascun campione, l’errore relativo totale è stato calcolato usando il modello RMS da stime di precisione e lo scostamento dai valori di riferimento. Il LoQ è stato definito come il valore di concentrazione dei campioni rispettivamente minimo e massimo per LoQ inferiore e LoQ superiore, che soddisfano il criterio di accettazione di errore totale relativo del 30%.

Linearità: 30-850 µg/g
L’intervallo di linearità del campionamento con Quantum Blue® fCAL extended è stato determinato secondo le linee guida CLSI EP06-A. Due campioni di estratti fecalessi con concentrazione di calprotectina bassa ed elevata sono stati combinati in miscele per ottenere un totale di 14 livelli di concentrazione su una gamma che copriva ed eccedeva l’intervallo previsto di misura. Le miscele sono state campionate in dieci ripetizioni su cassette di test provenienti da due diversi lotti. I valori medi di concentrazione di calprotectina per ciascuna miscela sono stati messi in grafico verso i fattori di diluizione usati per ottenere la...
miscela. Al grafico sono stati applicati fit lineare e polinomiale di secondo e terzo ordine. Laddove i coefficienti del fit polinomiale di secondo e terzo ordine sono stati determinati significativi, l'intervallo di linearità è stato definito come l'intervallo di concentrazioni di calprotectina in cui la deviazione dal fit lineare non è superiore a un valore di concentrazione relativo del 20% o pari a 20 μg/g (figura 3).

**Effetto gancio a dose elevata**
Non è stato osservato un effetto gancio ad alta dose per le concentrazioni di calprotectina fino a 1500 μg/g. Una riduzione del segnale medio sotto al limite superiore dell'intervallo di linearità di 850 μg/g è stata stimata per concentrazioni di calprotectina superiori a 4000 μg/g. Nessun valore inferiore al punto di decisione clinica più elevato di 300 μg/g è stato osservato per ciascuno dei risultati singoli in replicato per tutti gli alti campioni testati. Da sette a otto campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina nell'intervallo da 1361 μg/g a 13'817 μg/g sono stati misurati in cinque ripetizioni su cassette di test provenienti da tre diversi lotti.
INDICACIONES DE USO
EL ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended es un ensayo diagnóstico in vitro para la determinación cuantitativa de la calprotectina en muestras de heces humanas al efecto de facilitar la valoración de la inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo pueden utilizarse en el diagnóstico para distinguir entre las enfermedades inflamatorias orgánicas del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, CU) y las enfermedades funcionales (síndrome del colon irritable, SII) (ref. 1-7), en los pacientes con dolor abdominal crónico y para facilitar el control de la EII (ref. 7-18).
Para uso en laboratorio.
Europa: para uso profesional.

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

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

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

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

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS
Todos los componentes del equipo permanecen estables a una temperatura entre 2 y 8 °C, hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIO PEDIDO

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

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

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
- Vórtex para la extracción de heces
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 µL, 100-1000 µL y 250-2500 µL
- Centrífuga
- Tubos de 5 mL desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de la dilución de los extractos
- Cronómetro (optativo)
- Lector Quantum Blue® disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS)
- Pañuelos suaves o papel secante

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad
- Los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque ha dado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tomando las precauciones adecuadas.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) tomando las precauciones apropiadas.
- **Reactivos**: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con agua abundante; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- Los reactivos y productos químicos deben tratarse como residuos peligrosos conforme a las directrices normativas nacionales de seguridad sobre riesgos biológicos.

**Precauciones técnicas**

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

**Procedimiento de ensayo**

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El Quantum Blue® Reader debe ponerse en funcionamiento y programarse para el ensayo Quantum Blue® fCAL extended. Cargue el método de prueba utilizando la tarjeta chip RFID (B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720), antes de iniciar el ensayo (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- Utilicen la tarjeta con chip RFID para cambiar los parámetros de prueba específicos de lote.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- Es importante centrífugar los extractos con Smart-Prep o ScheBo® Quick-PrepTM antes de la conservación (5 minutos a 3.000 x g). Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo.

**Obtención y conservación de las muestras**

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

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

**Transporte de las muestras**

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces para su procesamiento en un plazo de 3 días desde su recolección. Las muestras de heces pueden enviarse a temperatura ambiente o refrigeradas.

**Conservación de las muestras**

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

**Conservación de los extractos**

Los extractos de calprotectina fecal en los extractos obtenidos con CALEX® Cap son estables a temperatura ambiente durante 3 días y a 2-8 °C hasta 6 días. Para una conservación más prolongada, congelar los extractos a –20 °C. Los extractos congelados son estables durante un período de hasta 23 meses.

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

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

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO**

El procedimiento del ensayo consiste en tres pasos:

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

2. **Procesamiento de las muestras:**
   - **Smart-Prep o ScheBo® Quick Prep™**: Después de la extracción, deje que el extracto de materia fecal se asiente durante 10 minutos. Se diluye el sobrenadante 1:10 con tampón de extracción (por ejemplo, 50 µL de extracto y 450 µL de tampón de extracción) y se mezcla bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el pasos (paso no. 3).

   - **Dispositivo CALEX® Cap**: Después de la extracción, dejar que el extracto de heces repose durante 10 minutos con el tapón blanco del dispositivo hacia abajo. Desenrosque el tapón de color azul. El sobrenadante se puede utilizar sin dilución adicional en el ensayo de flujo lateral.

3. **Procedimiento de ensayo de flujo lateral y lectura de los resultados:**
   Dos métodos alternativos se pueden cargar desde la tarjeta chip RFID respectiva. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Seleccione una de las tarjetas con chip RFID.
antes de comenzar los experimentos. Cargue el método de prueba de la tarjeta de chip RFID en el Quantum Blue® Reader.

3.1. Método <B-CALE-RCC720> con cronómetro interno
- Use la tarjeta chip RFID verde.
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Añada 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El escaneo se inicia automáticamente pasados 12 minutos (720 segundos).
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.1 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.

3.2 Método <B-CALE-RCC> sin cronómetro interno
- Use la tarjeta chip RFID blanca.
- Añada 60 µL de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 12 minutos +/- 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el soporte del casete de prueba del lector Quantum Blue® Reader.
- Inicie el barrido del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio inmediatamente.
- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.

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

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

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

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

**LIMITACIONES**

- Los reactivos suministrados con el kit Quantum Blue® fCAL extended sirven únicamente para la determinación de niveles de calprotectina en muestras de heces humanas.
- Los valores de calprotectina fecal son una ayuda para facilitar el diagnóstico distinguiendo entre enfermedad orgánica y enfermedad funcional y para facilitar el control de la EII. Los resultados deben interpretarse siempre en combinación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Para el control de la EII, se ha sugerido que el uso de múltiples determinaciones de calprotectina fecal obtenidas a intervalos de hasta 4 semanas proporciona la mejor exactitud diagnóstica en la predicción de una recaída clínica de los pacientes (ref. 19-20).
- En casos raros, cuando los niveles de calprotectina son extremadamente altos (por encima de 4000 µg/g; esto es, en casos de CU aguda), el sistema de análisis puede adolecer de un efecto gancho de dosis altas, lo que puede dar lugar a valores por debajo del límite superior del rango lineal esperado de 850 µg/g. Se aconseja prestar especial atención a los resultados por encima de 300 µg/g cuando vayan acompañados por síntomas intensos, lo que podría indicar una inflamación aguda. En ese caso, se recomienda repetir oportunamente el análisis de una muestra de heces del paciente en un laboratorio para su confirmación.
- Los pacientes que tomen AINE de manera habitual pueden tener niveles de calprotectina fecal elevados.
- Los resultados pueden no ser clínicamente aplicables a niños menores de 4 años de edad con ligeros aumentos de la concentración de calprotectina fecal (ref. 21-24).

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

I. **Diferenciar entre las enfermedades gastrointestinales orgánicas de las funcionales**

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

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

**Umbrales clínicos**

Los datos siguientes se establecieron con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL). Se analizaron los resultados de 58 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con SII y 131 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con EII, de un estudio clínico internacional, para obtener los valores mostrados en la tabla 3.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Concentración de calprotectina</th>
<th>Interpretación</th>
<th>Seguimiento</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
<td>Normal</td>
<td>Ninguno</td>
</tr>
<tr>
<td>80 - 160 µg/g</td>
<td>Zona gris/valor límite</td>
<td>Seguimiento en un plazo de 4 a 6 semanas</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt; 160 µg/g</td>
<td>Elevado</td>
<td>Repetir según sea necesario</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Valores de calprotectina por debajo de 80 µg/g**
Unos valores de calprotectina fecal <80 µg/g no son indicativos de inflamación gastrointestinal. Los pacientes con bajas concentraciones de calprotectina probablemente no necesiten procedimientos invasivos para determinar la causa de la inflamación.

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

**Valores de calprotectina superiores a 160 µg/g**
Los valores de calprotectina fecal >160 µg/g son indicativos de infiltrado neutrófilo en el tubo gastrointestinal y pueden indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria activa. Se recomienda llevar a cabo los procedimientos de investigación especializados oportunos para alcanzar un diagnóstico clínico global.

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

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

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

La combinación óptima de cortes para estos grupos de pacientes se estableció en 80 µg/g y 160 µg/g de calprotectina mediante el análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC). Esta combinación es ligeramente más restrictiva que la combinación de un corte inferior más sensible de 50 µg/g, con una especificidad ligeramente inferior, y un corte superior de 200 µg/g, con una sensibilidad ligeramente inferior (tablas 7 y 8).

II. Control de la EII
Umbrales clínicos y evaluación
La determinación de la calprotectina fecal es un método fiable y sencillo para facilitar el control de los pacientes con EII (ref. 7-18).

Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios independientes determinaron la correlación entre los valores de calprotectina y el estado inflamatorio de la mucosa intestinal del paciente basado en las evaluaciones endoscópicas (tabla 9). Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios determinaron el valor diagnóstico de la calprotectina para pronosticar la remisión y las recaídas clínicas, sobre la base de los síntomas, los índices de actividad clínica, la necesidad no programada de aumento del tratamiento, la hospitalización y las urgencias (tabla 10).

Las categorías de resultados mostradas son recomendaciones y su determinación se basa en el conocimiento condensado de los valores de corte y los estudios de eficacia diagnóstica publicados. Se recomienda la determinación de los umbrales individuales de cada paciente por el médico sobre la base del valor de referencia de calprotectina del paciente durante la remisión de la enfermedad.

Valores de calprotectina por debajo de 100 µg/g
Unos valores de calprotectina fecal por debajo de 100 µg/g pueden indicar de forma fiable que el paciente presenta bajo riesgo de recaída clínica y se encuentra en remisión endoscópica, por lo que pueden evitarse los procedimientos endoscópicos invasivos (ref. 7-18).

Valores de calprotectina de entre 100 y 300 µg/g
Los valores de calprotectina fecal entre 100 y 300 µg/g indican la necesidad de un control más atento en el período sucesivo para evaluar la evolución de la enfermedad.

Valores de calprotectina superiores a 300 µg/g
Si se obtienen valores de calprotectina fecal superiores a 300 µg/g, se debe repetir el ensayo y, en caso de confirmarse el resultado, realizar pruebas ulteriores (ref. 7-18).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO
Comparación de métodos
Sesgo en los puntos de decisión clínica:
50 µg/g: 10,6% (IC 95%: -2,1-36%)
200 µg/g: -2,2% (IC 95%: -4,9-4,7%)
100 µg/g: 2,1% (IC 95%: -2,7-14%)
300 µg/g: -3,6% (IC 95%: -7,0-2,3%)

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

Recuperación: 102%-121%
Se adicionaron con 150 µg/g de calprotectina en material calibrador de origen sérico humano seis extractos de muestras de heces. El extracto basal se adicionó con la cantidad correspondiente de tampón de extracción. Las muestras basales y adicionadas se midieron en ocho réplicas. Se utilizó un lote de casete de prueba. Los resultados se resumen en la tabla 11.

Precisión (repetibilidad): 15,3-19,1% CV
Precisión intralaboratorio: 18,0-23,0% CV
La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se han determinado de conformidad con la directriz CLSI EP05-A2. Se midieron cuatro muestras de heces extraídas, incluyendo extractos con niveles de calprotectina próximos a puntos de decisión clínica, a lo largo de diez días, en dos tandas independientes cada día, con dos réplicas por tanda. Se utilizó un único lote de reactivo. Los resultados se resumen en la tabla 12.

Precisión interlote: 16,5-20,6% CV
La precisión interlote se ha determinado de conformidad con la directriz CLSI EP05-A2. Se midieron cuatro muestras de heces extraídas, incluyendo extractos con niveles de calprotectina próximos a puntos de decisión clínica, utilizando tres lotes de reactivo diferentes. Las determinaciones se realizaron a lo largo de cinco días, en una única tanda al día, con dos réplicas por tanda (tabla 13).

Límite para el blanco (LoB): 6,7 µg/g de calprotectina.
El LoB se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A utilizando tampón de extracción para obtener 60 valores de blanco. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba diferentes.

Límite de detección (LoD): 18 µg/g de calprotectina.
El LoD se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Se diluyeron en tampón de extracción dos muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina de 58 y 62 µg/g para obtener un total de seis muestras con concentraciones de entre una vez el LoB (6,3 µg/g) y cuatro veces el LoD (25,1 µg/g). Las muestras se midieron en diez réplicas para obtener 60 valores. El estudio se realizó con dos lotes de casete de prueba diferentes.
Límite de cuantificación (LoQ):
LoQ inferior: ≤30 (28,2) µg/g de calprotectina.
LoQ superior: ≥1000 (1002) µg/g de calprotectina.

El LoQ se ha establecido de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Para determinar el LoQ inferior, se midieron cuatro muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina entre 19,1 y 37,3 µg/g en diez réplicas para obtener 40 valores (tabla 12). Para determinar el LoQ superior, se midieron cinco muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina entre 628 y 1001,7 µg/g en diez réplicas para obtener 40 valores (tabla 13). El estudio se realizó con dos lotes de cassetes de prueba diferentes. Se determinaron valores de calprotectina de referencia de las muestras de heces extraídas con el ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA. El error total relativo se calculó utilizando el modelo RMS a partir de cuatro estimaciones de precisión y sesgo con respecto a los valores de referencia para cada muestra. El LoQ se definió como la concentración de muestra más baja y más alta, para el LoQ inferior y el LoQ superior respectivamente, que cumplía el criterio de aceptación de un 30 % de error total relativo.

Linealidad: 30-850 µg/g

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

Efecto gancho de alta dosis

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

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended é um teste de diagnóstico in vitro para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas, para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DII; mais especificamente doença de Crohn ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7) em pacientes com dor abdominal crônica e também como auxiliar no monitoramento das DII (ref. 7-18).

Somente para uso laboratorial.
Europa: Para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antígeno da calprotectina mediante um imunoensaio tipo sanduíche. 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 quando da adição do extrato diluído da amostra de fezes.

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

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kits de dispositivos de extração</th>
<th>Quantidade</th>
<th>Código</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Dispositivo CALEX® Cap</td>
<td>Pacotes de 50, 200 ou 500 tubos disponíveis, cada um preenchido com 5 mL de tampão de extração. Pronto para utilização</td>
<td>B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500</td>
</tr>
<tr>
<td>Smart-Prep</td>
<td>50 tubos, consistindo de espátulas e tampas</td>
<td>B-CAL-RD</td>
</tr>
<tr>
<td>Schebo® Quick-Prep™</td>
<td>50 tubos incluindo tubo, cone e ponta dosadora, cada um preenchido com 1,3 mL de tampão de extração Pronto para utilização</td>
<td>B-CAL-SO50</td>
</tr>
</tbody>
</table>

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

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

Release date: 2019-12-20
Precauções técnicas
Componentes do kit
- Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18-28 °C) antes do início do ensaio.
- Misture bem (vortex) os reagentes antes de usar.
- Componentes não podem ser utilizados após data de expiração impressa nos rótulos.
- Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Os cassetes dos testes não podem ser re-utilizados.

Procedimento do teste
- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O Quantum Blue® Reader tem de ser ligado e programado para o ensaio de Quantum Blue® fCAL extended. Antes de iniciar o ensaio, carregue o método do ensaio usando o cartão com chip RFID (B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720) (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- Utilize o cartão RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de pacientes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados errôneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente a amostra no tubo de extração.
- É importante centrifugar os extratos com Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3000 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo.

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

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

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

Armazenamento do extratos
Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o CALEX® Cap permanecem estáveis à temperatura ambiente por 3 dias e, na faixa de temperatura de 2–8 °C, por até 6 dias. Para armazenar por períodos de tempo mais longos, congele os extratos a -20 °C. Os extratos congelados se mantêm estáveis por um período de até 23 meses.

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

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

PROCEDIMENTO DO ENSAIO
O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

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

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

3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:
   Dois métodos alternativos podem ser carregados a partir do respectivo cartão chip RFID. B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720. Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar os experimentos. Carregue o método de teste do cartão com chip RFID no Quantum Blue® Reader.
3.1. Método <B-CALE-RCC720> com cronômetro interno

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

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

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

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

CONTROLE DE QUALIDADE

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

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

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

ESTANDARDIZAÇÃO

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

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL extended destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais humanas.
- Os valores da calprotectina fecal servem para auxiliar no diagnóstico e facilitar a distinção entre doenças orgânicas e doenças funcionais, e para auxiliar no monitoramento de DII (doenças inflamatórias intestinais). Os resultados devem sempre ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais.
- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam a melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 19-20).
• Em casos raros, quando os níveis de calprotectina são extremamente altos (acima de 4000 µg/g, i.e., em colite ulcerativa aguda), o sistema de teste pode tender a apresentar um efeito gancho com dose elevada, o que pode resultar em valores abaixo do limite superior de 850 µg/g esperado para a faixa linear. Aconselha-se a prestar particular atenção a resultados acima de 300 µg/g quando acompanhados de sintomas marcantes, o que pode indicar inflamação aguda. Neste caso, recomenda-se repetir oportunamente o teste com uma amostra de fezes do paciente em um laboratório, a título de confirmação.

• Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroïdes (AINEs) regularmente podem apresentar níveis elevados de calprotectina fecal.

• Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 21-24).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

I. Como distinguir doenças orgânicas de doenças gastrointestinais funcionais

A determinação dos níveis de calprotectina fecal pode ser usada como um método auxiliar confiável e simples para distinguir as doenças gastrointestinais orgânicas das funcionais (ref. 1-7). As categorias de resultados baseiam-se nos dados de estudos clínicos realizados pela BÜHLMANN e são recomendações da BÜHLMANN. Todos os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos sintomas clínicos do paciente, seu histórico médico e outros resultados clínicos e laboratoriais.

Limiar clínico

Os dados a seguir foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN (código de pedido: EK-CAL). Os resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DIs (provenientes de um estudo clínico internacional) foram analisadas para se obter os valores descritos na tabela 3.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Concentração de calprotectina</th>
<th>Interpretação</th>
<th>Acompanhamento</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
<td>Normal</td>
<td>Nenhum</td>
</tr>
<tr>
<td>80 – 160 µg/g</td>
<td>Zona cínzenta/limítrofe</td>
<td>Retorno dentro de 4-6 semanas</td>
</tr>
<tr>
<td>&gt; 160 µg/g</td>
<td>Elevada</td>
<td>Repetir conforme necessário</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* Tabela 3

Valores de calprotectina abaixo de 80 µg/g

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

Valores de calprotectina entre 80 e 160 µg/g

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

Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g

Valores de calprotectina acima de 160 µg/g são indicativos de infiltrado de neutrófilos no trato gastrointestinal e, portanto, podem significar a presença de doença inflamatória ativa. Sugere-se a execução de procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas, para se obter um diagnóstico clínico completo.

Avaliação clínica

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

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

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

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

II. Monitoramento de DII

Limiares e avaliação clínica

A determinação da calprotectina fecal também é uma forma confiável e simples de auxiliar no monitoramento de pacientes com DII (ref. 7-18).

A correlação entre os níveis de calprotectina e o status inflamatório da mucosa intestinal do paciente, de acordo com avaliações endoscópicas, foi determinada em três estudos independentes usando testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 9).

Determinou-se o valor do diagnóstico da calprotectina na predição da remissão e recidiva clínicas em três estudos usando-se testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 10), de acordo com os sintomas dos pacientes, os índices de atividade clínica, e a necessidade não planejada de intensificação de terapia, hospitalização ou emergência.
As categorias de resultados mostradas são recomendações e sua determinação se baseia no conhecimento condensado de valores de corte e estudos de desempenho clínico publicados. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limiares individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença.

**Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g**
Níveis de calprotectina fecal abaixo de 100 µg/g podem indicar confiavelmente pacientes com baixo risco de recidiva clínica que estão em remissão endoscópica e para os quais procedimentos endoscópicos invasivos podem ser evitados (ref. 7-18).

**Precisão intralotes**
A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI. Quatro amostras de fezes extraídas, incluindo extratos com níveis de calprotectina próximos dos pontos de decisão clínica, foram medidas usando-se três lotes diferentes de reagentes. As medições foram realizadas por cinco dias em uma única corrida por dia, com duas replicações por corrida (tabela 13).

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

**Precisão (repetibilidade): 15,3-19,1% do CV**

**Recuperação: 102-121%**
Seis extratos de amostras de fezes foram fortificados com 150 µg/g de calprotectina em material de origem de soro humano do calibrador. O extrato de referência foi fortificado com a quantidade correspondente do tampão de recuperação. As amostras de referência e fortificadas foram medidas em oito replicações. Um único lote de cassette de testes foi usado. Os resultados estão resumidos na tabela 11.

**Precisão (repetibilidade): 15,3-19,1% do CV**
**Precisão intralaboratorial: 18,0-23,0% do CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI. Quatro amostras de fezes extraídas, incluindo extratos com níveis de calprotectina próximos dos pontos de decisão clínica, foram medidas por dez dias em duas corridas independentes por dia, com duas replicações por corrida. Um único lote de reagentes foi usado (tabela 12).

**Precisão intralotes: 16,5-20,6% do CV**
A precisão intralotes foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A2 do CLSI. Quatro amostras de fezes extraídas, incluindo extratos com níveis de calprotectina próximos dos pontos de decisão clínica, foram medidas usando-se três lotes diferentes de reagentes. As medições foram realizadas por cinco dias em uma única corrida por dia, com duas replicações por corrida (tabela 13).

**Limite do branco (LoB): 6,7 µg/g de calprotectina.**
O LoB foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI, empregando-se um tampão de extração para obter 60 valores de branco. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes.

**Limite de detecção (LoD): 18 µg/g de calprotectina.**
O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Duas amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina de 58 e 62 µg/g, foram diluídas em um tampão de extração para gerar um total de seis amostras com concentrações variando entre 1 x LoD (6,3 µg/g) e 4 x LoB (25,1 µg/g). As amostras foram medidas em dez replicações para se obter 60 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes.

**Valores de calprotectina acima de 300 µg/g**
Níveis de calprotectina fecal acima de 300 µg/g requerem a repetição do teste e, se confirmados os níveis elevados, indicam a necessidade de uma investigação adicional de investigação (ref. 7-18).

**Características de desempenho**

**Comparação de métodos**

**Desvio nos pontos de decisão clínica:**

- 50 µg/g: 10,6% (ic de 95%: -2,1-36%)
- 200 µg/g: -2,2% (ic de 95%: -4,9-4, %)
- 100 µg/g: 2,1% (ic de 95%: -2,7-14%)
- 300 µg/g: -3,6% (ic de 95%: -7,0-2,3%)

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

**Recuperação:**
102-121%

Seis extratos de amostras de fezes foram fortificados com 150 µg/g de calprotectina em material de origem de soro humano do calibrador. O extrato de referência foi fortificado com a quantidade correspondente do tampão de recuperação. As amostras de referência e fortificadas foram medidas em oito replicações. Um único lote de cassette de testes foi usado. Os resultados estão resumidos na tabela 11.

**Linearidade:**
30-850 µg/g

A faixa linear do teste ampliado fCAL Quantum Blue® foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras extraídas com concentrações altas e baixas de calprotectina foram misturados para se obter 14 níveis de concentração, abrangendo e ultrapassando a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em dez replicações com dois lotes de cassetes de teste diferentes. Os valores médios de concentração de calprotectina de cada amostra foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio para os valores de referência de cada amostra. O LoQ foi definido como a mais baixa e a mais alta concentração das amostras para o LoQ inferior e superior, respectivamente – que atenderam ao critério de aceitação de 30% do erro relativo total.

**Características de desempenho publicadas**

- Linha linear dos pontos de decisão clínica:
- 1000 (1002) µg/g de calprotectina.
- LoQ inferior ≤30 (28,2) µg/g de calprotectina.
- LoQ superior ≥1000 (1002) µg/g de calprotectina.

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Para determinar o LoQ inferior, quatro amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina variando entre 19,1 e 37,3 µg/g, foram medidas em dez replicações, para gerar 40 valores (tabela 14). Para determinar o LoQ superior, cinco amostras de fezes extraídas, com concentrações de calprotectina variando entre 628 e 1001,7 µg/g, foram medidas em dez replicações, para gerar 40 valores (tabela 15). O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. Os valores de referência de calprotectina para amostras de fezes extraídas foram determinados com o fCAL® ELISA da BÜHLMANN. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio para os valores de referência de amostras. O LoQ foi definido como a média de 30% do erro relativo total.
Efeito gancho com dose elevada

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

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

#### Test results

![Figure 1A](image1.png) ![Figure 1B](image2.png) ![Figure 1C](image3.png) ![Figure 1D](image4.png)

#### Clinical study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

<table>
<thead>
<tr>
<th>Final diagnosis</th>
<th>Distribution of patients' results in numbers (percent) within BÜHLMANN fCAL® ELISA diagnostic ranges.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>&lt; 80 µg/g</td>
</tr>
<tr>
<td>IBD</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>IBS</td>
<td>94 (72.3%)</td>
</tr>
<tr>
<td>Other GI</td>
<td>48 (66.7%)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Note: CI – confidence interval
PPV – positive predictive value
NPV – negative predictive value
ROC AUC – area under receiver operating characteristic curve

#### Clinical studies – IBD monitoring

<table>
<thead>
<tr>
<th>Study</th>
<th>Patient number and demographics</th>
<th>Cut-off</th>
<th>NPV</th>
<th>PPV</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Study 1</td>
<td>Spain (ref. 9)</td>
<td>89 (CD)</td>
<td>272 µg/g</td>
<td>98%</td>
</tr>
<tr>
<td>Study 2</td>
<td>Spain (ref. 10)</td>
<td>123 (UC)</td>
<td>280 µg/g</td>
<td>86%</td>
</tr>
<tr>
<td>Study 3</td>
<td>Australia, New Zealand (ref. 11)</td>
<td>99 (CD)</td>
<td>100 µg/g</td>
<td>91%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Note: CD = Crohn's disease patients
UC = Ulcerative Colitis patients

#### Tables

<table>
<thead>
<tr>
<th>Table 4</th>
<th>IBD vs. non-IBD</th>
<th>Clinical decision point</th>
<th>80 µg/g</th>
<th>160 µg/g</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Sensitivity (95% CI)</td>
<td>93.3% (87.7%, 96.9%)</td>
<td>84.4% (77.2%, 90.1%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Specificity (95% CI)</td>
<td>70.3% (63.5%, 76.5%)</td>
<td>83.7% (77.8%, 88.5%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>PPV (95% CI)</td>
<td>67.7% (60.5%, 74.4%)</td>
<td>77.6% (69.9%, 84.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NPV (95% CI)</td>
<td>94.0% (89.0%, 97.2%)</td>
<td>88.9% (83.6%, 93.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ROC AUC (95% CI)</td>
<td>0.923 (0.893, 0.953)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Table 5</th>
<th>IBD vs. IBS</th>
<th>Clinical decision point</th>
<th>80 µg/g</th>
<th>160 µg/g</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Sensitivity (95% CI)</td>
<td>93.3% (87.7%, 96.9%)</td>
<td>84.4% (77.2%, 90.1%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Specificity (95% CI)</td>
<td>72.3% (63.8%, 79.8%)</td>
<td>85.4% (78.1%, 91.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>PPV (95% CI)</td>
<td>77.8% (70.6%, 83.9%)</td>
<td>85.7% (78.6%, 91.2%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NPV (95% CI)</td>
<td>91.3% (84.1%, 95.9%)</td>
<td>84.1% (76.7%, 89.9%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ROC AUC (95% CI)</td>
<td>0.933 (0.902, 0.963)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Table 6</th>
<th>IBD vs. non-IBD</th>
<th>Clinical decision point</th>
<th>50 µg/g</th>
<th>200 µg/g</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Sensitivity (95% CI)</td>
<td>96.3% (91.6%, 98.8%)</td>
<td>80.7% (73.1%, 87.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Specificity (95% CI)</td>
<td>59.9% (52.8%, 66.7%)</td>
<td>87.1% (81.7%, 91.4%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>PPV (95% CI)</td>
<td>61.6% (54.7%, 68.2%)</td>
<td>80.7% (73.1%, 87.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NPV (95% CI)</td>
<td>96.0% (91.0%, 98.7%)</td>
<td>87.1% (81.7%, 91.4%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Table 8</th>
<th>IBD vs. IBS</th>
<th>Clinical decision point</th>
<th>50 µg/g</th>
<th>200 µg/g</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Sensitivity (95% CI)</td>
<td>96.3% (91.6%, 98.8%)</td>
<td>80.7% (73.1%, 87.0%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Specificity (95% CI)</td>
<td>59.2% (50.3%, 67.8%)</td>
<td>90.0% (83.5%, 94.6%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>PPV (95% CI)</td>
<td>71.0% (63.9%, 77.5%)</td>
<td>89.3% (82.5%, 94.2%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NPV (95% CI)</td>
<td>93.9% (86.3%, 98.0%)</td>
<td>81.8% (74.5%, 87.8%)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

#### Notes

1. Study 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range
2. CD = Crohn’s disease patients
3. UC = Ulcerative Colitis patients

---

**Release date:** 2019-12-20

38/42 Quantum Blue® fCAL extended
APPENDIX I

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

Recovery

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

Within-laboratory precision

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

Inter-lot precision

<table>
<thead>
<tr>
<th>Mean Conc. [µg/g]</th>
<th>Inter-lot precision CV [%]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>49.2</td>
<td>16.5</td>
</tr>
<tr>
<td>112.2</td>
<td>17.0</td>
</tr>
<tr>
<td>278.4</td>
<td>20.1</td>
</tr>
<tr>
<td>682.1</td>
<td>20.6</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Limit of Quantification – Upper LoQ

<table>
<thead>
<tr>
<th>Lower LoQ</th>
<th>Reference value (R) [µg/g]</th>
<th>Mean value obtained (O) [µg/g]</th>
<th>Bias [µg/g] (R-O)</th>
<th>Precision [% CV]</th>
<th>Total Error [%]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Lot M0527</td>
<td>1001.7</td>
<td>752.6</td>
<td>-249.1</td>
<td>18.4</td>
<td>28.4</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>746.0</td>
<td>706.9</td>
<td>-39.1</td>
<td>16.2</td>
<td>16.2</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>678.6</td>
<td>704.2</td>
<td>25.6</td>
<td>14.0</td>
<td>15.1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>628.0</td>
<td>668.4</td>
<td>40.4</td>
<td>21.3</td>
<td>23.5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Lower LoQ</th>
<th>Reference value (R) [µg/g]</th>
<th>Mean value obtained (O) [µg/g]</th>
<th>Bias [µg/g] (R-O)</th>
<th>Precision [% CV]</th>
<th>Total Error [%]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Lot M2128</td>
<td>1001.7</td>
<td>783.0</td>
<td>-218.7</td>
<td>22.6</td>
<td>28.1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>746.0</td>
<td>670.4</td>
<td>-75.6</td>
<td>13.9</td>
<td>16.1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>678.6</td>
<td>629.9</td>
<td>-48.7</td>
<td>17.2</td>
<td>17.5</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>628.0</td>
<td>636.8</td>
<td>8.8</td>
<td>20.9</td>
<td>21.1</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Linearity

<table>
<thead>
<tr>
<th>Conc (µg/L)</th>
<th>Mean (µg/L)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Linear fit</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Method comparison

Figure 2

Figure 3
REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

APPENDIX III

INCIDENT REPORTING IN EU MEMBER STATES

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

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

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

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

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

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

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

NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE

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

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.
## APPENDIX IV
### SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

<table>
<thead>
<tr>
<th>Symbol</th>
<th>Explanation</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Use by</td>
<td>Verwendbar bis</td>
</tr>
<tr>
<td>Utiliser jusqu’au</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Utilizzare entro</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Fecha de caducidad</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Validade até</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Catalogue number</td>
<td>Bestellnummer</td>
</tr>
<tr>
<td>Référence du catalogue</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Numero di catalogo</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Número de catálogo</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Test cassette</td>
<td>Test Kassette</td>
</tr>
<tr>
<td>Cassette de test</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Cassetta di rilevazione</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Casetes de prueba</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Cassetes do teste</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Batch code</td>
<td>Chargenbezeichnung</td>
</tr>
<tr>
<td>No. del lotto</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No. de lote</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No. do lote</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Extraction buffer</td>
<td>Extraktionspuffer</td>
</tr>
<tr>
<td>Tampon d'extraction</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Tampone di estrazione</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Tampón de extracción</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Tampão de extração</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Control low</td>
<td>Kontrolle tief</td>
</tr>
<tr>
<td>Contrôle bas</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Controllo basso</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Control bajo</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Controle baixo</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Control high</td>
<td>Kontrolle hoch</td>
</tr>
<tr>
<td>Contrôle élevé</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Control alto</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Controle alto</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Consult instructions for use</td>
<td>Gebrauchsanweisung beachten</td>
</tr>
<tr>
<td>Consulter le mode d’emploi</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Consultare le istruzioni per l'uso</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Consulte las instrucciones de uso</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Consultar as intruções de uso</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Symbol**

- **REF**
- **LOT**
- **IVD**
- **∑**
- **TC**
- **BUF EX**
- **CONTROL L**
- **CONTROL H**
- **RCC**