



Quantum Blue[®] fCAL high range

Quantitative
Lateral Flow Assay

For *In Vitro* Diagnostic Use.

LF-CHR25 25 tests

Release date: 2020-10-30
Version A2

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative determination of calprotectin in human stool specimens intended as an aid in the assessment of intestinal mucosal inflammation. The 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.

Europe: for professional use.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

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

Table 1

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal extraction devices

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

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

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-100 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 test.
- Components must not be used after the expiration date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Test cassettes cannot be re-used.

Test procedure

- Read the instructions carefully prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Please note that there are two generations of readers: The Quantum Blue® Reader 2nd Generation with serial numbers between 1000 and 3000 (QB2) and Quantum Blue® Reader 3rd Generation with serial numbers above 3000 (QB3G).
- The QB2 must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL high range assay (<CHR_0> or <CHR_900>) before starting the test (see Quantum Blue® Reader manual).
- The QB3G must be switched on and programmed for the Quantum Blue® fCAL high range assay either by using the barcode card (B-CHR-BCC) or by selecting from the test menu (Fast Track Mode only). For more information please refer to the Quantum Blue® Reader manual.
- Use the red RFID chip card (QB2) / barcode card (QB3G) in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the extraction device.
- If not used directly, diluted samples should be stored at 2-8 °C and should be used within twelve hours.
- With BÜHLMANN Smart-Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE, STABILITY

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

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

Specimen transport

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

Specimen storage

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

Extract stability

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

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

Fecal calprotectin extracts obtained by manual weighing method, by BÜHLMANN Smart-Prep or by ScheBo® Quick-Prep™ 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:

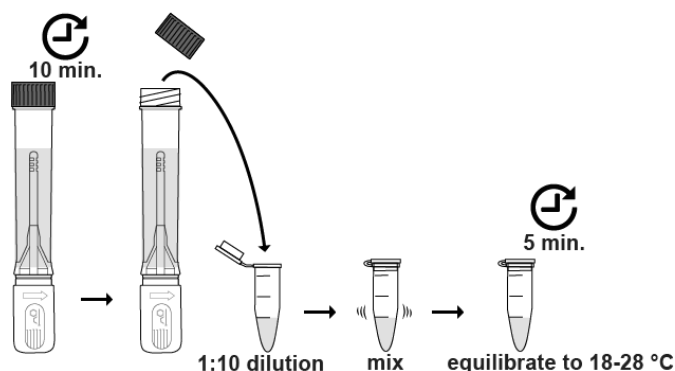
1. Extraction of stool samples

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 1:100 with extraction buffer (e.g. 20 µL extract and 1980 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step. 3).
- CALEX® Cap Device: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down. Unscrew the blue cap and dilute the supernatant 1:10 with extraction buffer (e.g. 50 µL extract and 450 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28 °C prior to proceeding to the next step (step. 3).

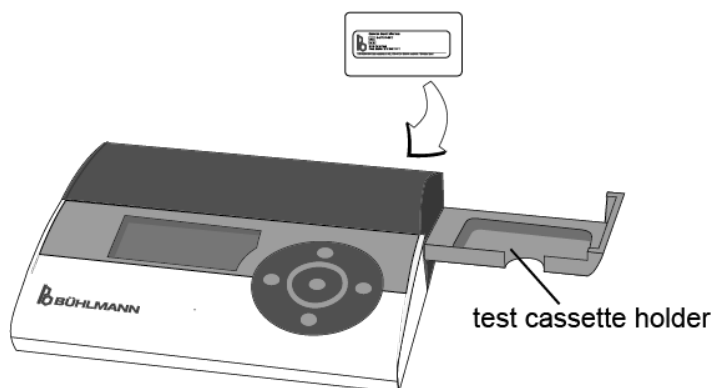


3. Lateral flow assay procedure and readout

QB2

There are two alternative methods available on the Quantum Blue® Reader: <CHR_900> (with internal timer) and <CHR_0> (without internal timer). Select one of these methods before starting the experiments.

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



QB3G

Two different modes of operation are available from BÜHLMANN to measure samples with the QB3G: Fast Track Mode or Fail Safe Mode. Before starting the assay, please inform yourself in which operation mode your reader is working.

The test method can be loaded from the barcode card (Fast Track and Fail Safe Mode) or, if previously used, selected from the test menu (Fast Track Mode only). Measurements can be performed with or without an internal timer in the Fast Track Mode. Measurements in the Fail Safe Mode can be performed with internal timer only. Follow the instructions provided on the screen of the QB3G. You may also refer to the QB3G Quick Guides for the Fast Track and Fail Safe Mode.



3.1 Method with internal timer

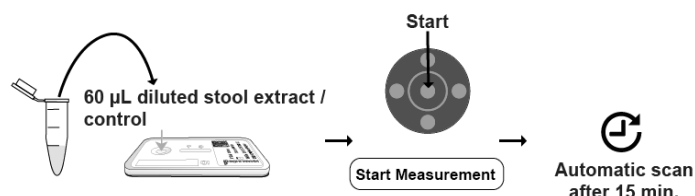
QB2: select method < CHR_900> and load the lot-specific parameters from the red RFID chip card.

QB3G (Fast Track Mode): when prompted by the QB3G to skip the incubation time, select "NO"

QB3G (Fail Safe Mode): default setting

- Unpack the test cassette. Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.

- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Close the test cassette holder and start the measurement by pressing the start button on the QB2 or the "Start Measurement" option on the QB3G.
- The scan starts automatically after 15 minutes (900 seconds).
- For low / high controls: Repeat step 3.1 using 60 µL of controls instead of diluted stool extract.



3.2 Method without internal timer

QB2: select method < CHR_0> and load the lot-specific parameters from the red RFID chip card.

QB3G (Fast Track Mode): when prompted by the QB3G to skip the incubation time, select "YES"

QB3G (Fail Safe Mode): option not available

- Unpack the test cassette. Add 60 µL of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Incubate for 15 minutes ± 1 minute (set a timer manually).
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Quantum Blue® Reader.
- Scan the test cassette with the Quantum Blue® Reader immediately by pressing the start button on the QB2 or the "Start Measurement" option on the QB3G.
- For low / high controls: Repeat step 3.2 using 60 µL of control instead of diluted stool extract.



Remark: Please refer to your Quantum Blue® Reader manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Quantum Blue® Readers, especially how to select test methods and how to load lot-specific parameters from the RFID chip card (QB2) / barcode card (QB3G) on the Quantum Blue® Reader. Ensure the correct insertion of the test cassette into the Quantum Blue® Reader, with the read-out window first (figure 1D).

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

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

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the control line (C) must be visible in any case (see figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for the interpretation of the test line (T). If the test line (T) is not detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1A), the concentration of calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a test line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1B), the calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the test line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1C), the test result is invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.
- If neither the control line (C) nor the test line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (figure 1D), the test result is invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the test (T) and control (C) lines, an additional validity check of the control line (C) is undertaken. If the signal intensity of the control line (C) is below a threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Quantum Blue® fCAL high range test has to be repeated using another test cassette.

STANDARDIZATION

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

LIMITATIONS

- Reagents delivered with the Quantum Blue® fCAL high range kit are intended for the determination of calprotectin levels in human stool samples only.
- Fecal calprotectin values 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).
- 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).

INTERPRETATION OF RESULTS

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

Clinical thresholds of 80 µg/g and 160 µg/g were established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL) using results from 58 clinical samples from patients diagnosed with IBS and 131 clinical samples from patients diagnosed with IBD. BÜHLMANN recommends the following interpretation of results for the Quantum Blue® fCAL high range test:

Calprotectin concentration	Interpretation	Follow-up
< 100 µg/g	Normal/ Borderline	Retesting with EK-CAL/ LF-CAL25
100 - 160 µg/g	Borderline	Follow-up within 4 – 6 weeks
> 160 µg/g	Elevated	Repeat as needed

Table 3

Calprotectin values below 100 µg/g

Fecal calprotectin values below 100 µg/g are indicative of either a non-inflammatory situation or mild inflammation in the gut. Retesting of the sample with the BÜHLMANN fCAL® ELISA (order code: EK-CAL) or Quantum Blue® fCAL (order code: LF-CAL25) can be taken into consideration.

Calprotectin values between and equal to 100 and 160 µg/g

Calprotectin levels between and equal to 100 and 160 µg/g are not directly indicative of an active inflammation requiring immediate follow-up with invasive testing. However, the presence of inflammation cannot be excluded. Re-evaluation of fecal calprotectin levels after 4 to 6 weeks is recommended to determine the inflammatory status.

Calprotectin values above 160 µg/g

Fecal calprotectin values >160 µg/g are indicative of neutrophil infiltrate in the gastrointestinal tract; therefore,

this may signal the presence of active inflammatory disease. Appropriate further investigative procedures by specialists are suggested to achieve an overall clinical diagnosis.

Clinical evaluation

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

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

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

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

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 patient's 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.

Calprotectin values below 100 µg/g:

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

Calprotectin values 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.

Calprotectin values above 300 µg/g:

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been established with the Quantum Blue® Reader 1st and 2nd Generation and were verified on the Quantum Blue® Reader 3rd Generation.

Indicated performance characteristics apply for all three Reader generations.

Method comparison

Bias at clinical decision points:

Bias at 160 µg/g: -1.4% (95% CI: -8.1 - 9.3%)

Bias at 300 µg/g: -0.0% (95% CI: -3.9 - 6.3%)

The method comparison study was performed according to the CLSI guideline EP09-A3. One hundred and three (103) clinical samples were measured according to the instruction for use with the Quantum Blue® fCAL high range test and with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. Measurements were performed over three days using two Quantum Blue® fCAL high range test cassette lots. The correlation data is illustrated in figure 2.

Repeatability: 20.0-22.7% CV

Within-laboratory precision: 22.4-28.1% CV

Repeatability and within-laboratory precision were established according to CLSI guideline EP05-A3. Five extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 180 and 1224 µg/g, were evaluated by one operator over 20 days, in two independent runs per day with two replicates per run. The test results are summarized in table 11.

Reproducibility: 19.2-28.9% CV

Reproducibility was established according to CLSI guideline EP05-A3 by performing measurements on three different Quantum Blue® Reader instruments with three different test cassette lots. Five extracted stool samples with calprotectin concentrations ranging between 202 and 1328 µg/g, were tested over 5 days, in one run with five replicates per run. Each Quantum Blue® Reader instrument was operated by a different operator at three different sites. The results are summarized in table 12.

Limit of Blank (LoB): 60 µg/g calprotectin

The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with four stool samples diluted to a target concentration below 10 µg/g calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 60 blank values. The study was performed on two different test cassette lots. The LoB was evaluated using non-parametric analysis.

Limit of Detection (LoD): 100 µg/g calprotectin

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with five clinical samples with concentrations of

59, 70, 82, 117 and 148 µg/g calprotectin. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 75 values. The study was performed with two different test cassette lots. The LoD was calculated using parametric analysis.

Limit of Quantification (LoQ): 100 µg/g calprotectin

The LoQ was established according to the CLSI guideline EP17-A2 with six clinical samples with reference concentrations of 59, 70, 82, 117, 148 and 166 µg/g calprotectin established with the BÜHLMANN fCAL® ELISA. The samples were measured over three days in five replicates each day to produce 90 values. The study was performed with two different test cassette lots. The relative total error was calculated using the RMS model from precision and bias estimates for each sample. The relative total error values were log transformed and plotted against the reference calprotectin concentration of the samples. The LoQ was defined as the intersection of the linear regression model obtained for the plot and the acceptance criterion of 30% relative total error. The results are summarized in table 13.

Linear range: 67-2153 µg/g calprotectin

The linear range of the Quantum Blue® fCAL high range test was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Two sample pools, low and high, were blended to obtain 17 concentration levels covering and exceeding the expected measuring range. The blends were assayed in 10 replicates on two test cassette lots. The linear range was defined as the interval of concentration levels in which coefficients of the second and third order fits were determined as not significant. Results for one test cassette lot are shown in figure 3.

Dilution linearity: 1:10-1:100

A clinical sample with an estimated concentration of 18'000 µg/g calprotectin was diluted in extraction buffer to obtain target concentrations of 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 and 1700 µg/g calprotectin. The samples were further diluted 1:10 to obtain calprotectin concentrations covering the measuring range of the assay. The dilutions were measured in five replicates in the Quantum Blue® fCAL high range test on two test cassette lots. The linearity of the obtained dilutions was assessed according to CLSI guideline EP6-A. Where coefficients of second or third order fits were determined to be significant, a maximum deviation from linearity of 20% was allowed, with no deviation above 10% observed. Results for one test cassette lot are shown in figure 4.

High Dose Hook Effect

No high dose hook effect was observed for samples with calprotectin concentrations of up to 18'931 µg/g.

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range ist ein *in-vitro*-Diagnostiktest 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 einer funktionellen Erkrankung (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

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

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Testkassette	25 Stück	B-CAL-TC	Vakuumdicht in einem Folienbeutel
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Kontrollen niedrig*/hoch*	2 Fläschchen 0,5 mL	B-CHR- CONSET	Gebrauchsfertig
RFID Chipkarte	1 Stück	B-CHR-RCC	Rote Plastikkarte
Barcodekarte	1 Stück	B-CHR-BCC	2D-Barcode- plastikkarte

Tabelle 1

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

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICH

Stuhlextraktionsprodukte

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

Extraktions- produkt Kits	Menge	Produkt Code
CALEX® Cap	Packungen mit 50, 200 oder 500 Röhrchen erhältlich, gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer Gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 Röhrchen bestehend aus Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick- Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, gefüllt mit 1.3 mL Extraktionspuffer Gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Tabelle 2

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

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

Technische Vorsichtsmassnahmen

Kit Komponenten

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

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von der beschriebenen Arbeitsanleitung abweichen.
- Bitte beachten Sie, dass es zwei Generationen von Readern gibt: Den Quantum Blue® Reader der 2. Generation mit Seriennummern zwischen 1000 und 3000 (QB2) und den Quantum Blue® Reader der 3. Generation mit Seriennummern über 3000 (QB3G).
- Der QB2 muss vor Beginn des Tests eingeschaltet und für den Quantum Blue® fCAL high range Test (<CHR_0> oder <CHR_900>) programmiert werden (siehe Handbuch des Quantum Blue® Readers).
- Der QB3G muss eingeschaltet und für den Quantum Blue® fCAL high range Test programmiert werden, indem entweder die Barcodekarte (B-CHR-BCC) verwendet oder aus dem Testmenü (nur Fast Track Mode) ausgewählt wird. Weitere Informationen sind im Handbuch des Quantum Blue® Readers aufgeführt.
- Benutzen Sie die rote RFID Chipkarte (QB2) / Barcodekarte (QB3G), um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemässe Handhabungen 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.
- Wenn die verdünnten Proben nicht direkt verwendet werden, sollten sie bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von zwölf Stunden verwendet werden.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im BÜHLMANN Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3000 x g zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden.

PROBENENTNAHME, LAGERUNG, STABILITÄT

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

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

Transport der Proben

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

Lagerung der Proben

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

Stabilität der Extrakte

Fäkales Calprotectin in Extrakten, die mit dem CALEX® Cap gewonnen wurden, ist bei Raumtemperatur (23 °C) 7 Tage und bei 2-8 °C bis zu 15 Tage stabil. Bei längerer Lagerung, die Extrakte bei -20 °C einfrieren. Gefrorene Extrakte sind für einen Zeitraum von bis zu 23 Monaten stabil.

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

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in drei Schritte:

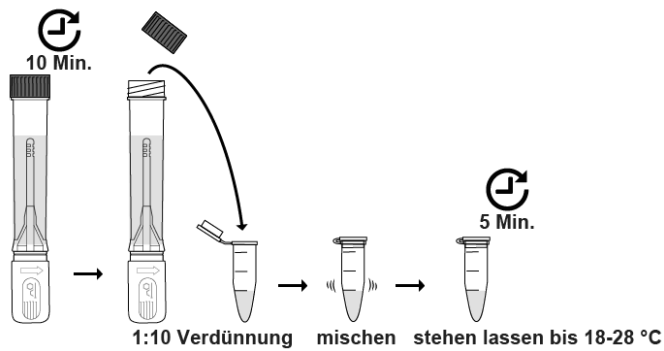
1. Extraktion der Stuhlproben:

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchen beschrieben.

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

2. Verarbeitung des Extraktes:

- Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten ruhen lassen. Den Überstand mit Extraktionspuffer 1:100 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 1980 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28 °C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (3).
- CALEX® Cap: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten mit dem weissen Verschluss nach unten ruhen lassen. Öffnen Sie den blauen Verschluss und verdünnen Sie den Überstand mit Extraktionspuffer 1:10 (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 Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (Punkt 3).

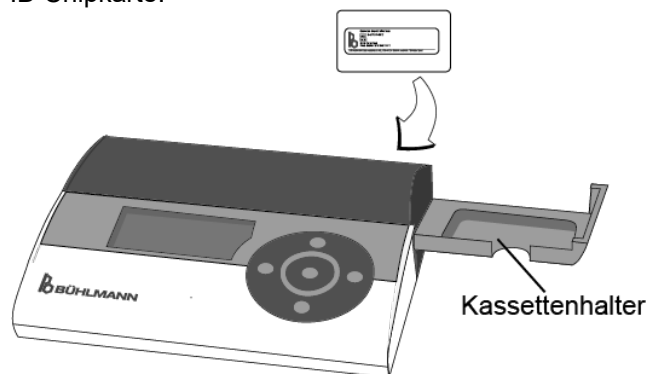


3. Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung:

QB2

Es sind zwei alternative Methoden auf dem Quantum Blue® Reader gespeichert: <CHR_900> (mit internem Zeitmesser) und <CHR_0> (ohne internen Zeitmesser). Wählen Sie eine dieser Methoden aus, bevor Sie den Test starten.

Laden Sie die testspezifischen Parameter von der roten RFID Chipkarte.



QB3G

Zur Probenmessung mit dem QB3G sind zwei verschiedene Betriebsmodi von BÜHLMANN verfügbar: Fast Track Mode oder Fail Safe Mode. Bitte informieren Sie sich vor Beginn des Tests darüber, in welchem Betriebsmodus Ihr Lesegerät arbeitet.

Die Testmethode kann von der Barcodekarte geladen (Fast Track und Fail Safe Mode) bzw., falls zuvor verwendet, aus dem Testmenü ausgewählt werden (nur Fast Track Mode). Im Fast Track Mode können die Messungen mit oder ohne internen Zeitmesser durchgeführt werden. Im Fail Safe Mode können die Messungen nur mit einem internen Zeitschaltuhr durchgeführt werden.

Folgen Sie den Anweisungen, die auf der Anzeige des QB3G angezeigt sind. Weitere Informationen zum Fast Track und Fail Safe Mode finden Sie in den Kurzanleitungen des QB3G.



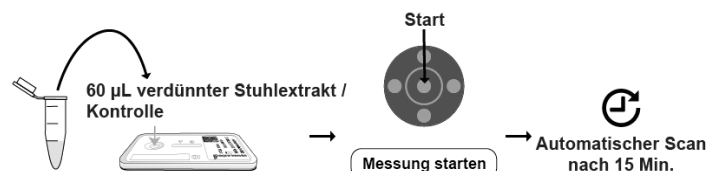
3.1 Methode mit internem Zeitmesser

QB2: Methode < CHR_900> auswählen und die chargenspezifischen Parameter von der roten RFID-Chipkarte laden.

QB3G (Fast Track Mode): Bei Aufforderung des QB3G die Inkubationszeit zu überspringen, „NEIN“ auswählen.

QB3G (Fail Safe Mode): Standardeinstellung

- Packen Sie die Testkassette aus. Tragen sie 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probeauftragsstelle der Kassette auf.
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® Readers laden.
- Den Testkassettenhalter schliessen und die Messung durch Drücken der Starttaste am QB2 oder der Option „Messung starten“ am QB3G starten.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 15 Minuten (900 Sek.).
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie den Schritt 3.1 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



3.2 Methode ohne internen Zeitmesser

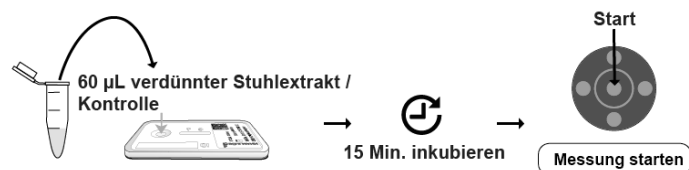
QB2: Methode < CHR_0> auswählen und die chargenspezifischen Parameter von der roten RFID-Chipkarte laden.

QB3G (Fast Track Mode): Bei Aufforderung des QB3G die Inkubationszeit zu überspringen, „JA“ auswählen.

QB3G (Fail Safe Mode): Option nicht verfügbar

- Packen Sie die Testkassette aus. Tragen sie 60 µL verdünntes Extrakt auf die runde Probeauftragsstelle der Testkassette auf.
- Die Testkassette für 15 ± 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Testkassette auf den Kassettenhalter des Quantum Blue® Readers laden.

- Die Testkassette sofort mit dem Quantum Blue® Reader durch Drücken der Starttaste am QB2 oder der Option „Messung starten“ am QB3G scannen.
- Für die Kontrollen niedrig/hoch: Wiederholen Sie die den Schritt 3.2 mit 60 µL Kontrollen anstelle des verdünnten Stuhlextrakts.



Anmerkung: Informationen zu den Grundfunktionen sowie der Initialisierung und dem Betrieb der Quantum Blue® Reader, insbesondere zur Auswahl der Testmethoden und zum Laden chargenspezifischer Parameter von der RFID-Chipkarte (QB2) / Barcodekarte (QB3G) am Quantum Blue® Reader sind im Handbuch des Quantum Blue® Readers enthalten. Die Testkassette muss mit der richtigen Orientierung (mit dem Ablesfenster zuerst), in den Quantum Blue® Reader eingelegt werden (Abbildung 1D).

QUALITÄTSKONTROLLE

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

VALIDIERUNG DER RESULTATE

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

bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG

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

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die mit dem Quantum Blue® fCAL high range Kit bereitgestellten Reagenzien sind nur für die Bestimmung der Calprotectinkonzentrationen in humanen Stuhlproben vorgesehen.
- Fäkale Calprotectinwerte sind als Hilfe bei der Diagnose zur Unterscheidung einer organischen Erkrankung von einer funktionellen Erkrankung und zur IBD-Überwachung vorgesehen. Die Interpretation der Resultate sollte stets in Kombination mit anderen klinischen Ergebnisse 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).
- Patienten, die regelmässig NSAIDs einnehmen, könnten erhöhte fäkale Calprotectinkonzentrationen aufweisen.
- Die Ergebnisse sind unter Umständen nicht klinisch anwendbar auf Kinder unter 4 Jahren, die leicht erhöhte Calprotectinspiegel im Stuhl aufweisen (Ref. 21-24).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

I. Unterscheiden einer organischen Erkrankung von einer funktionellen gastrointestinalen Erkrankung

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

Die Ergebniskategorien basieren auf Daten aus klinischen Studien, die von BÜHLMANN durchgeführt wurden, und sind Empfehlungen von BÜHLMANN. Alle Testergebnisse sollten zusammen mit Informationen, die aus den

klinischen Symptomen des Patienten, der Anamnese und anderen klinischen Ergebnissen und Laborbefunden verfügbar sind, interpretiert werden.

Klinische Schwellenwerte

Mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA (Bestellcode: EK-CAL) wurden klinische Schwellenwerte von 80 µg/g und 160 µg/g aus 58 klinischen Proben von mit RDS diagnostizierten Patienten und aus 131 klinischen Proben von mit CED diagnostizierten Patienten bestimmt. BÜHLMANN empfiehlt die folgende Interpretation der Ergebnisse für den Quantum Blue® fCAL High Range Test:

Calprotectin-konzentration	Interpretation	Nachuntersuchung
< 100 µg/g	Norma/ grenzwertig	Erneutes Testen mit EK-CAL/ LF-CAL25.
100 – 160 µg/g	Grenzwertig	Nachbeobachtung innerhalb von 4-6 Wochen
> 160 µg/g	Erhöht	Bei Bedarf wiederholen

Tabelle 3

Calprotectinwerte unterhalb 100 µg/g

Calprotectinwerte im Stuhl unter 100 µg/g deuten entweder auf eine nicht entzündliche Erkrankung oder eine milde Entzündung des Darms hin. Erneutes Testen der Probe mit dem BÜHLMANN fCAL® ELISA (Bestellcode: EK-CAL) oder Quantum Blue® fCAL (Bestellcode: LF-CAL25) können berücksichtigt werden.

Calprotectinwerte zwischen oder gleich 100 und 160 µg/g

Calprotectinspiegel im Stuhl im Mittelbereich zwischen oder gleich 100 und 160 µg/g, die auch als Grauzonenspiegel bezeichnet werden, deuten nicht direkt auf eine aktive Entzündung hin, die eine sofortige Nachuntersuchung mit invasiven Tests erfordert. Das Vorliegen einer Entzündung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Entzündungsstatus wird eine erneute Überprüfung der Calprotectinspiegel im Stuhl nach 4 bis 6 Wochen empfohlen.

Calprotectinwerte oberhalb von 160 µg/g

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

Klinische Beurteilung

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

Die Differenzierung zwischen CED und GI-assoziierten nichtentzündlichen Erkrankungen einschliesslich RDS

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

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

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

II. CED-Überwachung

Klinische Schwellenwerte und Beurteilung

Die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl ist eine zuverlässige und einfache Hilfe bei der Überwachung von CED-Patienten (Ref. 7-18).

Die Korrelation von Calprotectin-Spiegeln und dem Entzündungszustand der Darmschleimhaut von Patienten gemäss endoskopischer Untersuchungen wurde in drei unabhängigen Studien mithilfe von BÜHLMANN Calprotectin Tests bestimmt (Tabelle 9).

Die diagnostische Aussagekraft von Calprotectin bei der Vorhersage von klinischen Remissionen und Rezidiven gemäss Patientensymptomen, die klinischen Aktivitätsindizes sowie der ungeplante Bedarf für eine Therapieeskalation, Hospitalisierung oder einen Notfall wurde in drei Studien mithilfe von BÜHLMANN Calprotectin Tests bestimmt (Tabelle 10).

Die dargestellten Ergebniskategorien sind Empfehlungen und ihre Erstellung basiert auf den zusammengefassten Erkenntnissen der publizierten Toleranzgrenzen und klinischen Leistungsstudien. Es ist angeraten, dass Ärzte individuelle Patienten-Schwellenwerte durch Bestimmung des Calprotectin-Spiegelausgangswerts des Patienten während der Krankheitsremission festlegen:

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 diesen 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

Die folgenden Leistungsmerkmale wurden mit einem Quantum Blue® Reader der 1. und 2. Generation erstellt und mit einem Quantum Blue® Reader der 3. Generation verifiziert.

Die Daten daher gelten für alle Readergenerationen.

Methodenvergleich:

Bias am klinischen Entscheidungspunkt:

160 µg/g: -1.4% (95% Konfidenzintervall: -8.1 - 9.3%)

300 µg/g: -0.0% (95% Konfidenzintervall: -3.9 - 6.3%)

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP09-A3 durchgeführt. Einhundertunddrei (103) klinische Proben wurden mit dem Quantum Blue® fCAL high range und dem BÜHLMANN fCAL® ELISA Test gemäss der Gebrauchsanweisung evaluiert. Messungen wurden über drei Tage auf zwei verschiedenen Quantum Blue® fCAL high range Testkassetten-Lots durchgeführt. Die Korrelationsdaten sind in der Abbildung 2 illustriert.

Präzision (Wiederholbarkeit): 20,0-22,7% CV

Präzision innerhalb des Labors (Within-laboratory precision): 22,4-28,1% CV

Die Wiederholbarkeit und die Präzision innerhalb des Labors wurden gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 durchgeführt. Fünf extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 180 und 1224 µg/g, wurden über 20 Tage in zwei unabhängigen Testläufen mit zwei Replikaten pro Testlauf durchgeführt. Die Resultate sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit: 19,2-28,9% CV

Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde auf drei verschiedenen Quantum Blue® Reader Instrumenten mit drei verschiedenen Testkassetten-Lots gemäss der CLSI Richtlinie EP05-A3 bestimmt. Fünf extrahierte Stuhlproben mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 202 und 1328 µg/g, wurden über 5 Tage in einem Testlauf mit fünf Replikaten pro Testlauf durchgeführt. Jeder Quantum Blue® Reader wurde von je einem Operateur an drei verschiedenen Standorten bedient. Die Resultate sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Die Leerwert-Obergrenze (LoB): 60 µg/g Calprotectin

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

Nachweisgrenze (LoD): 100 µg/g Calprotectin

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

Quantifizierungsgrenze (LoQ): 100 µg/g Calprotectin

Der LoQ wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP 17-A2 mit sechs klinischen Proben mit Konzentrationen von 59, 70, 82, 117, 148 und 166 µg/g Calprotectin evaluiert auf dem BÜHLMANN fCAL® ELISA, bestimmt. Um 90 Werte zu erhalten, wurden die Proben über drei Tage in drei unabhängigen Testläufen mit jeweils fünf Replikaten pro Tag gemessen. Die Studie wurde mit zwei verschiedenen Testkassetten-Lots durchgeführt. Unter Verwendung des RMS-Modells, das aus den Präzisions- und Abweichungsschätzungen für jede Probe hervorging, wurde der relative Gesamtfehler berechnet. Die Werte des relativen Gesamtfehlers wurden logarithmisch transformiert und gegen die Referenz Calprotectinkonzentration der Proben aufgetragen. Der LoQ wurde als der Schnittpunkt des linearen Regressionsmodells definiert, das für den Plot und das Akzeptanzkriterium von 30 % relativen Gesamtfehlers erhalten wurde. Resultate, die mit einem Testkassetten-Lot gemessen wurden, sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Linearer Bereich: 67-2153 µg/g Calprotectin

Der lineare Bereich des Quantum Blue® fCAL high range Tests wurde gemäss der CLSI Richtlinie EP06-A durchgeführt. Um mindestens 17 Konzentrationsstufen zu erhalten, die den erwarteten Messbereich abdecken und höher sind, wurden zwei Probenpools, niedrig und hoch, gemischt. Die Mischungen wurden mit jeweils 10 Replikaten auf zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Der lineare Bereich wurde als das Intervall der Konzentrationslevels definiert, in denen Koeffizienten der zweiten und dritten Ordnung als nicht signifikant bestimmt wurden. Resultate für ein Testkassetten-Lot sind in Abbildung 3 abgebildet.

Verdünnungslinearität: 1:10-1:100

Eine klinische Probe mit einer geschätzten Konzentration von 18'000 µg/g Calprotectin wurde in Extraktionspuffer verdünnt, um Zielkonzentrationen von 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 und 1700 µg/g Calprotectin zu erhalten. Die Proben wurden weiter 1:10 verdünnt, um Calprotectinkonzentration zu erhalten, die den erwarteten Messbereich des Tests abdecken. Die Verdünnungen wurden mit jeweils fünf Replikaten auf dem Quantum Blue® fCAL high range Test mit zwei Testkassetten-Lots evaluiert. Die Linearität der erhaltenen Verdünnungen wurde nach der CLSI-Richtlinie EP6-A bestimmt. Wurden Koeffizienten der zweiten oder dritten Ordnung als signifikant deklariert, wurde eine maximale Abweichung von der Linearität von 20% erlaubt, wobei keine Abweichung über 10 % beobachtet wurde. Resultate für ein Testkassetten Lot sind in Abbildung 4 abgebildet.

High-Dose-Hook Effekt

Bis zu einer Konzentration von 18'931 µg/g Calprotectin wurde kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet.

UTILISATION PREVUE

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 tractus gastro-intestinal (maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou MICI, spécifiquement maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable ou SCI) (réf. 1-7), chez les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques 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 anti-calprotectine-or qui n'a pas réagi se lie à l'anticorps de chèvre anti-souris déposé sur la membrane test (ligne contrôle). Les intensités de signal de la ligne de test (T) et de la ligne de contrôle (C) sont mesurées quantitativement par le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

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

Tableau 1

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

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

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

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

Dispositifs d'extraction de selles

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

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

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à pointes jetables : 10-100 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 immédiatement 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 l'essai.
- Les constituants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Les cassettes test sont à usage unique.

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Noter qu'il y a deux générations de lecteurs : Le Quantum Blue® Reader 2^{ème} génération avec des numéros de série entre 1000 et 3000 (QB2) et le Quantum Blue® Reader 3^{ème} génération avec des numéros de série supérieurs à 3000 (QB3G).
- Le QB2 doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® fCAL high range (<CHR_0> ou <CHR_900>) avant le démarrage du test (cf manuel du Quantum Blue® Reader).
- Le QB3G doit être allumé et programmé pour le dosage Quantum Blue® fCAL high range, soit en utilisant la carte à code-barres (B-CHR-BCC), soit par sélection dans le menu Test (mode Fast Track uniquement). Pour plus d'informations, consulter le manuel du Quantum Blue® Reader.
- Utiliser la carte à puce RFID rouge (QB2) / carte à code-barres (QB3G) pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Si elle n'est pas utilisée directement, les échantillons dilués doivent être conservés à 2-8 °C et doivent être utilisés dans douze heures.
- Il est important de centrifuger les extraits avec 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.

PRELEVEMENT, STOCKAGE DES ECHANTILLONS, STABILITE

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

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

Transport des échantillons

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

Conservation des échantillons

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

Stabilité des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus avec le dispositif CALEX® Cap sont stables à température ambiante (23 °C) pendant 7 jours et à 2-8 °C jusqu'à 15 jours. Pour un stockage plus long, 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 :

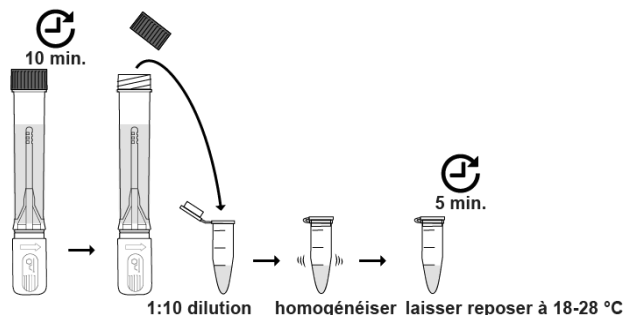
1. Extraction des échantillons de selles :

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 l'extrait le surnageant au 1/100ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 20 µL d'extrait et 1980 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 et 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).

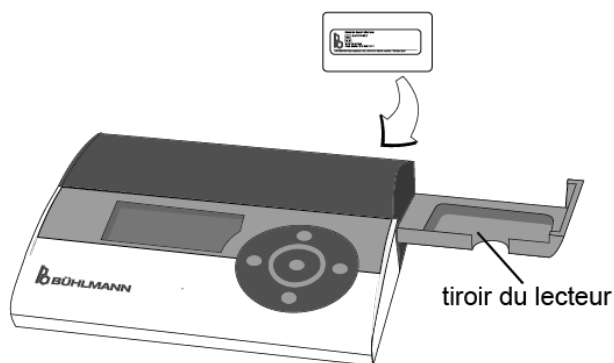


3. Dosage en flux latéral et lecture du résultat :

QB2

Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID : <CHR_900> (avec minuteur interne) et <CHR_0> (sans minuteur interne). Sélectionner l'une des méthodes avant de procéder au test.

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



QB3G

Deux modes de fonctionnement différents sont proposés par BÜHLMANN pour mesurer les échantillons avec le QB3G : le mode Fast Track et le mode Fail Safe. Avant de démarrer le dosage, vérifier le mode de fonctionnement pour lequel le lecteur est programmé.

La méthode de test peut être chargée à partir de la carte à code-barres (modes Fast Track et Fail Safe) ou, en cas d'utilisation antérieure, sélectionnée depuis le menu Test (mode Fast Track uniquement). Les mesures peuvent être effectuées avec ou sans minuteur interne dans le mode Fast Track. Les mesures en mode Fail Safe peuvent uniquement être effectuées avec un minuteur interne.

Suivre les instructions indiquées sur l'écran du QB3G. Consulter également les manuels de démarrage rapide du lecteur QB3G pour les modes Fast Track et Fail Safe.



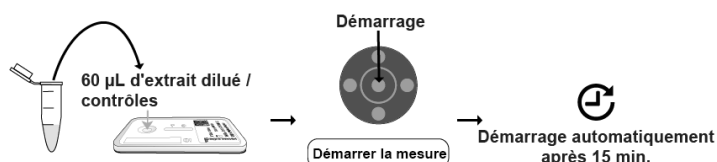
3.1. Méthode avec minuteur interne

QB2 : sélectionner la méthode <CHR_900> et charger les paramètres spécifiques du lot à partir de la carte à puce RFID rouge.

QB3G (mode Fast Track) : lorsque le lecteur QB3G propose d'ignorer la période d'incubation, sélectionner « NON »

QB3G (mode Fail Safe) : paramètre par défaut

- Déballer la cassette test. Ajouter 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Déposer la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Fermer le tiroir et démarrer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage du lecteur QB2 ou en sélectionnant l'option «Démarrer la mesure» du lecteur QB3G.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 15 minutes (900 seconds).
- Pour les contrôles bas / élevé : Répéter l'étape 3.1 en utilisant 60 µL de contrôle à la place de l'extrait de selles diluées.



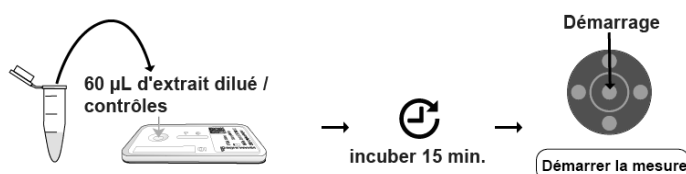
3.2. Méthode sans minuteur interne

QB2 : sélectionner la méthode <CHR_0> et charger les paramètres spécifiques du lot à partir de la carte à puce RFID rouge.

QB3G (mode Fast Track) : lorsque le lecteur QB3G propose d'ignorer la période d'incubation, sélectionner « OUI »

QB3G (mode Fail Safe) : option non disponible

- Déballer la cassette test. Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incuber pendant 15 ± 1 minutes en démarrant un minuteur manuellement.
- Charger la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette test avec le Quantum Blue® Reader en appuyant sur le bouton de démarrage du QB2 ou en sélectionnant l'option «Démarrer la mesure» du QB3G.
- 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 prendre connaissance des fonctions de base et de la façon d'initialiser et d'utiliser les Quantum Blue®

Readers, en particulier pour sélectionner les méthodes de tests et charger les paramètres spécifiques du lot à partir de la carte à puce RFID (QB2)/carte à code-barres (QB3G) sur le Quantum Blue® Reader. Vérifier que la cassette test est bien insérée dans le Quantum Blue® Reader, fenêtre de lecture en premier (figure 1D).

CONTROLE DE QUALITE

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

VALIDATION DES RESULTATS

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

STANDARDISATION

- Le dosage de Quantum Blue® fCAL high range est standardisé contre le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe est générée avec les valeurs moyennes ($n \geq 20$ mesures à chaque fois) provenant de 13 points de calibrage et d'échantillons de selles différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de mesure se situe entre 100 et 1'800 µg/g.

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

LIMITES

- Les réactifs fournis dans la trousse Quantum Blue® fCAL high range 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).
- Les patients qui prennent des AINS de façon régulière peuvent présenter des taux de calprotectine fécale plus élevés.
- Les résultats peuvent ne pas être cliniquement applicables aux enfants de moins de 4 ans dont les niveaux de calprotectine sont légèrement supérieurs à la normale (réf. 21-24).

INTERPRETATION DES RESULTATS

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

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

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

Valeurs seuils cliniques

Des seuils cliniques de 80 µg/g et 160 µg/g ont été établis avec le test BÜHLMANN fCAL® ELISA (réf. de commande : EK-CAL) à partir des résultats de 58 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour un SCI et de 131 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour une

MICI. BÜHLMANN recommande l'interprétation suivante des résultats du test Quantum Blue® fCAL high range :

Concentration en calprotectine	Interprétation	Suite
< 100 µg/g	Normale/ frontière	De nouveaux tests avec EK-CAL/LF-CAL25.
100 – 160 µg/g	Frontière	Suite dans les 4 à 6 semaines
> 160 µg/g	Supérieure à la normale	Répéter le cas échéant

Tableau 3

Valeurs de calprotectine inférieures à 100 µg/g

Les valeurs de calprotectine inférieures à 100 µg/g indiquent soit une situation non inflammatoire, soit une inflammation de l'intestin. Des mesures complémentaires à l'aide du test BÜHLMANN fCAL® ELISA (réf. de commande : EK-CAL) ou Quantum Blue® fCAL (réf. de commande : LF-CAL25) pourraient être prises en considération.

Valeurs de calprotectine comprises entre 100 et 160 µg/g (bornes incluses)

Des niveaux de calprotectine fécale moyens, compris entre 100 et 160 µg/g, bornes incluses, également qualifiés de niveaux dans la zone grise, ne sont pas directement révélateurs d'une inflammation active exigeant un suivi thérapeutique immédiat par des tests invasifs. Cependant, la présence d'une inflammation ne peut pas être exclue. Il est recommandé de réévaluer les niveaux de calprotectine fécale après 4 à 6 semaines pour déterminer l'état d'inflammation.

Valeurs de calprotectine supérieures à 160 µg/g

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

Évaluation clinique

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

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

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

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

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

Les caractéristiques de performance suivantes ont été établies à l'aide des Quantum Blue® Reader 1^{ère} et 2^{ème} génération et ont été vérifiées sur le Quantum Blue® Reader 3^{ème} génération. Les caractéristiques de performances indiquées sont applicables pour les 3 générations de lecteur.

Comparaison de méthodes :

Biais au point de décision clinique :

160 µg/g: -1.4% (IC à 95%: -8.1 - 9.3%)

300 µg/g: -0.0% (IC à 95%: -3.9 - 6.3%)

La comparaison de méthodes a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP09-A3. Cent trois (103) échantillons cliniques ont été mesurés conformément aux instructions d'utilisation au moyen des tests BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range et BÜHLMANN fCAL® ELISA. Les mesures ont été réalisées pendant trois jours avec deux lots de cassettes tests Quantum Blue® fCAL high range. Les données de corrélation sont illustrées sur la figure 2.

Précision (répétabilité) : 20,0 – 22,7% CV

Précision intra-laboratoire : 22,4 – 28,1% CV

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Cinq échantillons d'extraits de selles présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 180 et 1224 µg/g ont été testés par un opérateur quotidiennement pendant 20 jours, dans deux dosages indépendants chaque jour, à raison de deux répétitions par dosage. Le tableau 11 rassemble les résultats de tests ainsi obtenus.

Reproductibilité : 19,2 – 28,9% CV

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice CLSI EP05-A3. Pour ce faire, des mesures ont été réalisées sur trois instruments Quantum Blue® Reader différents à l'aide de trois lots de cassettes test différents. Cinq échantillons d'extraits de selles, présentant des concentrations de calprotectine comprises entre 202 et 1328 µg/g, ont été testés pendant 5 jours, à raison d'un dosage quotidien répété cinq fois chaque jour. Chacun des lecteurs Quantum Blue® Reader a été utilisé par un opérateur différent, dans trois sites différents. Le tableau 12 rassemble les résultats obtenus.

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

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

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

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

Limite de quantification (LoQ) 100 µg/g calprotectine

La LoQ a été établie selon la ligne directrice CLSI EP17-A2 à partir de six échantillons cliniques dont les concentrations de référence en calprotectine, mesurées au moyen du test BÜHLMANN fCAL® ELISA, étaient de 59, 70, 82, 117, 148 et 166 µg/g. Les échantillons ont été mesurés pendant trois jours, à raison de cinq réplicas chaque jour permettant d'obtenir 90 valeurs. L'étude a été réalisée avec deux lots

différents de cassettes tests. L'erreur relative totale a été calculée à l'aide du modèle de la moyenne quadratique à partir d'estimations d'erreur de précision et de biais pour chaque échantillon. Les valeurs d'erreur relative totale ont été transformées en log et portées graphiquement en fonction de la concentration de référence en calprotectine des échantillons. La LoQ a été déterminée par la valeur correspondant à l'intersection de la droite d'ajustement obtenue par régression linéaire avec le niveau d'erreur relative totale de 30 % défini comme critère d'acceptation. Le tableau 13 rassemble les résultats obtenus.

Plage de linéarité : 67 – 2153 µg/g calprotectine

Le domaine linéaire du test Quantum Blue® fCAL et Quantum Blue® fCAL high range a été déterminée selon la ligne directrice CLSI EP06-A. Deux groupes d'échantillons, de niveau haut et bas, ont été regroupés de manière à obtenir au moins 17 niveaux de concentration couvrant et excédant la gamme de mesure attendue. Les mélanges ont été testés sous forme de 10 répétitions d'échantillons, en deux analyses indépendantes réalisées avec deux lots de cassettes tests. Le domaine linéaire a été définie comme l'intervalle des concentrations dont les coefficients des ajustements de courbe des deuxième et troisième ordres étaient déterminés comme non significatifs. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la figure 3.

Linéarité de dilution : 1:10 – 1:100

Un échantillon clinique dont la concentration de calprotectine était estimée à 18'000 µg/g a été dilué dans la solution tampon d'extraction pour donner des concentrations cibles en calprotectine de 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 et 1700 µg/g. Les échantillons ont été encore dilués au 1:10, ce qui a permis d'obtenir des concentrations finales en calprotectine couvrant la plage de mesure de l'essai. Ils ont alors été mesurés en cinq réplicas au moyen du test Quantum Blue® fCAL high range pratiqué sur deux lots de cassettes tests différents. La linéarité des dilutions obtenues a été évaluée selon la ligne directrice CLSI EP6-A. Dans les cas où les coefficients des ajustements de courbe des deuxième ou troisième ordres étaient déterminés comme significatifs, un taux de déviation de linéarité de 20% maximum était autorisé, aucune déviation supérieure à 10% n'étant observée. Les résultats obtenus avec un lot de cassettes tests sont présentés sur la figure 4.

Effet crochet à forte dose

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

USO PREVISTO

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL high range è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane e viene impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto alla diagnosi differenziale tra malattie gastrointestinali organiche infiammatorie (malattia infiammatoria intestinale (IBD), nello specifico la malattia di morbo di Crohn o colite ulcerosa (CU)) e funzionali (sindrome dell'intestino irritabile (IBS)) (rif. 1-7), in pazienti con dolore addominale cronico, nonché come supporto al monitoraggio della 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, viene rilasciato nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione (T) e della banda di controllo (C) sono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

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

Tabella 1

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

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

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

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

Kit di dispositivi di estrazione	Quantità	Codice
Dispositivo CALEX® Cap	Sono disponibili confezioni da 50, 200 o 500 provette contenenti 5 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 dispositivi, costituiti da spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 provette costituite da provetta, cono e tappo dosatore, contenenti 1,3 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso	B-CAL-SO50

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-100 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 d'ordine: BI-POCTR-ABS)
- Salviette o carta da blotting

PRECAUZIONI**Precauzioni di sicurezza**

- I controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BLP) utilizzando le dovute precauzioni.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone Pratiche di Laboratorio (BPL).
- **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.
- 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.
- Nota che ci sono due generazioni di lettori: Il Quantum Blue® Reader 2ª Generazione con numeri di serie tra 1000 e 3000 (QB2) e il Quantum Blue® Reader 3ª Generazione con numeri di serie superiori a 3000 (QB3G).
- Prima di avviare l'analisi, il lettore QB2 deve essere acceso e programmato per il dosaggio Quantum Blue® fCAL high range (<CHR_0> o <CHR_900>) (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader).
- Il lettore QB3G deve essere acceso e programmato per il dosaggio Quantum Blue® fCAL high range utilizzando la carta con codice a barre (B-CHR-BCC) o tramite selezione dal menu di analisi (solo Fast Track Mode). Per maggiori informazioni consultare il manuale del Quantum Blue® Reader.
- Utilizzare la carta RFID rossa (QB2) / carta con codice a barre (QB3G) per modificare i parametri di test specifici del lotto. I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- Se non viene utilizzato direttamente, i campioni diluiti devono essere conservati a 2-8 °C e devono essere utilizzati entro dodici ore.
- È importante che gli estratti con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta.

RACCOLTA, CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI, STABILITÀ

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

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

Trasporto dei campioni

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

Conservazione dei campioni

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

Stabilità degli estratti

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

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

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

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

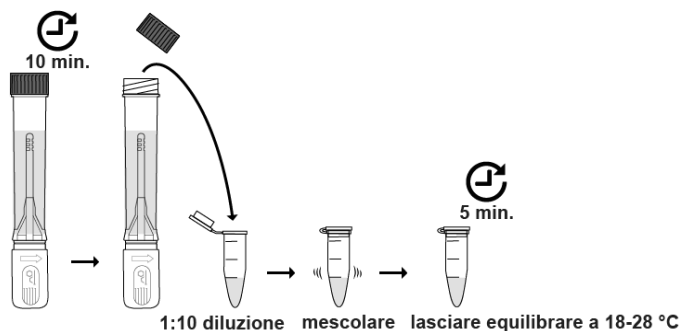
1. Estrazione dei campioni di feci:

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

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

2. Trattamento del campione:

- Smart-Prep o ScheBo® Quick Prep™: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:100 con il tampone di estrazione (es. 20 µL di estratto e il 1980 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti con l'estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu e diluire il surnatante 1:10 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).

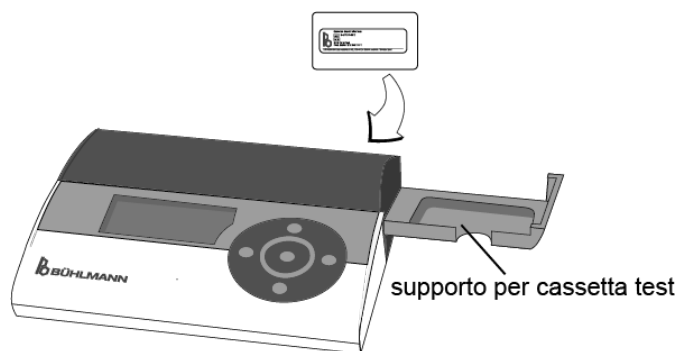


Dosaggio a flusso laterale e lettura:

QB2

Esistono due metodi alternativi disponibili sul Quantum Blue® Reader: <CHR_900> (con timer interno) e <CHR_0> (senza timer interno). Prima di iniziare gli esperimenti, selezionare uno dei metodi prima del test.

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



QB3G

Per misurare i campioni con QB3G, BÜHLMANN mette a disposizione due diverse modalità operative: Fast Track Mode o Fail Safe Mode. Prima di avviare il dosaggio, informarsi della modalità operativa in cui il proprio lettore sta funzionando.

Il metodo di analisi può essere caricato dalla carta con codice a barre (Fast Track e Fail Safe Mode) o, se è stato usato in precedenza, selezionato dal menu di analisi (solo Fast Track Mode). Le misurazioni in Fast Track Mode possono essere effettuate con o senza timer interno. Le misurazioni in Fail Safe Mode possono essere effettuate solo con timer interno.

Seguire le istruzioni riportate sullo schermo di QB3G. Per le modalità Fast Track e Fail Safe Mode si possono consultare anche le Guide rapide a QB3G.



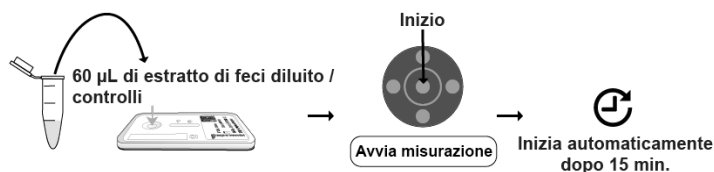
3.1 Metodo con timer interno

QB2: selezionare il metodo <CHR_900> e caricare i parametri lotto-specifici dalla carta chip RFID rossa.

QB3G (Fast Track Mode): quando QB3G chiede se si desidera saltare il tempo di incubazione, selezionare "NO"

QB3 (Fail Safe Mode): impostazione predefinita

- Estrarre dalla confezione la cassetta del test. Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.
- Caricare la cassetta sul supporto per cassetta del Quantum Blue® Reader.
- Chiudere il supporto della cassetta del test e avviare la misurazione premendo il pulsante di inizio su QB2 oppure l'opzione "Avvia misurazione" su QB3G.
- La scansione inizia automaticamente dopo 15 minuti (900 secondi).
- Per i controlli basso/ alto: Ripetere il punto 3.1 utilizzando 60 µL di controllo, invece dell'estratto di feci diluito.



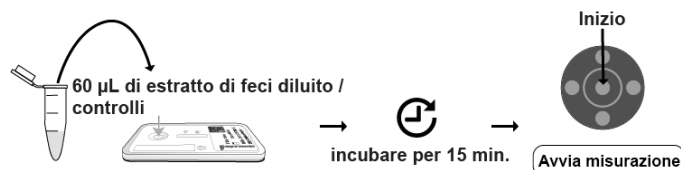
3.2 Metodo senza timer interno

QB2: selezionare il metodo <CHR_0> e caricare i parametri lotto-specifici dalla carta chip RFID rossa.

QB3G (Fast Track Mode): quando QB3G chiede se si desidera saltare il tempo di incubazione, selezionare "Sì"

QB3G (Fail Safe Mode): opzione non disponibile

- Estrarre dalla confezione la cassetta del test. Aggiungere 60 µL di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella cassetta.
- Incubare per 15 minuti ± 1 minuto (impostare un timer manuale).
- Caricare la cassetta sul supporto per cassetta test del Quantum Blue® Reader.
- Eseguire immediatamente la scansione della cassetta del test con Quantum Blue® Reader premendo il pulsante di inizio su QB2 oppure l'opzione "Avvia misurazione" su QB3G.
- Per i controlli basso/ alto: Ripetere il punto 3.2 utilizzando 60 µL di controllo, invece dell'estratto di feci diluito.



Nota: consultare il manuale del proprio Quantum Blue® Reader per imparare le funzioni basilari e come inizializzare e far funzionare i lettori Quantum Blue® Reader, in particolare come selezionare i metodi di analisi

e come caricare i parametri lotto-specifici dalla scheda chip RFID (QB2) / carta con codice a barre (QB3G) sul Quantum Blue® Reader. Accertarsi che la cassetta del test sia stata inserita correttamente nel Quantum Blue® Reader, con la finestra di lettura per prima (figura 1D).

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 15 minuti d'incubazione (figura 1A), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci è al di sotto del limite di rilevazione. Se la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1B), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1C), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range deve essere ripetuto con una nuova cassetta.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 15 minuti d'incubazione (figura 1D), il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range 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 15 minuti d'incubazione, il risultato non è valido e il test con il Quantum Blue® fCAL high range deve essere ripetuto con una nuova cassetta.

STANDARDIZZAZIONE

- Il saggio Quantum Blue® fCAL high range è stato standardizzato utilizzando come riferimento il saggio BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice: EK-CAL).
- Il Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione di calprotectina. La curva standard lotto specifica viene generata con i valori medi (n ≥ 20 misurazioni ciascuna) da 13 punti di taratura ottenuti da diversi campioni fecali con concentrazioni note di calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 100 e 1800 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazione superiore a 1800 µg/g possono essere ulteriormente diluiti 1:10 con tampone di

estrazione ed analizzati nuovamente. Il fattore di diluizione risultante deve essere moltiplicato per la concentrazione misurata per ottenerne il risultato finale.

- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni inferiori a 100 µg/g possono essere rianalizzati con il saggio Quantum Blue® fCAL (codice: LF-CAL25).

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit Quantum Blue® fCAL high range sono destinati alla determinazione dei 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 di 4 settimane, al fine di ottenere la migliore accuratezza diagnostica per la previsione di recidive cliniche nei pazienti (rif. 19-20).
- I pazienti che assumono regolarmente farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) possono esibire livelli elevati di calprotectina fecale.
- I risultati non possono essere clinicamente applicabili a bambini di età inferiore ai 4 anni, i quali presentano livelli di calprotectina lievemente più alti (rif. 21-24).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I. Differenziazione della malattia gastrointestinale organica da quella funzionale

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

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

Soglie cliniche

Le soglie cliniche di 80 µg/g e 160 µg/g sono state stabilite con il BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice ordine EK-CAL) utilizzando i risultati di 58 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBS e 131 campioni clinici di pazienti con IBD. BÜHLMANN raccomanda la seguente interpretazione dei risultati del test ad alta gamma Quantum Blue® fCAL:

Concentrazione di calprotectina	Interpretazione	Follow-up
< 100 µg/g	Normale/ borderline	Ripetere il test con EK-CAL o LF-CAL25
100 – 160 µg/g	Borderline	Follow-up entro 4-6 settimane
> 160 µg/g	Elevata	Ripetere ogni qualvolta necessario

Tabella 3

Valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g

I valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g sono indicativi di nessuna infiammazione o debole infiammazione

intestinale. Si può considerare la possibilità di ripetere il test con il BÜHLMANN fCAL® ELISA (codice ordine: EK-CAL) o Quantum Blue® fCAL (codice ordine: LF-CAL25).

Valori di calprotectina compresi tra o uguali a 100 e 160 µg/g

I livelli intermedi di calprotectina fecale compresi tra o uguali a 100 e 160 µg/g, detti anche livelli nella zona grigia, non sono direttamente indicativi di un'inflammatione attiva che richieda un controllo immediato con l'esecuzione di test invasivi. Tuttavia non si può escludere la presenza di inflammatione. Si raccomanda di rivalutare il livello della calprotectina dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio.

Valori di calprotectina maggiori di 160 µg/g

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

Valutazione clinica

La capacità di BÜHLMANN fCAL® ELISA di differenziare tra IBD e altre malattie gastroenteriche (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 prestazioni di specificità inferiori, e **cut-off massimo a 200 µg/g** con sensibilità leggermente minore (tabelle 7 e 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 tre studi utilizzando i test Calprotectina BÜHLMANN, (tabella 10).

Le categorie dei risultati mostrate costituiscono soltanto delle raccomandazioni e la loro determinazione è basata sulla valutazione globale dei valori di cut-off e degli studi sulle prestazioni cliniche pubblicati. Si consiglia ai medici di stabilire le soglie individuali di ogni paziente determinando il livello basale di calprotectina del paziente durante la remissione della malattia.

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 nel 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).

PERFORMANCE CARATTERISTICA

Le seguenti caratteristiche prestazionali sono state stabilite con Quantum Blue® Reader 1a e 2a generazione e sono state verificate su Quantum Blue® Reader 3a generazione. Le caratteristiche prestazionali indicate si applicano a tutte e tre le generazioni di Reader.

Confronto del metodo

Distorsione al punto di decisione clinica:

160 µg/g: -1.4% (95% CI: -8.1 - 9.3%)

300 µg/g: -0.0% (95% CI: -3.9 - 6.3%)

Lo studio di confronto del metodo è stato condotto in base alla norma CLSI EP09-A3. Centotré (103) campioni clinici sono stati misurati secondo le istruzioni per l'uso con il test Quantum Blue® fCAL high range e con il test BÜHLMANN fCAL® ELISA. Le misurazioni sono state effettuate in un periodo di tre giorni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. I dati di correlazione sono illustrati in figura 2.

Precisione (ripetibilità): 20,0–22,7% CV

Precisione interna del laboratorio: 22,4–28,1% CV

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate in base alla norma CLSI EP05-A3. Cinque campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 180 e 1224 µg/g sono stati analizzati da un operatore in un periodo di 20 giorni, in due esecuzioni indipendenti al giorno con due ripetizioni per esecuzione. I risultati del test sono riportati in tabella 9.

Riproducibilità: 19,2–28,9% CV

La riproducibilità è stata determinata in base alla norma CLSI EP05-A3 effettuando misurazioni su tre strumenti Quantum Blue® Reader diversi con tre lotti diversi di cassette del test. Cinque campioni di estratti fecali con concentrazioni di calprotectina variabili tra 202 e 1328 µg/g

sono stati analizzati in un periodo di 5 giorni, in un'esecuzione unica con cinque ripetizioni per esecuzione. Ogni strumento Quantum Blue® Reader è stato adoperato da un operatore diverso presso tre sedi diverse. I risultati sono riportati in tabella 10.

Limite del bianco (LoB): 60 µg/g di calprotectina

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

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

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

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

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

Il LoQ è stato definito come l'intersezione del modello di regressione lineare ottenuto per il grafico e il criterio di accettazione del 30% di errore relativo totale. I risultati sono riportati in tabella 11.

Intervallo lineare: 67–2153 µg/g di calprotectina

L'intervallo lineare del test Quantum Blue® fCAL high range è stato determinato in base alla norma CLSI EP06-A. Due gruppi di campioni, a concentrazione bassa e alta, sono stati mescolati per ottenere 17 livelli di concentrazione che rientravano e superavano l'intervallo di misurazione previsto. Le miscele sono state analizzate in 10 ripetizioni con due lotti di cassette del test. L'intervallo lineare è stato definito come l'intervallo dei livelli di concentrazione nei quali coefficienti dell'adattamento di secondo e terzo ordine sono stati ritenuti non significativi. I risultati per una cassetta del test sono illustrati in figura 3.

Linearità della diluizione: 1:10–1:100

Un campione clinico con concentrazione stimata di calprotectina di 18'000 µg/g è stato diluito con tampone di estrazione per ottenere concentrazioni accurati di calprotectina di 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 e 1700 µg/g. I campioni sono stati ulteriormente diluiti 1:10 per ottenere concentrazioni di calprotectina che coprissero l'intervallo di misurazione del dosaggio. Le diluizioni sono state misurate in cinque ripetizioni con due lotti di cassette del test Quantum Blue® fCAL high range. La linearità delle

diluizioni ottenute è stata valutata in base alla norma CLSI EP6-A. Quando i coefficienti dell'adattamento di secondo o terzo ordine sono stati ritenuti significativi, è stata consentita una deviazione massima dalla linearità del 20%, senza osservare deviazioni superiori al 10%. I risultati di un lotto di cassette del test sono illustrati in figura 4.

Effetto gancio ad alte dosi

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

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 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 / anticálprotectina 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 prueba (T) y la línea de control (C) se miden cuantitativamente mediante el Quantum Blue® Reader.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

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

Tabla 1

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

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

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

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

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

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

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Vórtex para la extracción de heces
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10-100 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)
- Quantum Blue® Reader disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS)
- Pañuelos suaves o papel secante

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

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

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

Precauciones técnicas

Componentes del kit

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

Procedimiento de ensayo

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Note que hay dos generaciones de lectores: El Quantum Blue® Reader de 2.ª generación con números de serie entre 1000 y 3000 (QB2) y el Quantum Blue® Reader de 3.ª generación con números de serie superiores a 3000 (QB3G).
- El lector QB2 debe encenderse y programarse para el ensayo Quantum Blue® fCAL high range (<CHR_0> or <CHR_900>) antes de iniciar la prueba (véase el manual del Quantum Blue® Reader).
- El lector QB3G debe encenderse y programarse para el ensayo Quantum Blue® fCAL high range ya sea usando la tarjeta de código de barras (B-CHR-BCC) o seleccionando la opción correspondiente en el menú de las pruebas (solo en el Fast Track Mode). Para más información, consulte el manual del Quantum Blue® Reader.
- Utilizar la tarjeta roja con chip RFID (QB2) / tarjeta de código de barras (QB3G) para cambiar los parámetros de prueba específicos de lote.
- Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción.
- Si no se usa directamente, las muestras diluidas deben almacenarse a 2-8 °C y deben usarse dentro de las doce horas siguientes.
- Es importante centrifugar los extractos con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ antes de la conservación (5 minutos a 3.000 x g). Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo.

OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS, ESTABILIDAD

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

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

Transporte de las muestras

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

Conservación de las muestras

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

Estabilidad de los extractos

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

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El procedimiento del ensayo consiste en tres pasos:

1. Extracción de las muestras de heces:

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

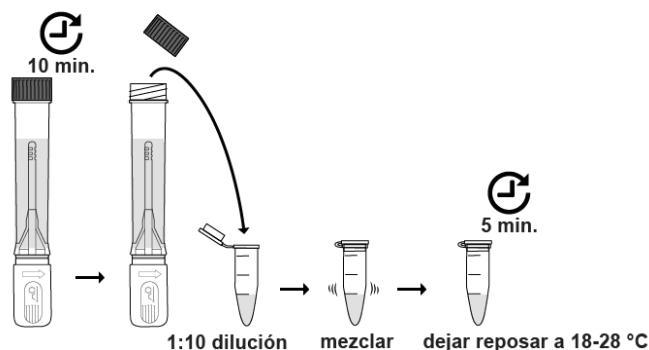
Dispositivo CALEX® Cap: Las muestras de heces líquidas se pueden pipetear directamente en el dispositivo CALEX® Cap. Desenroscar la tapa azul y pipetear 10 µl de muestra de materia fecal en el dispositivo. Volver a tapar el dispositivo CALEX® Cap y proceder con el paso de mezclado en vórtex de acuerdo 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 1:100 con tampón de extracción (por ejemplo, 20 µl de extracto y 1980 µl de tampón de extracción) y se mezcla bien. Dejar reposar las muestras diluidas 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 y diluir el sobrenadante 1:10 con tampón de extracción (e.g. 50 µL extracto y 450 µL tampón de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28 °C antes de proceder con el siguiente paso (paso 3).

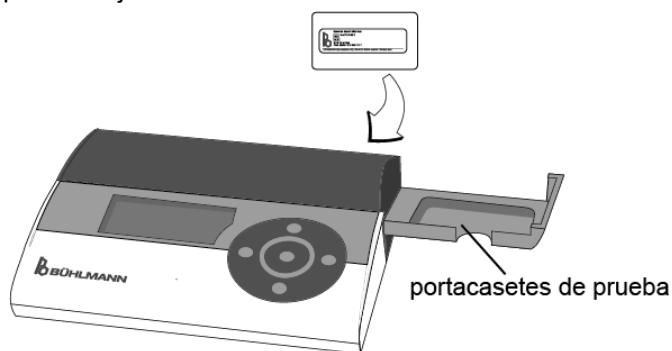


3. Procedimiento de ensayo de flujo lateral y lectura de los resultados:

QB2

En el Quantum Blue® Reader hay dos métodos alternativos disponibles: <CHR_900> (con cronómetro interno) y <CHR_0> (sin cronómetro interno). Seleccione uno de esos métodos antes de iniciar los experimentos.

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



QB3G

BÜHLMANN ofrece dos distintos modos de funcionamiento para medir muestras con el lector QB3G: el Fast Track Mode y el Fail Safe Mode. Antes de comenzar el ensayo, verifique en cuál de los modos está funcionando el lector. El método de prueba puede cargarse desde la tarjeta de código de barras (tanto en el Fast Track Mode como en el Fail Safe Mode) o, si se ha utilizado previamente, seleccionarse desde el menú de las pruebas (solo en el Fast Track Mode). En el Fast Track Mode, las mediciones pueden realizarse con el temporizador interno o sin él. Las mediciones en el Fail Safe Mode solo pueden realizarse con el temporizador interno.

Siga las instrucciones mostradas en la pantalla del lector QB3G. Puede consultar asimismo las guías rápidas del lector QB3G para el Fast Track Mode y el Fail Safe Mode.



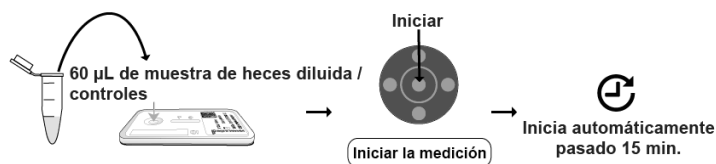
3.1. Método con cronómetro interno

QB2: seleccione el método < CHR_900> y cargue los parámetros específicos del lote desde la tarjeta roja con el chip RFID.

QB3G (Fast Track Mode): cuando el lector QB3G pregunte si omitir el tiempo de incubación, seleccione «NO»

QB3G (Fail Safe Mode): ajuste predeterminado

- Retire el casete de prueba de su embalaje. Añada 60 µL de extracto de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Cierre el soporte del cartucho de prueba e inicie la medición presionando el botón de iniciar en el lector QB2 o la opción «Iniciar medición» en el lector QB3G.
- El escaneo se inicia automáticamente pasados 15 minutos (900 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 sin cronómetro interno

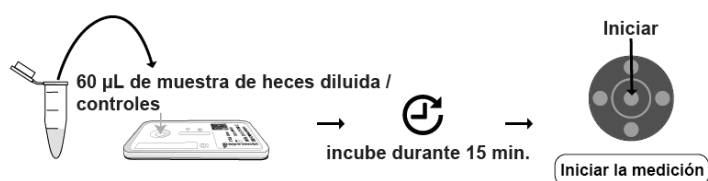
QB2: seleccione el método < CHR_0> y cargue los parámetros específicos del lote desde la tarjeta roja con el chip RFID.

QB3G (Fast Track Mode): cuando el lector QB3G pregunte si omitir el tiempo de incubación, seleccione «SÍ»

QB3G (Fail Safe Mode): opción no disponible

- Retire el casete de prueba de su embalaje. Añada 60 µL de extracto de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 15 minutos ± 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del Quantum Blue® Reader.
- Escanee inmediatamente el cartucho de prueba con el Quantum Blue® Reader presionando el botón de iniciar en el QB2 o la opción «Iniciar medición» en el QB3G.

- Para controles bajo / alto: Repita el paso 3.2 usando 60 µL de control en lugar de extracto de heces diluido.



Nota: Consulte el manual de su Quantum Blue® Reader para conocer las funciones básicas y los procedimientos de inicialización y funcionamiento de los lectores Quantum Blue® Reader, en particular cómo seleccionar los métodos de prueba y cómo cargar los parámetros específicos del lote desde la tarjeta con chip RFID (QB2) o la tarjeta de código de barras (QB3G) en el lector Quantum Blue®. Inserte correctamente el cartucho de prueba en el Quantum Blue® Reader, con la ventana de lectura primero (figura 1D).

CONTROL DE CALIDAD

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

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis con Quantum Blue® fCAL high range debe repetirse con un casete de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN

- Quantum Blue® fCAL high range está estandarizado con el BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL).
- El Quantum Blue® Reader utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. Esta curva de calibración específica del lote se genera con los valores medios ($n \geq 20$ mediciones cada uno) de 13 puntos de calibración obtenidos de diferentes muestras de heces con concentraciones conocidas de calprotectina. El rango de ensayo es entre 100 y 1800 µg/g.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por debajo de 100 µg/g pueden repetirse con el ensayo Quantum Blue® fCAL (código orden: LF-CAL25).

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit Quantum Blue® fCAL high range 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).
- 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 umbrales clínicos de 80 µg/g y 160 µg/g se establecieron con el ELISA fCAL® de BÜHLMANN (código

para pedidos: EK-CAL) utilizando los resultados de 58 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con SII y 131 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con EII. BÜHLMANN recomienda la siguiente interpretación de los resultados con el ensayo Quantum Blue® fCAL high range:

Concentración de calprotectina	Interpretación	Seguimiento
< 100 µg/g	Normal/ valor límite	Repetir el ensayo de la muestra con EK-CAL o LF-CAL25
100 – 160 µg/g	Valor límite	Seguimiento en un plazo de 4 a 6 semanas
> 160 µg/g	Elevado	Repetir según sea necesario

Tabla 3

Valores de calprotectina por debajo de 100 µg/g

Los valores de calprotectina fecal debajo de 100 µg/g son indicativos de una situación no inflamatoria o una inflamación leve en el intestino. Se puede considerar la posibilidad de repetir el ensayo de la muestra con el BÜHLMANN fCAL® ELISA (código para pedidos: EK-CAL) o Quantum Blue® fCAL (código para pedidos: LF-CAL25).

Valores de calprotectina entre o igual a 100 y 160 µg/g

Unos valores intermedios de calprotectina fecal de entre o igual a 100 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 entre 4 y 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 neutrofílico en el tubo gastrointestinal y pueden indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria activa. Se recomienda llevar a cabo los procedimientos de investigación especializados oportunos para alcanzar un diagnóstico clínico global.

Evaluación clínica

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

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 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

Umbral clínico 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

Las características indicadas a continuación han sido establecidas con el Quantum Blue® Reader de 1ª y 2ª generación y verificadas en el Quantum Blue® Reader de 3ª generación.

Las características indicadas aplican a las tres generaciones del Quantum Blue® Reader.

Comparación de los métodos

Sesgo en el punto de decisión clínica:

160 µg/g: -1.4% (IC 95%: -8.1 - 9.3%)

300 µg/g: -0.0% (IC 95%: -3.9 - 6.3%)

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se midieron 103 muestras clínicas con el ensayo Quantum Blue® fCAL high range y con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, siguiendo las instrucciones de uso. Se realizaron mediciones durante un período de tres días con dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. En la figura 2 se muestran los datos de correlación.

Precisión (repetibilidad): 20,0-22,7% CV

Precisión intralaboratorio: 22,4-28,1% CV

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio se establecieron conforme a la norma EP05-A3 del CLSI. Cinco muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina de entre 180 y 1224 µg/g fueron analizadas por un mismo operador durante un período de 20 días en dos series independientes cada día de dos copias cada una. En la tabla 11 se resumen los resultados.

Reproducibilidad: 19,2-28,9% CV

La reproducibilidad se determinó conforme a la norma EP05-A3 del CLSI realizando mediciones en tres distintos instrumentos Quantum Blue® Reader con tres distintos lotes de cartuchos de prueba. Cinco muestras de heces con concentraciones de calprotectina de entre 202 y 1'328 µg/g fueron analizadas durante un período de 5 días en una única serie de cinco copias. Cada uno de los instrumentos Quantum Blue® Reader fue manejado por un operador distinto situado en tres sitios distintos. En la tabla 12 se resumen los resultados.

Límite de blanco (LoB): 60 µg/g de calprotectina

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

Límite de detección (LoD): 100 µg/g de calprotectina

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

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

El LoQ se determinó con seis muestras clínicas con concentraciones de referencia de calprotectina de 59, 70, 82, 117, 148 y 166 µg/g, determinadas con el BÜHLMANN fCAL® ELISA, conforme a la norma EP17-A2 del CLSI. Se analizaron cinco copias de cada muestra por día durante un período de tres días, por un total de 90 valores. El estudio se realizó con dos lotes distintos de cartuchos de prueba. Se determinó el error relativo total mediante el

modelo de RMS a partir de estimaciones del sesgo y la precisión de cada muestra. Se representó el logaritmo del error relativo total frente a la concentración de calprotectina de referencia de las muestras. Se determinó el LoQ como el valor de intersección del modelo de regresión lineal obtenido de la gráfica con un criterio de aceptación del error relativo total del 30 %. En la tabla 13 se resumen los resultados.

Intervalo de linealidad: 67-2'153 µg/g de calprotectina

El intervalo de linealidad del ensayo Quantum Blue® fCAL high range se determinó conforme a la norma EP06-A del CLSI. Dos mezclas de muestra, con concentración alta y baja respectivamente, se mezclaron hasta obtener 17 valores distintos de concentración que abarcaran un intervalo que comprendiera todo el intervalo esperado. Se analizaron diez copias de las mezclas en dos lotes de cartuchos de prueba. El intervalo de linealidad se definió como el intervalo de valores de concentración en el cual los coeficientes de los ajustes de segundo y tercer orden resultan despreciables. En la figura 3 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

Linealidad de la dilución: 1:10-1:100

Una muestra clínica con una concentración estimada de calprotectina de 18'000 µg/g se diluyó en un tampón de extracción para obtener unas concentraciones predeterminadas de calprotectina de 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 y 1700 µg/g. Se practicó una ulterior dilución 1:10 de las muestras para obtener concentraciones de calprotectina que abarcaran el intervalo de medición del ensayo. Se analizaron cinco copias de las diluciones en dos lotes de cartuchos de prueba del ensayo Quantum Blue® fCAL high range. La linealidad de las diluciones obtenidas se determinó conforme a la norma EP6-A del CLSI. En los casos en los que los coeficientes de los ajustes de segundo o tercer orden resultaran no despreciables, se estableció un valor máximo aceptado de desviación de la linealidad del 20%, observándose una desviación superior del 10%. En la figura 4 se muestran los resultados para un lote de cartuchos de prueba.

Efecto gancho a dosis altas

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

PORTUGUÊS

USO PRETENDIDO

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

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

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

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

Tabela 1

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

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

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

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

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

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

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

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

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

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

Precauções técnicas

Componentes do kit

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

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- Note que há duas gerações de leitores: O Quantum Blue® Reader de 2ª geração com números de série entre 1000 e 3000 (QB2) e o Quantum Blue® Reader de 3ª geração com números de série acima de 3000 (QB3G).
- O leitor QB2 deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® fCAL high range (<CHR_0> ou <CHR_900>) antes do início do teste (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- O leitor QB3G deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® fCAL high range usando-se o cartão de código de barras (B-CHR-BCC) ou selecionando-se no menu do teste (somente para o Fast Track Mode). Para mais informações, consulte o manual do Quantum Blue® Reader.
- Utilize o cartão vermelho RFID (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) 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.
- Se não for utilizado diretamente, as amostras diluídas devem ser armazenadas a 2-8 °C e devem ser utilizadas dentro de doze horas.
- 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, ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS, ESTABILIDADE

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

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

Transporte das amostras

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

Armazenamento das amostras

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

Estabilidade dos extratos

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

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

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

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

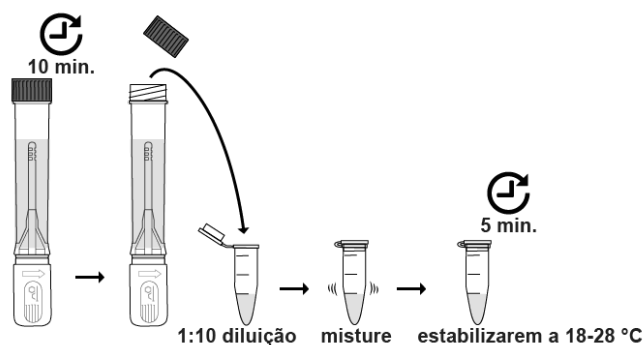
1. Extração das amostras de fezes:

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

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

2. Processamento de amostras:

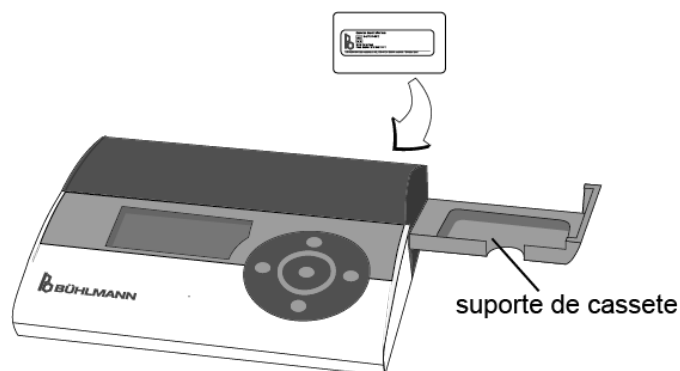
- Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:100 com tampão de extração (por exemplo: 20 µL do extrato e 1980 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, antes de continuar com o procedimento do teste. Abrir a tampa azul. Diluir o sobrenadante 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe o sobrenadante diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).



3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

QB2

Existem disponíveis dois métodos alternativos no Quantum Blue® Reader: <CHR_900> (com cronómetro interno) e <CHR_0> (sem cronómetro interno). Selecione um deles antes de iniciar o processo de leitura. Proceda à leitura do cartão chip RFDI vermelho, de forma a atualizar os parâmetros específicos do lote.



QB3G

Dois modos de operação diferentes são disponibilizados pela BÜHLMANN para a medição de amostras com o QB3G: Fast Track Mode e Fail Safe Mode. Antes do início do teste, informe-se para identificar o modo de operação do seu leitor.

O método de teste pode ser carregado a partir do cartão de código de barras (Fast Track Mode e Fail Safe Mode) ou selecionado no menu do teste, se já houver sido usado anteriormente (somente para o Fast Track Mode). As medições podem ser realizadas com ou sem um cronómetro interno no Fast Track Mode. No Fail Safe Mode, as medições somente podem ser feitas com um cronómetro interno.

Siga as instruções fornecidas na tela do QB3G. Também é possível consultar os Guias Rápidos do QB3G para o Fast Track Mode e o Fail Safe Mode.



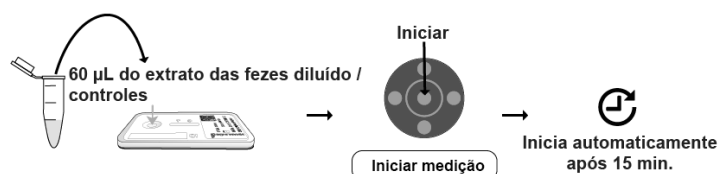
3.1. Método com cronómetro interno

QB2: selecione o método <CHR_900> e carregue os parâmetros específicos do lote a partir do Cartão RFID vermelho com chip.

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione “NÃO”

QB3G (Fail Safe Mode): configuração padrão

- Desembale o cassete do teste. Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no orifício de carga da amostra de cassete do teste.
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Feche o porta-cassete e inicie a medição pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 15 minutos (900 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 sem cronómetro interno

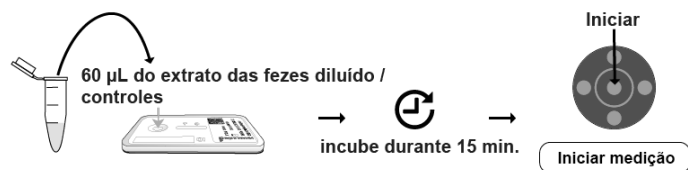
QB2: selecione o método <CHR_0> e carregue os parâmetros específicos do lote a partir do Cartão RFID vermelho com chip.

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione “SIM”

QB3G (Fail Safe Mode): opção não disponível

- Desembale o cassete do teste. Adicione 60 µL do extrato das fezes no orifício de carga da amostra de cassete de teste.
- Incube durante 15 minutos ± 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.

- Faça a leitura do cassete do teste com o Quantum Blue® Reader imediatamente pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- Para controles baixo / alto: Repita a etapa 3.2 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



Nota: Consulte o manual do Quantum Blue® Reader para conhecer as funções básicas e saber como inicializar e operar os Quantum Blue® Readers, especialmente como selecionar métodos de teste e como carregar parâmetros específicos a cada lote a partir do cartão RFID com chip (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) no Quantum Blue® Reader. Certifique-se de inserir o cassete do teste corretamente no Quantum Blue® Reader, começando pela janela de leitura (Figura 1D).

CONTROLE DE QUALIDADE

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

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a linha de 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 15 min de incubação (figura 1A), a concentração de calprotectina presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a linha de teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo Quantum Blue® Reader.
- Se apenas a linha de teste (T) for detectável após os 15 min de incubação (figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a linha de controle (C) nem a linha de teste (T) forem detectáveis após 15 min de incubação (figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete.
- 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 15 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL high range tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- O Quantum Blue® fCAL high range está estandardização com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL).
- O Quantum Blue® Reader utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. Esta curva específica do lote é gerada com os valores medianos ($n \geq 20$ medições cada) de 13 pontos de calibração obtidos a partir de diferentes amostras de fezes com concentrações de calprotectina conhecidas. A gama de calibração varia de 100 a 1800 µg/g.
- Para medições quantitativas, as amostras desconhecidas com valores superiores a 1800 µg/g podem ser diluídas 1:10 com o tampão de extração, e analisadas de acordo com o procedimento. O fator de diluição deve ser multiplicado pelo valor de concentração medido para obter o resultado final.
- Para medições quantitativas, amostras desconhecidas com leituras abaixo de 100 µg/g podem ser re-testadas no Quantum Blue® fCAL (referência: LF-CAL25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL high range 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).
- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) regularmente podem apresentar níveis elevados de calprotectina fecal.
- Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 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 limiares clínicos de 80 µg/g e 160 µg/g foram determinados com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (código de pedido: EK-CAL) usando resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DII. A BÜHLMANN recomenda a seguinte interpretação dos resultados para o teste Quantum Blue® fCAL high range:

Concentração de calprotectina	Interpretação	Acompanhamento
< 100 µg/g	Normal/ limítrofe	Retestar a amostra com o EK-CAL or LF-CAL25
100 – 160 µg/g	Limítrofe	Retorno dentro de 4-6 semanas
> 160 µg/g	Elevada	Repetir conforme necessário

Tabela 3

Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g

Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g não são indicativos da inflamação ou inflamação leve do trato gastrointestinal. Poderá levar-se em consideração retestar a amostra com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (código de pedido: EK-CAL) ou Quantum Blue® fCAL (código de pedido: LF-CAL25).

Valores de calprotectina entre 100 e 160 µg/g

Os níveis intermediários de calprotectina (entre 100 e 160 µg/g, inclusive), também conhecidos como níveis da zona cinzenta, não são diretamente indicativos de inflamação ativa que necessite de acompanhamento imediato com testes invasivos. Todavia, a presença de inflamação não pode ser descartada. A reavaliação dos níveis de calprotectina fecal depois de 4 a 6 semanas é recomendada para determinação do status inflamatório.

Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g

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

Avaliação clínica

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

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

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 85,4% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e a SII. A análise de

ROC resultou em uma curva AUC de 0,933 (consulte a tabela 6).

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

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).

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.

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 execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 7-18).

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

As seguintes características de desempenho foram estabelecidas com o Quantum Blue® Reader 1ª e 2ª Geração e foram verificadas no Quantum Blue® Reader 3ª Geração.

As características de desempenho indicadas se aplicam a todas as três gerações de leitores.

Comparação de métodos

Desvio no ponto de decisão clínica:

160 µg/g: -1.4% (ic de 95%: -8.1 - 9.3%)

300 µg/g: -0.0% (ic de 95%: -3.9 - 6.3%)

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Cento e três (103) amostras clínicas foram medidas de acordo com as instruções do teste Quantum Blue® fCAL high range e com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As medições foram realizadas por três dias usando-se dois lotes de cassetes de teste Quantum Blue® fCAL high range. Os dados de correlação podem ser vistos na figura 2.

Precisão (repetibilidade): 20,0-22,7% CV

Precisão intralaboratorial: 22,4-28,1% CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI. Cinco amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 180 e 1 224 µg/g foram avaliadas por um operador por 20 dias em duas corridas independentes por dia, com duas replicações por corrida. Os resultados do teste estão resumidos na tabela 11.

Reprodutibilidade: 19,2-28,9% CV

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, através de medições executadas em três Quantum Blue® Reader diferentes, com três lotes de cassetes de teste diferentes. Cinco amostras fecais extraídas com concentrações de calprotectina variando entre 202 e 1328 µg/g foram testadas por 5 dias em uma corrida com cinco replicações por corrida. Cada um dos Quantum Blue® Readers foi operado por um operador diferente em três locais diferentes. Os resultados estão resumidos na tabela 12.

Limite do branco (LoB): 60 µg/g de calprotectina

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

Limite de detecção (LoD): 100 µg/g de calprotectina

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

Limite de quantificação (LoQ): 100 µg/g de calprotectina

O LoQ foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, usando-se seis amostras clínicas com concentrações de referência de 59, 70, 82, 117, 148 e

166 µg/g de calprotectina determinadas com o BÜHLMANN fCAL® ELISA. As amostras foram medidas por três dias em cinco replicações por dia para produzir 90 valores. O estudo foi realizado com dois lotes de cassetes de teste diferentes. O erro relativo total foi calculado usando-se o modelo RMS a partir de estimativas de precisão e desvio de cada amostra. Os valores de erro relativo total foram transformados logaritmicamente e plotados contra as concentrações de referência de calprotectina das amostras. O LoQ foi definido como a intersecção do modelo de regressão linear obtido para a plotagem e o critério de aceitação de 30 % do erro relativo total. Os resultados estão resumidos na tabela 13.

Faixa linear: 67-2153 µg/g de calprotectina

A faixa linear do teste Quantum Blue® fCAL high range foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Dois pools de amostras, alto e baixo, foram misturados para se obter 17 níveis de concentração abrangendo toda a faixa de medição esperada. As misturas foram testadas em 10 replicações com dois lotes de cassetes de teste. A faixa linear foi definida como o intervalo de níveis de concentração nos quais os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordens não foram considerados significativos. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na figura 3.

Linearidade da diluição: 1:10-1:100

Uma amostra clínica com uma concentração estimada de 18'000 µg/g de calprotectina foi diluída no tampão de extração para se obter concentrações de 12'500, 10'000, 7500, 5000, 2500 e 1700 µg/g de calprotectina. As amostras foram submetidas a uma diluição adicional de 1:10 para se obter concentrações de calprotectina que correspondessem à faixa de medição do teste. As diluições foram então medidas em cinco replicações no teste Quantum Blue® fCAL high range, com dois lotes de cassetes de teste. A linearidade das diluições obtidas foi avaliada de acordo com a diretriz EP6-A do CLSI. Nos pontos em que os coeficientes de ajuste de segunda e terceira ordem foram considerados significativos, um desvio máximo da linearidade de 20 % foi permitido, sendo que nenhum desvio acima de 10 % foi observado. Os resultados para um lote de cassete de teste estão mostrados na figura 4.

Efeito gancho com dose elevada

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

APPENDIX I

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

Test Results

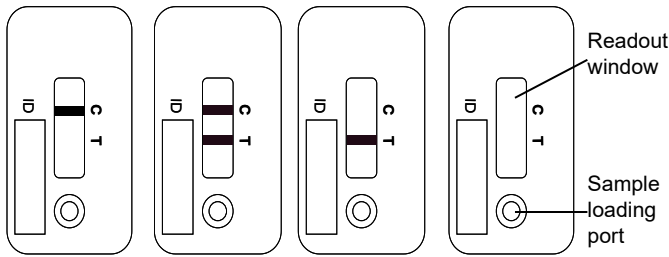


Figure 1A Figure 1B Figure 1C Figure 1D

Figure 1

Clinical Study – distinguishing organic disease from functional gastrointestinal disease

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

Table 4

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

Table 5

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

Table 6

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

Table 7

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

Table 8

non-IBD – IBS + other GI

CI – confidence interval

PPV – positive predictive value

NPV – negative predictive value

ROC AUC – area under receiver operating characteristic curve

Clinical Studies – IBD monitoring

Calprotectin ¹ vs IBD activity determined by endoscopic findings	Study 1 Spain (ref. 9)	Study 2 Spain (ref. 10)	Study 3 Australia, New Zealand (ref.11)
Patient number and demographics	89 (CD ²) Ages: 32-58 44% male	123 (UC ³) Ages: 18-85 66.4% male	99 (CD ² after resection) Ages: 29-47 46.5% male
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80.3%	53%

Table 9

¹ Study 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range
Study 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² CD = Crohn's disease patients

³ UC = Ulcerative Colitis patients

Clinical Studies – IBD monitoring

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

Table 10

¹ Study 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Study 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL and Quantum Blue® fCAL high range

² CD = Crohn's disease patients

³ UC = Ulcerative Colitis patients

APPENDIX I

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

Method Comparison

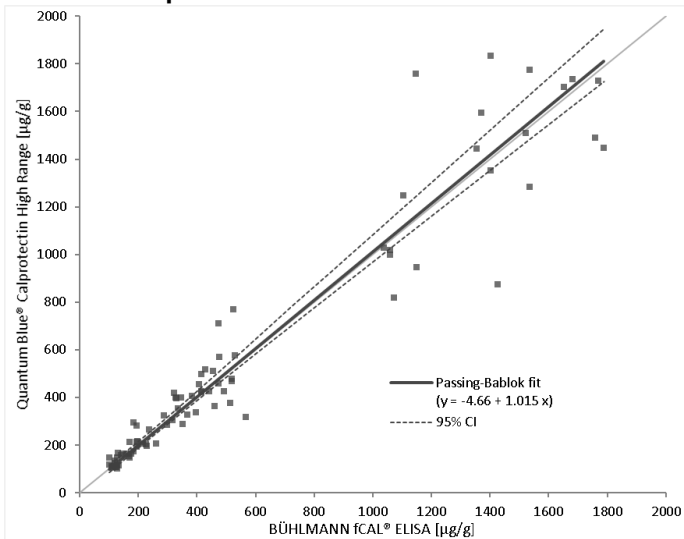


Figure 2

Linearity

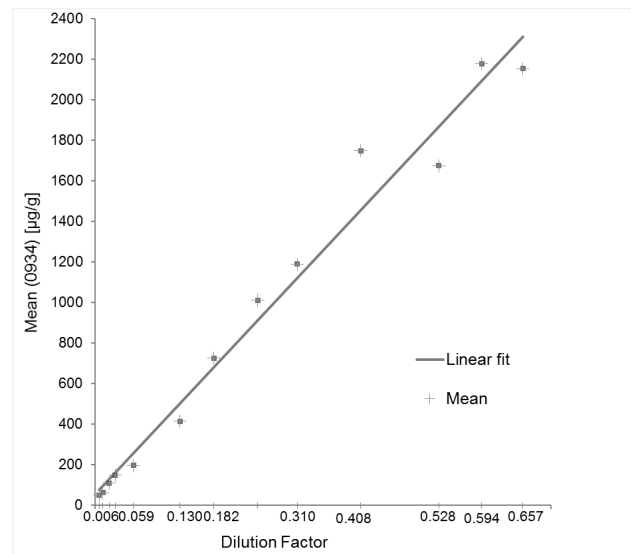


Figure 3

Within-Laboratory Precision

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

Table 11

Reproducibility

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

Table 12

Limit of Quantification

Sample	1	2	3	4	5	6
Reference value [µg/g]	99.72	132.75	148.49	165.47	82.65	80.45
Bias [µg/g] (Mean value obtained – reference value)	17.29	16.07	0.84	-0.03	12.50	21.26
Precision [% CV]	28	23	19	18	27	19
% Total Error	33	26	19	18	31	32
Intersection of linear regression with acceptance criterion of 30 % relative total error ² [µg/g]						97.2

Table 13

Dilution Linearity

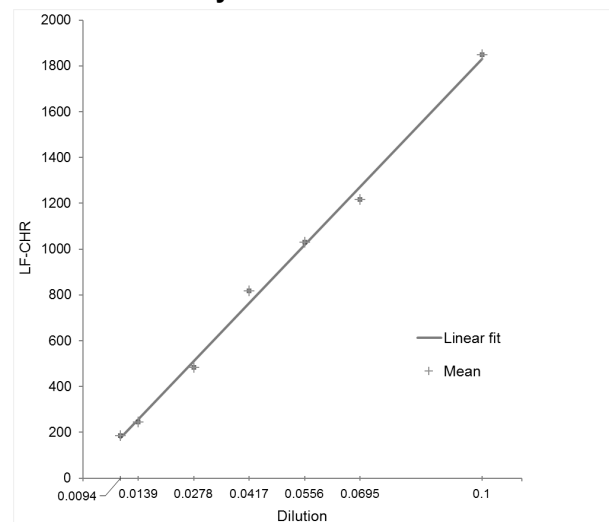


Figure 4

¹ Lot/Op/In. = Lot, Operator and Instrument

² The relative total error and the acceptance criterion were log transformed

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E.: *Measurement of calprotectin in faeces..* Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. 20,1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón Ortega T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreira-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreira-Iglesias R et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasso A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 9, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

APPENDIX IV

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 Produkt 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 V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

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

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura
TC	Test cassette Testkassette Cassette test Cassetta di rilevazione Casets de prueba Cassete do teste
BUF EX	Extraction buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción Tampão de extração
CONTROL L	Control low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle baixo
CONTROL H	Control high Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto
RCC	RFID chip card RFID Chipkarte Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFID Cartão chip RFID
BCC	Barcode Card Barcodekarte Carte à code-barres Carta con codice a barre Tarjeta con código de barras Cartão de código de barras

