



Quantum Blue[®] Calprotectin

**Quantitative
Lateral Flow Assay**

LF-CAL20-RD 20 tests

Revision date: 2010-06-02

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Assay is an immunoassay designed for the quantitative determination of Calprotectin in human stool samples (1-5) in combination with the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

The BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Assay is standardized with the BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cartridge vacuum-sealed in a foil bag	20 pieces	B-LFCAL-TC	
Extraction Buffer	1 bottle 120 ml	B-CAL-EX	Ready to use
Extraction Device	1 bag	B-CAL-RD20	20 Tubes 20 Base Caps 4x5 Spatulas
RFID Chip Card	1 piece	B-LFCAL-RCC	

Table 1

REAGENTS SUPPLIED UPON REQUEST

Controls for BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CAL20-RD can be ordered separately.

Controls Low* / High*	2 vials	B-CAL-CON	Ready to use
	0.5 ml		

* Lot specific concentration of Calprotectin

Table 2

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS/REAGENTS

Human Source Material: None of the reagents provided with this kit is of human origin.

Patient specimens should be handled as potentially biohazardous, taking appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortexing device for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-200 µl and 1 ml
- Centrifuge for Microtubes
- Eppendorf tubes for dilution of the extracts (1:16)
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)

- Gloves and Lab coat
- Soft tissues or blotting paper

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Using the Extraction Device included in the test kit, less than 100 mg of native stool is required.

Collect stool samples into clean tubes and store refrigerated at 2-8°C for up to 6 days.

Freezing of the sample may result in slightly increased Calprotectin values due to release from neutrophils present in the sample. Therefore, it is of advantage for longer storage, to keep the extracts at -20°C. The extracts are stable for at least 4 months.

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

ASSAY PROCEDURE

The Assay Procedure consists of two individual parts:

- Extraction of stool samples
- Lateral Flow Assay/Reading

The Assay Procedure is described and illustrated in details below on pages 15ff.

PROCEDURAL NOTES

- All reagents and test samples must be equilibrated at room temperature (18-28°C) before starting the assay. The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Calprotectin assay before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the Extraction Device. Avoid contamination with stool at the top of the tube.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to centrifuge the homogenized extracts. The centrifugation can be done either before or after the dilution step.
- Diluted samples should be used within several hours and cannot be stored for a longer time period.
- Undiluted extracts can be stored at -20°C for at least 4 months. It is important to centrifuge the extracts before storage (5 min at 3.000 x g). After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube.

QUALITY CONTROL

- A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by following this instruction for use accurately.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices, ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.

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 can not be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 12 minutes of incubation time (Figure

1A), the concentration of Calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1B), the Calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.

- If only the Test Line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the Calprotectin assay has to be repeated using another test cartridge.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the Calprotectin assay has to be repeated using another test cartridge.
- 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 lot-specific threshold after 12 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Calprotectin assay has to be repeated using another test cartridge.

STANDARDIZATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

- The Lateral Flow Assay is calibrated with the BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL).
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the Calprotectin concentration. This lot-specific standard curve is generated with the median values ($n \geq 5$ measurements each) from at least 10 Calibration points and at least five different stool samples with known Calprotectin concentrations. The assay range is between 30 and 300 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 300 µg/g should be further diluted (e.g. 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.
- Calprotectin values should be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.

EXPECTED VALUES

Estimation of faecal Calprotectin is a reliable and simple way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases.

The following data were established with the BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL). In a clinical study, 401 symptomatic consecutive patients scheduled for colonoscopy were investigated (Table 11). Endoscopy examination showed 273 patients with functional diseases, whereas 128 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulceration, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases).

ROC curve analysis (AUC: 0.935) resulted in a clinical cut-off at 50 µg/g. Applying this cut-off for the differentiation between organic and functional diseases, a clinical sensitivity and specificity of 84.4% and 94.5%, respectively can be reached. The suggested cut-off level for adults (<50 µg/g) can be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (6). While faecal Calprotectin levels from adults and children are comparable, levels of newborns can be significantly increased (5).

Therefore, samples **higher than 50 µg/g can be regarded as positive** and patients must be further investigated by colonoscopy or other tests for organic inflammation. It is recommended to re-test samples measured in the grey zone from 40 to 60 µg/g.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 15.6 %. The inter-assay precision of the Quantum Blue® Calprotectin assay was calculated from 7 extracted stool samples within the measurable range and divided into aliquots. The aliquots were tested 20 times each, according to the assay procedure. The values are presented in Table 12.

Analytical Sensitivity; Limit of Detection: <3 µg/g. Neat Extraction Buffer was tested 20 times according to the assay procedure. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values (in mV). The minimal detectable dose of Calprotectin was calculated to be clearly below 3 µg/g by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the generic standard curve for the corresponding lot of the test cartridge.

Functional Sensitivity; Limit of Quantification: <30 µg/g. Eleven different stool samples with values between 13.6 and 403.6 µg/g Calprotectin were assayed 20 times each according to the assay procedure. The %CV and the mean values were calculated for each sample. The limit of quantification corresponds to the concentration of Calprotectin with a precision below 20%CV. The resulting precision profile (Figure 2) allows the precise measurement within the range from 30 to 300 µg/g.

Dilution Linearity/Parallelism: 110 %. Four stool samples with elevated Calprotectin values were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Extraction Buffer and each dilution was subsequently assayed on two different test cartridges according to the assay procedure and averaged for each test point. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The results are presented in Table 13.

The Quantum Blue® Calprotectin assay is linear between 30 and 300 µg/g (Figure 3). Values higher than 300 µg/g should be diluted additionally (e.g. 1:10) for quantitative determination.

Spiking Recovery: 91 %. Four stool samples with low Calprotectin levels were spiked with different amounts from diluted human buffy coats containing high concentrations of Calprotectin. Each sample was measured before and after spiking on two different test cartridges according to the assay procedure. The results are presented in Table 14.

Method Comparison: $R^2=0.93$. 26 patients samples within the measurable range were analyzed using the Quantum Blue® Calprotectin assay and compared with the values obtained by the BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL). The linear regression analysis results in a coefficient of correlation of $R^2 = 0.93$, a slope of 1.02 and an intercept of 9.2 µg/g. The linear regression is presented in Figure 4.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® Calprotectin Test von BÜHLMANN ist ein Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin in humanen Stuhlproben (1-5). Der Test wird in Kombination mit dem Quantum Blue® Reader angewandt. Nur für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

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

Der Quantum Blue® Calprotectin Test wurde mittels des BÜHLMANN Calprotectin ELISA standardisiert (Art.-Nr.: EK-CAL).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Test Kassette In Folientasche vakuumiert	20 Stück	B-LFCAL-TC	
Extraktions-Puffer	1 Flasche 120 ml	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Extraktionsbesteck	1 Beutel	B-CAL-RD20	20 Röhrchen 20 Böden 4x5 Spatel
RFID Chipkarte	1 Stück	B-LFCAL-RCC	

Table 3

REAGENZIEN ERHÄLTICH AUF ANFRAGE

Kontrollen für BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CAL20-RD können separat bestellt werden.

Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen 0.5 ml	B-CAL-CON	Gebrauchsfertig
------------------------------	----------------------------	-----------	-----------------

Table 4

* Lot spezifische Calprotectin Konzentration

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Humanes Material: Keiner der Kitbestandteile enthält Material menschlicher Herkunft.

Alle Patientenproben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und mit den entsprechenden Vorsichts-massnahmen behandelt werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortexer für Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µl und 1 ml
- Zentrifuge für Mikroröhrchen
- Eppendorf Röhrchen für die Extraktverdünnung (1:16)
- Laborwecker (optional)

- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Handschuhe und Laborschürze
- Papiertücher und Fließpapier

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Für die Stuhlextraktion mit dem im Kit enthaltenen Besteck werden weniger als 100 mg native Probe benötigt.

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden und kann gekühlt bei 2-8°C bis zu 6 Tage gelagert werden.

Neutrophile Zellen in der Stuhlprobe können beim Einfrieren der Proben Calprotectin freisetzen. Aus diesem Grunde kann die Bestimmung aus gefrorenen Proben im Vergleich zu frischen Proben leicht höhere Werte ergeben. Deshalb sollten die Stuhlproben die bei ≤-20°C gelagert werden sollen, zuerst extrahiert und die Extrakte dann eingefroren werden. Tiefgefrorene Extrakte sind für mindestens 4 Monate stabil.

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

ARBEITSANLEITUNG

Die Arbeitsanleitung besteht aus zwei Teilen:

- Stuhlprobenextraktion
- Lateral Flow Test/Quantifizierung

Die Arbeitsanleitung wird auf Seite 15ff detailliert beschrieben und illustriert.

TECHNISCHE HINWEISE

- Sämtliche Reagenzien und Proben müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18-28°C) äquilibriert werden. Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Der Calprotectin Test muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten ist es wichtig, dass die im Extraktionsbesteck befindliche Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird. Kontaminationen am oberen Rand des Röhrchens sollten vermieden werden.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten ist es wichtig, dass die homogenisierten Extrakte zentrifugiert werden. Die Zentrifugation kann dabei sowohl vor, wie auch nach dem Verdünnungsschritt durchgeführt werden.
- Verdünnte Proben sollten innerhalb einiger Stunden abgearbeitet werden und können nicht für einen längeren Zeitraum gelagert werden.
- Unverdünnte Extrakte können bei -20°C für mind. 4 Monate gelagert werden. Es ist wichtig, dass die Extrakte vor der Lagerung zentrifugiert werden (5 min bei 3.000 x g). Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Ein vollständiges Verständnis dieser Arbeitsanleitung ist für den erfolgreichen Einsatz des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die genaue Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.
- Unsachgemässe Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.

Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Thermometer und Uhren/Laborwecker, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerungs- und Inkubationsbedingungen.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

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

STANDARDISIERUNG UND INTERPRETATION DER RESULTATE

- Der Lateral Flow Test wurde mit Hilfe des BÜHLMANN Calprotectin ELISA kalibriert (Art.-Nr.: EK-CAL).
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectin Konzentration eine Lot-abhängige Standardkurve. Diese Standardkurve wird über den Median (n≥5 Messungen) von 10 Kalibrationspunkten und fünf unterschiedlichen Stuhlproben mit einer bekannten Calprotectin Konzentration berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 300 µg/g.
- Für die quantitative Bestimmung von Proben mit Konzentrationen von über 300 µg/g müssen zusätzliche Verdünnungen (z.B. 1:5 oder 1:10) hergestellt werden. Der Gesamt-Verdünnungsfaktor muss mit dem Testergebnis multipliziert werden.
- Calprotectin Werte aus Stuhlproben sollen dem behandelnden Arzt als zusätzliche Information zur Diagnosestellung dienen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Bestimmung von Calprotectin aus Stuhlproben ist eine verlässliche und einfache Methode, um organische von

funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen zu unterscheiden.

Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN Calprotectin ELISA erhoben. In einer klinischen Studie wurde von 401 Patienten, bei denen eine endoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, Calprotectin im Stuhl untersucht (Table 11). Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 273 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 128 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen).

Die ROC Analyse (AUC: 0.935) ergab einen klinischen Grenzwert von 50 µg/g Calprotectin. Wendet man diesen Grenzwert bei der Unterscheidung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen an, kann eine klinische Spezifität von 84.4% und eine Sensitivität von 94.5% erreicht werden.

Calprotectin Werte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (5).

Proben mit Calprotectin Werten **grösser als 50 µg/g können als positiv betrachtet werden.** Die Patienten müssen mit Hilfe der Koloskopie/Gastroskopie oder weiteren Tests für organische Entzündungen abgeklärt werden. Es wird empfohlen, Proben im Graubereich zwischen 40 und 60 µg/g zu wiederholen.

LEISTUNGSMERKMALE

Inter-Assay Präzision: 15.6 %. Die Inter-Assay Präzision vom Quantum Blue® Calprotectin Test wurde aus 7 extrahierten und aliquotierten Stuhlproben, die innerhalb Messbereichs lagen, berechnet. Die Aliquots wurden entsprechend der Arbeitsanleitung je 20fach getestet. Die Werte sind in Table 12 angegeben.

Analytische Sensitivität (Detection limit): <3 µg/g. Extraktionspuffer wurde entsprechend der Arbeitsanleitung 20fach gemessen. Mittelwert und Standardabweichung der Absorptionswerte (in mV) wurden berechnet. Die minimal nachweisbare Menge an Calprotectin wurde bestimmt als die Konzentration beim Mittelwert der Absorption + 2 Standardabweichungen und liegt bei < 3µg/g.

Funktionelle Sensitivität (Limit of Quantification): <30 µg/g. Elf verschiedene Stuhlproben mit Werten zwischen 13.6 und 403.6 µg/g Calprotectin wurden entsprechend der Arbeitsanleitung 20fach gemessen. Der %VK und der Mittelwert wurden für jede Probe ermittelt. Die „funktionelle Sensitivität entspricht derjenigen Konzentration, die mit einer Präzision von <20% VK bestimmt werden kann. Nach dem resultierende Präzisionsprofil (Figure 2) können Proben zwischen 30 und 300 µg/g präzise gemessen werden.

Verdünnungslinearität: 110 %. Vier Stuhlproben mit erhöhten Calprotectin Werten wurden entsprechend der Arbeitsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Extraktions-Puffer verdünnt und jede Verdünnung wurde danach entsprechend der Arbeitsanleitung auf zwei Testkassetten getestet und die Resultate gemittelt. Die erwarteten Werte wurden an Hand der beobachteten Werten der ersten Verdünnung berechnet. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

Der Quantum Blue® Calprotectin Test ist zwischen 30 und 300 µg/g linear (Figure 3). Für eine quantitative Bestimmung sollten Proben mit Werten >300 µg/g zusätzlich verdünnt werden (z.B. 1:5 oder 1:10).

Wiederfindung: 91 %. Vier Stuhlproben mit tiefen Calprotectin Werten wurden mit unterschiedlichen Mengen an Calprotectin aus humanem Buffy Coat versetzt. Jede Probe wurde vorher und nachher entsprechend der Arbeitsanleitung auf zwei Testkassetten gemessen. Die Resultate sind in Table 14 angegeben.

Methodenvergleich: $R^2=0.93$. 26 Patientenproben innerhalb des messbaren Bereichs wurden mit dem Quantum Blue® Calprotectin Test gemessen und mit dem BÜHLMANN Calprotectin ELISA (order code: EK-CAL) verglichen. Die Lineare Regressionsanalyse ergibt einen Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0.93$, eine Steigung von 1.02, sowie einen Achsenabschnitt von 9.2 µg/g. Die lineare Regression ist in Figure 4 abgebildet.

FRANÇAIS

UTILISATION PREVUE

Le test de dosage immunologique BÜHLMANN, Quantum Blue® Calprotectin, est conçu pour la détermination quantitative de la calprotectine dans des échantillons de selle humaine (1-5) en association avec le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. Utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST DE DOSAGE

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

Le test de dosage BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin est standardisé avec le test calprotectine ELISA des Laboratoires BÜHLMANN (code de commande : EK-CAL).

RÉACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cartouche de test Scellée sous vide dans un sachet	20 pièces	B-LFCAL-TC	
Tampon d'extraction	1 flacon 120 ml	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Dispositif d'extraction	1 sac	B-CAL-RD20	20 tubes 20 capsules de base 4x5 spatules
Carte à puce RFID	1 pièce	B-LFCAL-RCC	

Table 5

REACTIFS FOURNIS SUR DEMANDE

Contrôles pour BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CAL20-RD peuvent être commandé séparément.

Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons	B-CAL-CON	Prêts à l'emploi
	0.5 ml		

Table 6

*Concentration du calprotectine specific pour chaque lot

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.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI DES REACTIFS

Matériel d'origine humaine : aucun des réactifs contenus dans ce kit n'est d'origine humaine.

Les échantillons des patients doivent être manipulés en utilisant des précautions appropriées, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Mixer vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à extrémités jetables : 10-200 µl et 1 ml
- Centrifugeuse pour microtubes
- Tubes Eppendorf pour la dilution des extraits (1/16)
- Minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande: BI-TR-ABS)
- Gants et blouse de laboratoire
- Mouchoirs jetables ou papier buvard (blotting paper sheets)

RECUEIL ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

La procédure nécessite moins de 100 mg de selle native par extraction en utilisant le dispositif d'extraction inclus dans de la trousse de dosage.

Recueillir des échantillons de selle dans des tubes propres et garder au réfrigérateur à 2-8°C pendant 6 jours maximum. La congélation de l'échantillon peut entraîner des taux légèrement augmentés de calprotectine en raison de la présence de neutrophiles dans l'échantillon. C'est la raison pour laquelle il est salubre pour une conservation plus longue de conserver les extraits à -20°C. Les extraits sont stables pendant 4 mois au moins.

Important : l'échantillon doit être recueilli sans adjonction d'aucun produit chimique ni biologique dans le dispositif de recueil.

PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage comporte deux parties individuelles :

- Extraction des échantillons de selle
- Dosage en flux latéral/lecture

La procédure de dosage est décrite et illustrée en détail ci-dessous page 18 et suivantes.

NOTES DE PROCEDURE

- Tous les réactifs et échantillons à tester doivent être équilibrés à température ambiante (18-28°C) avant de démarrer le dosage. Le Quantum Blue® Reader doit être mis en marche et programmé pour le dosage de calprotectine avant de commencer la procédure (voir le manuel de mode d'emploi du «Quantum Blue® Reader»).
- Afin de recevoir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction. Éviter toute contamination à l'extrémité supérieure du tube.
- Afin de recevoir des résultats fiables et quantitatifs, il est important de centrifuger les extraits homogénéisés. La centrifugation peut être effectuée soit avant soit après l'étape de dilution.
- Les échantillons dilués doivent être utilisés dans un délai de quelques heures et ne peuvent être conservés plus longtemps.
- Les extraits non dilués peuvent être conservés à -20°C pendant au moins 4 mois. Il est important de centrifuger les extraits avant de les conserver (5 min à 3000 x g). Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- La compréhension approfondie de ce mode d'emploi est nécessaire pour l'utilisation réussie du produit. Des

résultats fiables ne peuvent être obtenus très précisément qu'en suivant ce mode d'emploi.

- Les échantillons de patients qui ne sont pas manipulés correctement peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Si la précision du dosage n'est pas corrélée avec les limites établies et que la répétition exclut toute erreur technique, on vérifiera les paramètres suivants : i) pipetage, dispositifs de contrôle de la température et du temps, ii) date d'expiration des réactifs et iii) conditions de conservation et d'incubation.

VALIDATION DES RÉSULTATS

- Pour affirmer qu'un résultat de test est valable, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir Figures 1A et 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable de calprotectine n'est présente dans l'échantillon de selle. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1B), la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon de selle est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une cartouche de test fraîche.
- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une cartouche de test fraîche.
- 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 spécifique du lot au bout de 12 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une cartouche de test fraîche.

STANDARDISATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Le dosage en flux latéral est calibré avec le test calprotectine ELISA des laboratoires BÜHLMANN (code de commande: EK-CAL).
- Le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. Cette courbe standard, spécifique du lot, est générée avec les valeurs médianes (n≥5 mesures à chaque fois) provenant de dix points de calibrage et de cinq échantillons de selle différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de dosage mesurable est entre 30 et 300 µg/g.
- Pour des mesures quantitatives, la lecture d'échantillons inconnus au-dessus de 300 µg/g devrait s'accompagner d'une dilution supplémentaire (par exemple : 1/5 ou 1/10) avec un 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.

- Les valeurs de calprotectine devraient être utilisées comme données supplémentaires mises à la disposition du médecin dans le cadre de l'établissement d'un diagnostic.

VALEURS ESCOMPTEES

L'estimation de la calprotectine fécale est une manière simple et fiable de distinguer les maladies gastro-intestinales organiques des maladies fonctionnelles.

Les données suivantes ont été établies avec le test Calprotectine ELISA BÜHLMANN (code de commande: EK-CAL). Dans une étude clinique, on a étudié 401 patients symptomatiques consécutifs devant subir une coloscopie (Table 11). L'examen endoscopique a montré que 273 patients présentaient des maladies fonctionnelles tandis que 128 patients avaient différentes maladies organiques (colite, maladie de Crohn, ulcère, diverticulite, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses).

L'analyse des courbes ROC (ASC: 0,935) a permis d'établir une valeur seuil clinique optimale de 50 µg/g. Pour différencier une maladie organique d'une maladie fonctionnelle, l'application de ce seuil permet d'atteindre une sensibilité et une spécificité cliniques de 84,4% et de 94,5%, respectivement. Le niveau suggéré de la valeur seuil pour les adultes (<50 µg/g) peut être utilisé pour les enfants âgés de 4 à 17 ans des deux sexes (6). Tandis que les taux fécaux de calprotectine des enfants et des adultes sont comparables, les taux relevés chez le nouveau-né peuvent être significativement augmentés (5).

C'est la raison pour laquelle des échantillons **pour lesquels la mesure est supérieure à 50 µg/g peuvent être considérés comme positifs** et les patients doivent subir des examens supplémentaires par colonoscopie ou d'autres tests à la recherche d'une inflammation organique. Il est recommandé de re-tester des échantillons mesurés dans la zone grise qui va de 40 à 60 µg/g.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision inter-essai (Run-to-Run): 15,6 %. La précision inter-essai du système de dosage Quantum Blue® de la calprotectine a été calculée à partir de 7 échantillons de selles extraits dans la gamme mesurable et divisés en aliquots. Les aliquots ont été testés 20 fois chacun selon la procédure de dosage. Les valeurs sont présentées dans Table 12.

Sensibilité analytique; limite de détection: <3 µg/g. Le tampon d'extraction brut a été testé 20 fois selon la procédure de dosage. La moyenne et l'écart type ont été calculés pour les valeurs de l'absorbance (en mV). La dose minimale détectable de calprotectine a été calculée pour être clairement inférieure à 3 µg/g en ajoutant deux écarts types à l'absorbance moyenne et en reportant cette valeur sur la courbe d'étalonnage générée standard pour le lot correspondant de la cartouche de test.

Sensibilité fonctionnelle ; limite de quantification:

<30 µg/g. Onze échantillons de selle différents avec des valeurs de calprotectine comprises entre 13,6 et 403,6 µg/g ont été testés 20 fois chacun selon la procédure de dosage. Le % de CV et les valeurs moyennes ont été calculées pour chaque échantillon. La ligne de quantification correspond à la concentration de la calprotectine avec une précision en dessous de 20% de CV. Le profil de précision résultant (Figure 2) permet une mesure précise dans la gamme de 30 à 300 µg/g.

Linéarité /Parallélisme de la dilution: 110 %. Quatre échantillons de selles comportant des valeurs élevées de calprotectine ont été extraits selon la procédure de dosage.

Les extraits ont été dilués avec le tampon d'extraction et chaque dilution a été ensuite dosée sur deux cartouches de test différentes selon la procédure de dosage et une moyenne a été établie pour chaque point testé. Les valeurs attendues ont été calculées à partir de la valeur observée mesurée dans la première dilution. Les résultats sont présentés dans Table 13.

Le dosage de la calprotectine par Quantum Blue® est linéaire entre 30 et 300 µg/g (Figure 3). Des valeurs supérieures à 300 µg/g doivent faire l'objet d'une dilution supplémentaire (par exemple: 1/5 ou 1/10) pour une détermination quantitative.

Test de récupération: 91 %. Quatre échantillons de selles comportant des taux faibles de calprotectine ont été additionnés avec différentes quantités de couches leucocytaires humaines diluées contenant des concentrations élevées de calprotectine. Chaque échantillon a été mesuré avant et après ajout de la couche sur deux cartouches de test différentes selon la procédure de dosage. Les résultats sont présentés dans Table 14.

Comparaison des méthodes: $R^2=0,93$. 26 échantillons de patients situés dans la gamme mesurable ont été analysés avec le test de dosage de la calprotectine Quantum Blue® et comparés avec les valeurs obtenues avec le test calprotectine ELISA des laboratoires BÜHLMANN (code de commande : EK-CAL). L'analyse de régression linéaire entraîne un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,93$, une pente de 1,02 et une concentration de 9,2 µg/g. La régression linéaire est présentée en Figure 4.

ITALIANO

USO PREVISTO

Il dosaggio BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin è un immunodosaggio per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane (1-5) in associazione al BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. Solo per usi di laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione selettiva dell'antigene calprotectina tramite immunodosaggio sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura (mAb) altamente 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 in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione e della banda di controllo vengono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

Il dosaggio BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin è standardizzato con il BÜHLMANN Calprotectin ELISA (codice di ordinazione: EK-CAL).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Cartuccia di rilevazione sigillata a vuoto in busta laminata	20 unità	B-LFCAL-TC	
Tampone di estrazione	1 flacone 120 ml	B-CAL-EX	Pronto per l'uso
Sistema di estrazione	1 busta	B-CAL-RD20	20 provette 20 capsule di chiusura per la base 4x5 spatole
Carta chip RFID	1 unità	B-LFCAL- RCC	

Table 7

REAGENTI FORNITI SU RICHIESTA

I controlli (basso ed alto) che possono essere usati facoltativamente con il Kit Quantum Blue® LF-CAL20-RD deve essere ordinato separatamente.

Controlli (alto/basso)*	2 flaconi	B-CAL-CON	Pronto all'uso
	0.5 ml		

*concentrazioni di Calprotectina lotto specifiche

Table 8

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

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

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Materiale di origine umana: nessun reagente del presente kit è di origine umana.

Trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi e adottare misure precauzionali idonee.

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 µl e 1 ml
- Centrifuga per microprovette
- Provette Eppendorf per la diluizione degli estratti (1:16)
- Timer (facoltativo)
- Quantum Blue® Reader fornito da BÜHLMANN (codice di ordinazione: BI-POCTR-ABS)
- Guanti e camice da laboratorio
- Salviette o carta da blotting

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede meno di 100 mg di feci native per l'estrazione con il sistema di estrazione allegato al kit.

Raccogliere i campioni di feci in provette pulite e conservarli refrigerati a 2-8°C per un massimo di 6 giorni.

Il congelamento dei campioni può dare origine a valori di calprotectina leggermente aumentati, dovuti ai neutrofili presenti nel campione. Pertanto, per tempi di conservazione più lunghi, è opportuno conservare gli estratti a -20°C. Gli estratti sono stabili per almeno 4 mesi.

Importante: il campione deve essere prelevato senza l'aggiunta di sostanze chimiche o biologiche nel dispositivo di raccolta.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di due fasi distinte:

- estrazione dei campioni di feci
- dosaggio a flusso laterale/lettura

La procedura è descritta e illustrata in dettaglio a pagina 18 e seguenti.

NOTE PROCEDURALI

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18-28°C) prima di iniziare l'analisi. Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il dosaggio della calprotectina prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader).
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano omogeneizzati interamente con il sistema di estrazione. Evitare le contaminazioni nella parte superiore della provetta.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante centrifugare gli estratti omogeneizzati. La centrifugazione può essere effettuata prima o dopo la diluizione.
- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro alcune ore e non possono essere conservati più a lungo.
- Gli estratti non diluiti possono essere conservati a -20°C per almeno 4 mesi. È importante che gli estratti vengano centrifugati prima della conservazione (5 min. a 3.000 x g). Dopo la centrifugazione, il sovrantante deve essere trasferito in un criotubo nuovo.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Per un uso soddisfacente del prodotto è necessario comprendere a fondo le istruzioni per l'uso. Solo attenendosi scrupolosamente alle presenti istruzioni si otterranno risultati affidabili.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.

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

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la banda di controllo (C) deve in ogni caso essere visibile (vedere Figure 1A e 1B). Tale banda rappresenta unicamente un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la banda di rilevazione (T). Se la banda di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1A), nel campione di feci non sono presenti quantità rilevabili di calprotectina. Se la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1B), la quantità di calprotectina presente nel campione di feci viene calcolata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se solo la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1C), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una cartuccia nuova.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1D), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una cartuccia nuova.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa delle bande di rilevazione (T) e controllo (C), ciò costituisce un'ulteriore verifica della banda di controllo (C). Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica per ogni lotto dopo 12 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una cartuccia nuova.

STANDARDIZZAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Il dosaggio a flusso laterale è calibrato contro il BÜHLMANN Calprotectin ELISA (codice di ordinazione: EK-CAL).
- Il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto specifica per calcolare la concentrazione di calprotectina. Tale curva standard lotto specifica viene generata con i valori mediani (n≥ 5 misurazioni ciascuna) di 10 punti di taratura e cinque differenti campioni di feci con concentrazioni note di calprotectina. L'intervallo rilevabile del dosaggio è compreso tra 30 e 300 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazione superiore a 300 µg/g devono essere ulteriormente diluiti (ad es. 1:5 o 1:10) con tampone di estrazione e analizzati nuovamente con la medesima procedura. Il fattore di diluizione totale deve essere tenuto in considerazione per i calcoli finali.
- I valori di calprotectina rappresentano dati supplementari a disposizione del medico ai fini della diagnosi.

VALORI ATTESI

La determinazione della calprotectina fecale è un metodo affidabile e semplice per distinguere tra patologie gastrointestinali organiche e funzionali.

I dati seguenti sono stati ottenuti con il BÜHLMANN Calprotectin ELISA (codice : EK-CAL). In uno studio clinico sono stati valutati 401 pazienti sintomatici consecutivi in

attesa di colonscopia (Table 11). All'esame endoscopico, 273 pazienti sono risultati affetti da patologie funzionali, mentre 128 pazienti presentavano svariate patologie organiche (colite, morbo di Crohn, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, neoplasie maligne o malattie infettive). L'analisi della curva ROC (AUC: 0,935) ha evidenziato un valore soglia clinico ottimale a 50 µg/g. Applicando tale valore soglia, nella differenziazione tra patologie organiche e funzionali si ottengono valori di sensibilità e specificità clinica dell'84,4% e del 94,5%, rispettivamente. I valori soglia indicati per gli adulti (<50 µg/g) possono essere utilizzati anche per i bambini di età compresa tra 4 e 17 anni, indipendentemente dal sesso (6). Mentre negli adulti e nei bambini i livelli di calprotectina fecale sono paragonabili, i livelli riscontrati nei neonati possono essere aumentati in misura significativa (5).

Pertanto, i campioni con valori **superiori a 50 µg/g possono essere considerati positivi** e i pazienti devono essere sottoposti a ulteriori indagini tramite colonscopia o altri esami idonei in caso di infiammazione organica. Si raccomanda di analizzare nuovamente i campioni con valori compresi nell'intervallo incerto di 40 - 60 µg/g.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Precisione inter-dosaggio (da una seduta all'altra): 15,6 %. La precisione inter-dosaggio del dosaggio Quantum Blue® Calprotectin è stata calcolata con 7 estratti di campioni fecali compresi nell'intervallo rilevabile e suddivisi in aliquote. Ciascuna aliquota è stata analizzata 20 volte con la procedura prevista per il dosaggio. I valori sono riportati in Table 12.

Sensibilità analitica; limite di rilevabilità: <3 µg/g. Il tampone di estrazione puro è stato analizzato 20 volte con la procedura prevista per il dosaggio. Per i valori di assorbanza (in mV) sono state calcolate la media e la deviazione standard. La minima dose rilevabile di calprotectina è risultata nettamente sotto i 3 µg/g; il calcolo è stato effettuato sommando due deviazioni standard all'assorbanza media e intersecando tale valore con la curva standard generica del lotto corrispondente della cartuccia.

Sensibilità funzionale; limite di quantificazione: <30 µg/g. Undici differenti campioni di feci con valori di calprotectina compresi tra 13,6 e 403,6 µg/g sono stati analizzati 20 volte ciascuno con la procedura prevista per il dosaggio. Per ciascun campione sono stati calcolati il CV in % e i valori medi. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di calprotectina con precisione inferiore a CV 20%. Il profilo di precisione risultante (Figure 2) consente determinazioni precise nell'intervallo compreso tra 30 e 300 µg/g.

Linearità di diluizione/parallelismo: 110 %. Quattro campioni di feci con valori elevati di calprotectina sono stati estratti in base alla procedura prevista per il dosaggio. Gli estratti sono stati diluiti con tampone di estrazione e ogni diluizione è stata quindi analizzata con due cartucce differenti in base alla procedura prevista per il dosaggio; per ogni punto di misurazione è stata calcolata la media. I valori attesi sono stati calcolati a partire dai valori osservati con la prima diluizione. I risultati sono riportati in Table 13.

Il dosaggio Quantum Blue® Calprotectin è lineare nell'intervallo compreso tra 30 e 300 µg/g (Figure 3). I campioni con valori superiori a 300 µg/g devono essere ulteriormente diluiti (ad es. 1:5 o 1:10) per la determinazione quantitativa.

Recupero: 91 %. Quattro campioni fecali con bassi livelli di calprotectina sono stati addizionati con quantità differenti di buffy coat umani diluiti, contenenti alte concentrazioni di calprotectina. Ogni campione è stato analizzato prima e dopo l'aggiunta del buffy coat con due cartucce differenti, secondo la procedura prevista per il dosaggio. I risultati sono riportati in Table 14.

Confronto dei metodi: R²=0,93. Ventisei campioni di pazienti con valori compresi nell'intervallo rilevabile sono stati analizzati con il dosaggio Quantum Blue® Calprotectin e confrontati con i valori ottenuti con il BÜHLMANN Calprotectin ELISA (codice di ordinazione: EK-CAL). L'analisi di regressione lineare ha mostrato un coefficiente di correlazione di R² = 0,93, una pendenza di 1,02 e un'intercetta di 9,2 µg/g. La regressione lineare è riportata in Figure 4.

INDICACIONES DE USO

El análisis de calprotectina Quantum Blue® de BÜHLMANN es un inmunoanálisis ideado para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas (1-5) en asociación con el lector Quantum Blue® de BÜHLMANN. Sólo para uso de laboratorio.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El análisis permite la determinación selectiva del antígeno calprotectina mediante inmunoanálisis de emparejado (*sandwich*). Un anticuerpo de captura monoclonal (mAb), altamente específico para la calprotectina, está recubierto en la membrana de prueba. 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 después de añadir la muestra de heces extractada y diluida. El conjugado calprotectina / anticalprotectina oro se fija al anticuerpo anticalprotectina recubierto en la membrana de prueba (línea de prueba; banda de prueba). Las intensidades de la señal de la línea de prueba y la línea testigo se miden cuantitativamente mediante el lector Quantum Blue® de BÜHLMANN. El análisis de calprotectina Quantum Blue® de BÜHLMANN está estandarizado con el ELISA de calprotectina de BÜHLMANN (código para pedidos: EK-CAL).

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Cartucho de prueba sellado al vacío en una bolsa de aluminio	20 piezas	B-LFCAL-TC	
Tampón de extracción	1 frasco 120 ml	B-CAL-EX	Listo para usar
Dispositivo de extracción	1 bolsa	B-CAL-RD20	20 tubos 20 cápsulas de cierre de base 4 x 5 espátulas
Tarjeta chip RFID	1 pieza	B-LFCAL-RCC	

Table 9

REACTIVOS SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Los controles (alto y bajo) están pensados para análisis con BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CAL20-RD. El controlset puede ser pedido adicionalmente.

Controles(alto bajo)*	2 viales	B-CAL-CON	Listo para usar
	0.5 ml		

*concentration de calprotectin específico del lot.

Table 10

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

REACTIVOS

Material de origen humano: Ningún reactivo contenido en este equipo es de origen humano. Las muestras de los pacientes deberán manipularse como si fueran contagiosos y deberán tomarse las precauciones adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Aparato de vórtice para la extracción de heces.
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 a 200 µl y 1 ml.
- Centrífuga para microtubos.
- Tubos de Eppendorf para la dilución de los extractos (1:16).
- Cronómetro (optativo).
- Lector Quantum Blue® disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS).
- Guantes y bata de laboratorio.
- Pañuelos suaves o papel secante.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 100 mg de heces nativas por extracción usando el aparato de extracción incluido en el equipo de prueba.

Recójase las muestras de heces en tubos limpios y consérvese refrigerado a una temperatura entre 2 y 8 °C, hasta seis días.

La congelación de la muestra puede dar unos valores ligeramente aumentados de calprotectina debido a los neutrófilos presentes en la muestra. Por lo tanto, para una conservación más prolongada, es aconsejable conservar los extractos a -20 °C. Los extractos permanecen estables por lo menos durante cuatro meses.

Importante: La muestra debe recogerse sin ninguna adición química o biológica en el dispositivo de recogida.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

El procedimiento del análisis consiste en dos partes separadas:

- Extracción de las muestras de heces.
- Análisis de flujo lateral / lectura.

El procedimiento del análisis se describe e ilustra en detalles más adelante, en las páginas 21 y sgtes.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- Todos los reactivos y muestras de examen deben equilibrarse a temperatura ambiente (18 a 28 °C) antes de iniciar el análisis. El lector Quantum Blue® debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de calprotectina antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue®).
- A fin de recibir unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción. Evítese la contaminación en la parte superior del tubo.
- A fin de recibir unos resultados fiables y cuantitativos, es importante centrifugar los extractos homogeneizados. La centrifugación puede hacerse antes o después del paso de dilución.
- Las muestras diluidas deberán utilizarse en un plazo de varias horas y no pueden conservarse durante un tiempo más prolongado.
- Los extractos sin diluir pueden conservarse a -20 °C por lo menos durante cuatro meses. Es importante centrifugar los extractos 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.

CONTROL DE CALIDAD

- Para el uso satisfactorio de este producto es necesario un conocimiento cabal de estas instrucciones de uso. Se obtendrán unos resultados fiables sólo si se siguen precisamente estas instrucciones de uso.
- Las muestras de pacientes que no se manipulen correctamente pueden dar unos resultados inexactos.
- Si la precisión del análisis no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye los errores en la técnica, compruebe los siguientes puntos: i) pipeteado, control de la temperatura y aparatos de cronometrado; ii) fechas de caducidad de los reactivos, y iii) condiciones de conservación e incubación.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

ESTANDARIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- El análisis de flujo lateral se calibra con el ELISA de calprotectina de BÜHLMANN (código para pedidos: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® de BÜHLMANN utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. Esta curva estándar, específica del lote, se genera con las medianas de los valores ($n \geq 5$ determinaciones cada una) a partir de diez puntos de calibración y cinco muestras de heces diferentes con concentraciones de calprotectina conocidas. El intervalo cuantificable del análisis es de 30 a 300 µg/g.
- Para las determinaciones cuantitativas, las muestras desconocidas con una lectura superior a 300 µg/g deberán diluirse más (p. ej., 1:5 ó 1:10) con solución amortiguadora de extracción y deben analizarse de nuevo según el procedimiento. Para los cálculos finales debe tenerse en cuenta el factor de dilución resultando.

- Los valores de calprotectina deberán usarse como datos complementarios disponibles para el médico al establecer un diagnóstico.

VALORES ESPERADOS

El cálculo de la calprotectina fecal es una manera fiable y sencilla de distinguir las enfermedades digestivas orgánicas de las funcionales.

Se establecieron los siguientes datos con el ELISA de calprotectina de BÜHLMANN (código para pedidos: EK-CAL). En un estudio clínico, se investigó a 401 pacientes consecutivos sintomáticos, programados para una colonoscopia (Table 11). El examen endoscópico mostró a 273 pacientes con enfermedades funcionales, mientras que 128 pacientes sufrían diversas enfermedades orgánicas (colitis, enfermedad de Crohn, ulceración, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer o enfermedades inflamatorias).

El análisis de la curva ROC (AUC: 0,935) dio como resultado un valor umbral óptimo de 50 µg/g. Al aplicar este valor umbral, se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 84,4% y una especificidad del 94,5% en la diferenciación entre enfermedades orgánicas y funcionales. El valor umbral sugerido para los adultos (< 50 µg/g) puede usarse en los niños de 4 a 17 años, con independencia del sexo (6). Si bien las concentraciones fecales de calprotectina en los adultos y los niños son comparables, las concentraciones de los recién nacidos pueden estar significativamente aumentadas (5).

Por lo tanto, las muestras **superiores a 50 µg/g pueden considerarse positivas** y se debe investigar la presencia de inflamación orgánica en los pacientes mediante colonoscopia u otras pruebas. Se recomienda volver a examinar las muestras medidas en la zona gris de 40 a 60 µg/g.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión entre análisis (entre procesos): 15,6 %. Se calculó la precisión entre análisis del análisis de calprotectina Quantum Blue® a partir de siete muestras de heces extractadas dentro del intervalo cuantificable y se dividió en alícuotas. Las alícuotas se examinaron veinte veces cada una, según el procedimiento del análisis. Los resultados se presentan en Table 12.

Sensibilidad analítica (límite de detección): < 3 µg/g. La tampon de extracción se examinó veinte veces, según el procedimiento del análisis. Se calcularon la media y la desviación típica de los valores de la absorbancia (en mV). Se calculó la dosis detectable mínima de calprotectina como claramente inferior a 3 µg/g mediante la suma de dos desviaciones típicas a la absorbancia media y con la intersección de este valor con la curva estándar genérica para el lote correspondiente del cartucho de prueba.

Sensibilidad funcional (límite de cuantificación): < 30 µg/g. Se analizaron veinte veces once muestras diferentes de heces con valores entre 13,6 y 403,6 µg/g de calprotectina, según el procedimiento del análisis. Se calcularon el %CV y los valores medios de cada muestra. El límite de cuantificación corresponde a la concentración de calprotectina, con una precisión inferior a un CV del 20%. El perfil de precisión resultante (Figure 2) permite la determinación precisa dentro de los límites de 30 y 300 µg/g.

Linealidad y paralelismo de la dilución: 110 %. Se extrajeron cuatro muestras de heces con valores aumentados de calprotectina, según el procedimiento del análisis. Los extractos se diluyeron con el tampon de

extracción y cada dilución se analizó posteriormente en dos cartuchos de prueba diferentes, según el procedimiento del análisis, y se promediaron por cada punto de prueba. Los valores esperados se calcularon en multiplicar el factor de dilución con el valor observado que había encontrado con la primera dilución. Los resultados se presentan en Table 13.

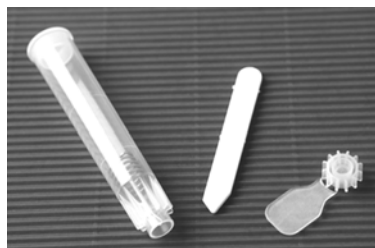
El análisis de calprotectina Quantum Blue® es lineal entre 30 y 300 µg/g (Figure 3). Los valores superiores a 300 µg/g deberán diluirse más (p. ej., 1:5 ó 1:10) para la determinación cuantitativa.

Recuperación de cantidades añadidas: 91 %. A cuatro muestras de heces con concentraciones bajas de calprotectina se añadieron diferentes cantidades conocidas de capas leucocíticas humanas diluidas que contenían concentraciones altas de calprotectina. Cada muestra se midió antes y después de añadir cantidades conocidas, en dos cartuchos de prueba diferentes, según el procedimiento del análisis. Los resultados se presentan en Table 14.

Comparación entre los métodos: $R^2 = 0,93$. Se analizaron 26 muestras de pacientes dentro de los límites cuantificables, usando el análisis de calprotectina Quantum Blue® y se compararon con los valores obtenidos mediante ELISA de calprotectina de BÜHLMANN (código para pedidos: EK-CAL). El análisis de regresión lineal da un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,93$, una pendiente de 1,02 y una intersección de 9,2 µg/g. La regresión lineal se presenta en Figure 4.

ENGLISH

DEUTSCH



Tools provided with the Extraction Device (from left to the right):

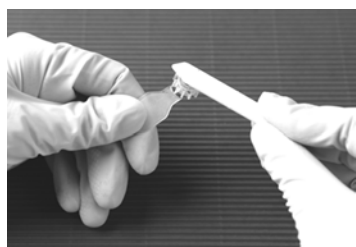
- Tube consisting of Body, Stopper Cap and Spiral Coil
- Spatula
- Base Cap with Sample Chamber and Tag

It is recommended to observe standard safety precautions when following the procedure below including wearing gloves.

Teile des Extraktionsbestecks (von links nach rechts):

- Gefäß bestehend aus Hülse, Stopfen und Spirale
- Spatel
- Boden mit Dosierkammer und Lasche

Es wird empfohlen die Standard-sicherheitsmassnahmen zu befolgen und Laborhandschuhe zu tragen.



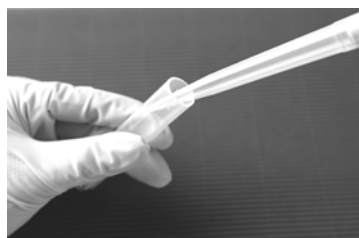
1. Label the empty tube with Patient ID.
2. Carefully press the sample into the hollow cavity (Sample Chamber) in the Base Cap and level off the surface.

1. Leeres Gefäß mit der Patienten-ID beschriften.
2. Stuhlprobe sorgfältig in die Dosierkammer des Bodens eindrücken und glattstreichen.



3. Firmly press the Tube onto the base cap and detach the Tag.

3. Hülse fest auf den Boden drücken und Lasche abreißen.



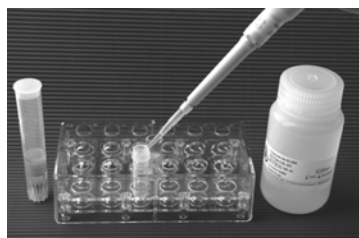
4. Remove the Stopper Cap at the top and Pipette 4 ml of the Extraction Buffer into the Tube and carefully recap the tube.

4. Den Stopfen abnehmen und 4 ml Extraktions-Puffer dazu pipettieren. Röhrchen mit dem Stopfen sorgfältig verschließen.



5. Homogenize the sample for at least 1 minute using a vibration mixer (e.g. Vortex mixer) at maximum speed until no large particles can be seen.

5. Mit Hilfe eines Vibrationsmixers (z.B. Vortex) den Stuhl mit maximaler Geschwindigkeit für mindestens 1 Min. homogenisieren bis sich alle größeren Partikel aufgelöst haben.



6. Sample preparation for measurement. Dilute extract in a fresh microtube 1:16, e.g. add 20 µl of the extract and 300 µl of Extraction Buffer. Vortex.
7. Centrifuge the diluted extract for 5 min at 3'000 x g*) and continue to the lateral flow assay procedure.

6. Probenvorbereitung für die Messung. In frischem Mikroröhrchen eine 1:16 Verdünnung durchführen, z.B. 20 µl Extrakt und 300 µl Extraktions-Puffer. Vortexen.
7. Den verdünnten Extakt für 5 Min bei 3'000 x g*) zentrifugieren und die weiter nach der Lateral Flow Arbeitsanleitung abarbeiten.

*) Alternatively the stool can be settled for 10 minutes. The supernatant has to be used for the lateral flow assay.

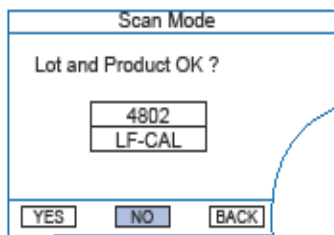
*) Alternativ Stuhl 10 Minuten sedimentieren, den Überstand anschliessend im Lateral Flow Test einsetzen.

ENGLISH



Make the Reader ready:
(see Appendix I or consult the Reader Manual).

- Press the ENTER Button for 1 second to turn on the Reader.
- Wait for the Self test and the Calibration check which are done automatically.
- Select <SCAN> and press ENTER.
- Select <Test Type> <CAL_720> and press ENTER.
- Select <User ID> and press ENTER.
- Select <SAMPLE ID> and press ENTER.
- Select <Next> and press ENTER.
- Confirm <Lot> ID and <Product> ID by selecting <Yes> and press ENTER.
<Product> ID must be <LF-CAL>.



Change lot-specific test parameters using the RFID Chip Card:
(mandatory if <Lot> ID displayed by the Reader is not identical with <Lot> ID printed on the label of the test cartridge or on the lot-specific QC data sheet delivered with the test kit).

Change <Lot> ID and <Product> ID by selecting <No> and press ENTER.

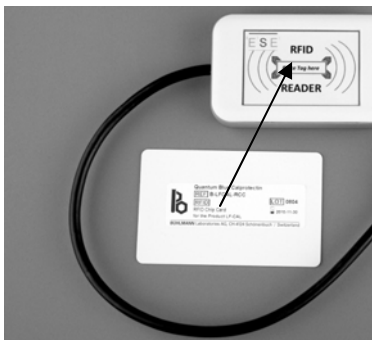
DEUTSCH

Vorbereitung Reader:
(siehe Appendix I oder Reader Anleitung).

- Drücke ENTER-Knopf für 1 Sek., um das Gerät zu starten.
- Auf den automatisch durchgeführten Selbsttest Kalibrations-Check warten.
- Wähle <SCAN> und drücke ENTER.
- Wähle <Test Type> <Cal 720> und drücke ENTER.
- Wähle <User ID> und drücke ENTER.
- Wähle <SAMPLE ID> und drücke ENTER.
- Bestätige <Batch-ID und Method-ID> durch ENTER Taste
- Bestätige <Lot> ID und <Product> ID mit <Yes> und drücke ENTER.
<Product> ID muss LF-CAL sein.

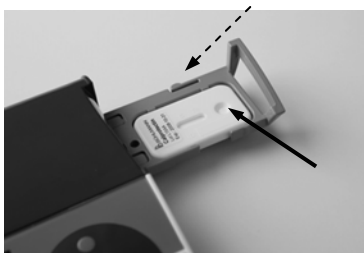
Die lotspezifischen Test Parameter werden mit Hilfe der RFID Chipkarte geändert:
Dieser Schritt ist zwingend erforderlich, wenn die vom Reader angezeigte <Lot> ID nicht identisch mit der auf dem Label der Testkassette oder nicht mit dem mit dem Kit versandten lotspezifischen QC Datenblatt übereinstimmt.

Ändern Sie <Lot> ID und <Product> ID mit <No> und bestätigen Sie mit ENTER.



Place the RFID chip card on the Tag position of the RFID Reader. The new lot-specific test parameters will be automatically transferred into the Firmware of the Reader. The reader is now ready to be used with the new Lot of the test kit.

Platzieren Sie die RFID Chipkarte auf die <Tag position> des RFID Readers. Die neuen lotspezifischen Test Parameter werden automatisch in die Firmware des Readers übertragen. Der Reader kann nun Kassetten des neuen Kit-Lots lesen.



Make the Calprotectin Cartridge ready:

Open the protective foil of the test cartridge by either tearing or cutting the foil with a pairs of scissors. Label the test cartridge with Patient ID.

Open the tray of the reader and Place the test cartridge on it.

Attention:

- To avoid mechanical wear do not press on the clamp on the backside (hatched arrow) while fixing the test cartridge into the tray.

Vorbereitung Calprotectin Testkassette:

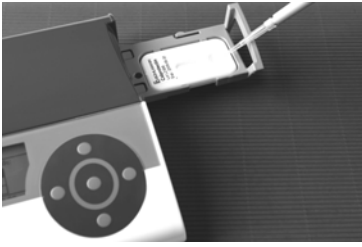
Schutzfolie der Testkassette durch Reißen oder mit Schere öffnen. Die Testkassette mit der Patienten ID beschriften.

Den Schlitten des Reader's öffnen und die Testkassette einsetzen.

Achtung:

- Um mechanische Abnutzung zu vermeiden, darf beim Einsetzen der Testkassette nicht auf die hintere Klemmvorrichtung gedrückt werden

- Make sure that the sample loading port is located on the right side as indicated on the figure by the arrow.



1. Load 60 ul of diluted and centrifuged stool extract onto the sample loading port of the test cartridge with a precision pipette.

- (gestrichelter Pfeil).
- Die Probeladevorrichtung muss sich auf der richtigen Seite befinden siehe Pfeil in Figur oben.

1. Lade 60 ul der verdünnten und zentrifugierten Probe mit einer Präzisionspipette auf die Probeladevorrichtung der Testkassette.



2. Immediately after loading, start the Timer by pressing the ENTER Button of the Reader.

Attention: To avoid contamination of the optical device of the Reader close the tray only after about 30 seconds.

2. Unmittelbar nach dem Laden muss der Timer durch drücken der ENTER Taste aktiviert werden.

Achtung: Um Kontaminationen der optischen Einheit zu verhindern, soll der Schlitten erst ungefähr 30 Sek später geschlossen werden.



3. After 12 minutes the test cartridge is automatically read and the test result calculated.^{*)}
4. Press ENTER Button to go back to the MAIN MENU.

Note: Results of the last 100 runs will be stored within the MEMORY MENU and can be recalled (see the Reader Manual).

3. Die Testkassette wird nach 12 Min. automatisch gelesen und das Resultat berechnet.^{*)}
4. Drücke den ENTER Knopf, um zum Hauptmenü zu gelangen.

Hinweis: Die Resultate der letzten 100 Messungen werden im MEMORY MENU gespeichert und können wieder aufgerufen werden (siehe Reader Anleitung).

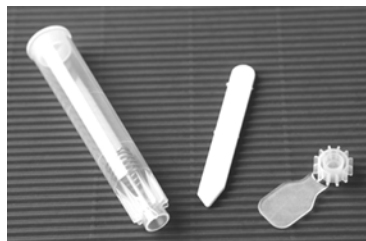
Alternatively, the test can be run in REMOTE MODE with additionally provided Software (LF Control). For instruction please refer to the manual of the software.

^{*)} Alternatively, the test cartridge can be measured (scanned) without the fixed test time of 12 minutes. For this, please select <Test Type> <CAL_0> and perform a "manual" timing of the 12-minutes incubation step.

Der Test kann auch mittels der mitgelieferten Software (LF-Control) in REMOTE MODE durchgeführt werden. Siehe entsprechende Software Anleitung.

^{*)} Alternativ kann die Testkassette ohne feste Zeiteinstellung gemessen werden. Dafür wählen Sie <Test Type> <CAL_0> und führen Sie die Zeitmessung der 12-minütigen Inkubation mit einem externen Timer durch.

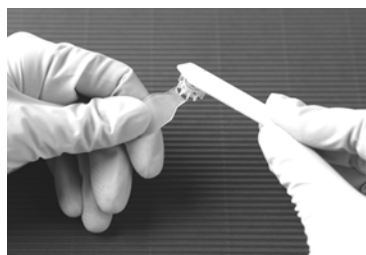
FRANCAIS



Outils fournis avec le dispositif d'extraction (de gauche à droite):

- Tube comportant un corps, un bouchon et une capsule de bouchage et une anse
- Spatule
- capsule de la base avec chambre d'échantillon et languette

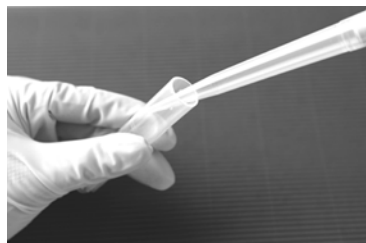
Il est recommandé d'observer les précautions de sécurité standard en suivant la procédure décrite ci-dessous, y compris le port de gants.



1. Etiqueter le tube vide avec l'identification du patient.
2. Presser soigneusement l'échantillon dans la cavité creuse (chambre de l'échantillon) présente dans la capsule de la base et égaliser la surface.



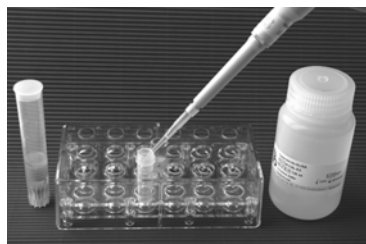
3. Appuyer fermement le tube sur la capsule de la base et détacher la languette.



4. Retirer la capsule de bouchage de l'extrémité et pipeter 4 ml du tampon d'extraction dans le tube ; reboucher ensuite le tube soigneusement.



5. Homogénéiser l'échantillon pendant au moins 1 minute en utilisant un mixer à vibrations (par exemple un mixer Vortex) à une vitesse maximum jusqu'à ce qu'aucune particule de grande taille ne soit visible.



6. Préparation de l'échantillon pour la mesure. Diluer l'extrait à 1/16 dans un microtube frais, par exemple, ajouter 20 µl de l'extrait et 300 µl du tampon d'extraction. Homogénéiser au Vortex.
7. Centrifuger l'extrait dilué pendant 5 min à 3 000 x g *) et continuer par la procédure de dosage en flux latéral.
*)Sinon, les extraits de selle sont laissés sédimentés durant 10 minutes et le surnageant peut être utilisé pur le dosage en flux latéral.

ITALIANO

Materiali forniti con il sistema di estrazione (da sinistra a destra):

- Provetta costituita da corpo, capsula di chiusura e spirale
- Spatola
- Capsula di chiusura per la base della provetta, con camera per campioni e linguetta

Si raccomanda di rispettare le precauzioni standard di sicurezza durante la procedura e di indossare guanti.

1. Contrassegnare la provetta vuota con il codice di identificazione del paziente.
2. Applicare con cura il campione, premendolo, nella cavità (camera per campioni) della capsula di chiusura per la base della provetta e livellare la superficie.

3. Premere con forza la provetta sulla capsula di chiusura per la base e staccare la linguetta.

4. Rimuovere la capsula di chiusura superiore e pipettare 4 ml di tampone di estrazione nella provetta, quindi richiuderla con attenzione.

5. Omogeneizzare il campione per almeno 1 minuto servendosi di un miscelatore vibrante (ad es. vortex) a velocità massima, fino alla scomparsa delle particelle di grandi dimensioni.

6. Preparazione dei campioni per l'analisi. Diluire l'estratto 1;16 in una microprovetta pulita, ad es. aggiungere 20 µl di estratto e 300 µl di tampone di estrazione. Vortexare.

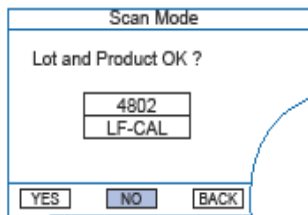
7. Centrifugare l'estratto diluito per 5 min. a 3.000 x g*) e procedere con il dosaggio a flusso laterale. *)In alternativa, l'estratto di feci può essere lasciato a sedimentare per 10 minuti, utilizzare poi il supernante (secondo procedura) per il dosaggio sulla card.

FRANCAIS



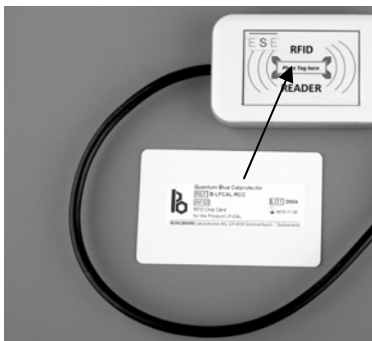
Préparer le lecteur : (voir annexe I ou consulter le mode d'emploi du lecteur Reader).

- Appuyer sur le bouton ENTER pendant 1 seconde pour mettre en route le lecteur.
- Attendre l'auto-test et le contrôle de calibrage qui s'effectuent automatiquement.
- Sélectionner <SCAN> et appuyer sur ENTER.
- Sélectionner <Test type> (type de test) <CAL_720>*) et appuyer sur ENTER.
- Sélectionner <User ID> (ID utilisateur) et appuyer sur ENTER.
- Sélectionner <Sample ID> (ID échantillon) et appuyer sur ENTER.
- Sélectionner <Next> (suivant) et appuyer sur ENTER.
- Confirmer l'ID <Lot> et ID <Product> (Produit) en sélectionnant <Yes> et appuyer sur ENTER. L'ID <Product> doit être <LF-CAL>.

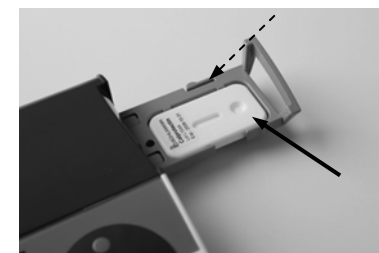


Modifier les paramètres de test spécifiques du lot en utilisant la carte à puce RFID: (obligatoirement si l'ID <Lot> affiché par le lecteur est différent de l'ID <Lot> indiqué sur l'étiquette de la cartouche de test ou sur la fiche technique QC spécifique du lot fournie avec le kit).

Modifier l'ID <Lot> et l'ID <Product> en sélectionnant <Non> et appuyer sur ENTER.



Placer la carte à puce RFID à l'emplacement Tag du lecteur RFID. Les nouveaux paramètres spécifiques du lot seront automatiquement transférés vers le micro-logiciel (Firmware) du lecteur. Le lecteur est maintenant prêt à être utilisé avec le nouveau Lot du kit de test.



Préparer la cartouche de calprotectine :

Ouvrir le feuillet protecteur de la cartouche de test en la déchirant ou en la coupant avec des ciseaux. Etiqueter la cartouche de test avec l'identification du patient.

Ouvrir le plateau du lecteur et placer la cartouche de test dessus.

Attention:

- pour éviter toute défaillance mécanique, ne pas s'appuyer sur la pince située à l'arrière (flèche hachurée) en fixant la cartouche dans le plateau de cette partie du dispositif.
- s'assurer que le port de chargement de l'échantillon est bien situé à

LATERAL FLOW ASSAY PROCEDURE ITALIANO

Preparare il lettore :

(vedere Appendice I o consultare il manuale del lettore).

- Premere il pulsante Enter per 1 secondo per accendere il lettore.
- Attendere che vengano effettuati automaticamente il test di autoverifica e il controllo di taratura.
- Selezionare <SCAN> e premere ENTER.
- Selezionare <Test type> (tipo di test) <CAL_720>*) e premere Enter.
- Selezionare <User ID> (ID utente) e premere ENTER.
- Selezionare <Sample ID> (ID campione) e premere ENTER.
- Selezionare <Next> (Prossimo) e premere ENTER.
- Confermare ID <Lot> (Lotto) e ID <Product> (prodotto) selezionando <Yes> (sì) e premere ENTER. ID <Product> deve essere <LF-CAL>.

Modificare i parametri del test specifici per ogni lotto servendosi della carta chip RFID: (obbligatorio se la ID <Lot> visualizzata sul lettore non è identica alla ID <Lot> riportata sull'etichetta della cartuccia di rilevazione o nella scheda di controllo qualità specifica per ogni lotto, fornita con il kit).

Modificare ID <Lot> e ID <Product> selezionando <No> e premere ENTER.

Collocare la carta chip RFID sulla posizione Tag del lettore RFID. I nuovi parametri specifici per il lotto verranno trasferiti automaticamente nel firmware del lettore. Il lettore è ora pronto per essere utilizzato con il nuovo lotto del kit.

Preparare la cartuccia per la calprotectina:

Aprire la pellicola protettiva della cartuccia, strappandola o tagliandola con le forbici. Contrassegnare la cartuccia con il codice di identificazione del paziente.

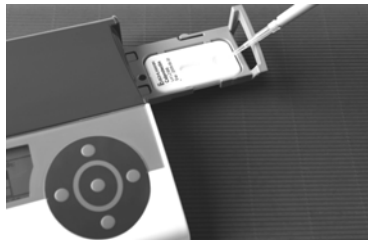
Aprire il vano portacartuccia del lettore e posizionarvi la cartuccia.

Attenzione:

- Per evitare il logoramento meccanico, non premere sul morsetto situato sulla parte posteriore (freccia tratteggiata) fissando la cartuccia nel vano da questo lato.
- Assicurarsi che la feritoia per il

droite, comme le montre la flèche du schéma.

caricamento dei campioni sia situata a destra, come indicato in figura dalla freccia.



1. Déposer avec une pipette de précision 60 µl d'extrait de selle diluée et centrifuger sur le port de chargement de la cartouche de test.

1. Caricare 60 µl dell'estratto di feci diluito e centrifugato nella feritoia per il caricamento dei campioni della cartuccia con una pipetta di precisione.



2. Immédiatement après le chargement, démarrer le minuteur en appuyant sur le bouton entré (ENTER) du lecteur.
- Attention: pour éviter toute contamination du dispositif optique du lecteur, attendre environ 30 secondes avant de fermer le plateau.

2. Immediatamente dopo aver caricato il campione, avviare il timer premendo il pulsante ENTER del lettore.
- Attenzione: Per evitare contaminazioni del dispositivo ottico del Lettore, chiudere il vano portacartuccia solo dopo circa 30 secondi.



3. Au bout de 12 minutes, la cartouche de test est lue automatiquement et le résultat du test est calculé *).
 4. Appuyer sur le bouton entré (ENTER) pour revenir au menu principal (MAIN MENU).
- Note: Les résultats des derniers 100 dosages effectués seront conservés dans le menu mémoire (MEMORY MENU) et peuvent être rappelés (voir le mode d'emploi du lecteur).

3. Dopo 12 minuti saranno stati effettuati la lettura automatica della cartuccia e il calcolo dei risultati*).
 4. Premere il pulsante ENTER per ritornare al menu principale (MAIN MENU).
- Nota: I risultati delle ultime 100 analisi vengono conservati nella memoria (MEMORY MENU) e possono essere nuovamente consultati (vedere il manuale del lettore).

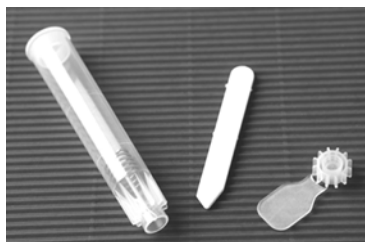
Le test peut aussi être effectué en mode télécommandé (REMOTE MODE) avec un logiciel supplémentaire fourni (LF Control). Les instructions figurent dans le mode d'emploi du logiciel.

*)Autrement, la cartouche de test peut être mesurée (scannée) sans le laps de temps fixe de 12 minutes. Pour cela, veuillez sélectionner <Type de test> <CAL_0> et chronométrer «manuellement» le temps d'incubation de 12 minutes.

In alternativa, il test può essere effettuato in REMOTE MODE con il software addizionale fornito (LF Control). Per le istruzioni si rimanda al manuale del software.

*)In alternativa, la cartuccia può essere letta (scannerizzata) senza il tempo prestabilito di 12 minuti. In tal caso, selezionare <Tipo di test> <CAL_0> e misurare manualmente i 12 minuti della fase di incubazione.

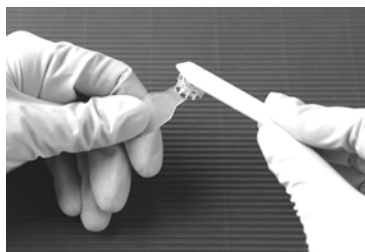
ESPAÑOL



Instrumentos suministrados con el dispositivo de extracción (de izquierda a derecha):

- Tubo consistente en cuerpo, cápsula de cierre de tapón y muelle espiral.
- Espátula.
- Cápsula de cierre de base con cámara para muestras y lengüeta.

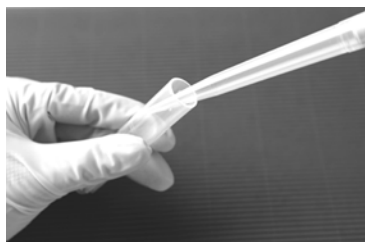
Se recomienda observar las precauciones de seguridad habituales al efectuar el siguiente procedimiento, incluso el uso de guantes



1. Rotule el tubo vacío con la identificación del paciente.
2. Oprima con cuidado la muestra en la cavidad hueca (cámara para la muestra) en la cápsula de cierre de base y nivele la superficie.



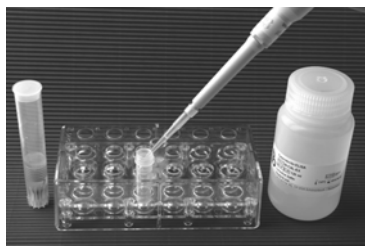
3. Oprima firmemente el tubo contra la cápsula de cierre de base y desprenda la lengüeta.



4. Extraiga la cápsula de cierre de tapón de la parte superior y pipetee 4 ml del tampon de extracción hacia el tubo, y vuelva a tapar con cuidado el tubo.



5. Homogenice la muestra por lo menos durante un minuto, con ayuda de una mezcladora de vibración (p. ej., mezcladora de vórtice), a la velocidad máxima, hasta que no se observen partículas grandes.



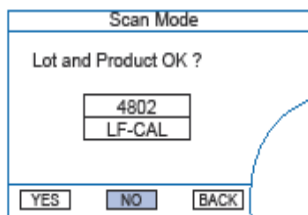
6. Preparación de la muestra para la medición. Diluya el extracto en un microtubo nuevo a 1:16, por ejemplo, añada 20 µl del extracto y 300 µl de la solución amortiguadora de extracción. Vórtice.
7. Centrifugue el extracto diluido durante 5 minutos a 3.000 x g*) y siga con el procedimiento de análisis por flujo lateral. *) En alternativa se puede dejar el extracto para 10 minutos, utilizando el sobrenadante en el analysis Quantum Blue®.

ESPAÑOL



Puesta a punto del lector :
(Vea el Apéndice I o consulte el Manual del lector).

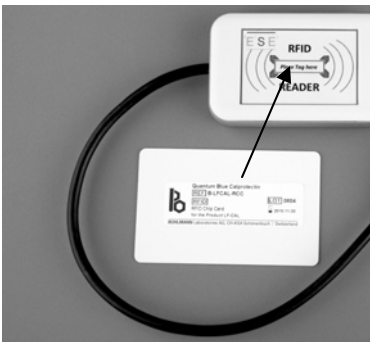
- Oprima el botón ENTER durante 1 segundo para poner en funcionamiento el lector.
- Espere a que terminen el autotest y la comprobación de calibración, que se ejecutan de forma automática.
- Seleccione <Scan> (Lectura) y oprima ENTER.
- Seleccione <Test type> (tipo de analysis) <CAL_720>*) y oprima ENTER.
- Seleccione <User ID> (ID de usuario) y oprima ENTER.
- Seleccione <Sample ID> (ID de muestra) y oprima ENTER.
- Seleccione <Next> (siguiente) y oprima ENTER.
- Confirme el ID de <Lot> (lote) y el ID de producto <Product> seleccionando <Yes> (Sí) y oprima ENTER. El ID de <Product> debe ser <LF-CAL>.



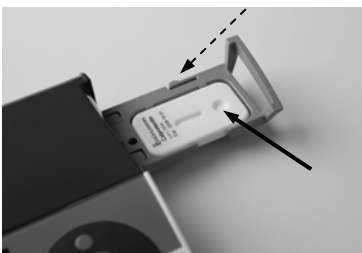
Modifique los parámetros de prueba específicos de lote utilizando la tarjeta con chip RFID:

(Paso obligatorio en caso de que el ID de <Lote> visualizado por el lector no coincida con el ID de <Lote> indicado en la etiqueta del cartucho de prueba o en la hoja de datos de CC específica del lote que se suministra con el equipo de prueba.)

Modifique el ID de <Lot> y el <ID> de product> seleccionando <No> y oprima ENTER.



Coloque la tarjeta con chip RFID en la posición de lectura de etiquetas del dispositivo RFID. Los nuevos parámetros de prueba específicos de lote se transferirán automáticamente al firmware del lector. Ahora, el lector está listo para ser utilizado con el nuevo lote del equipo de prueba.



Preparación del cartucho de calprotectina:

Abra la lámina de aluminio protectora del cartucho de prueba, rasgando o cortando la lámina con tijeras. Rotule el cartucho de prueba con la identificación del paciente.

Abra la bandeja del lector y coloque el cartucho de prueba sobre la misma.

Atención:

- Para evitar el desgaste mecánico, no oprima la rótula del lado trasero (flecha punteada) al fijar el cartucho en la bandeja de esta parte.
- Asegúrese de que el punto de acceso de carga de las muestras esté localizado a la derecha como se indica por la flecha de la

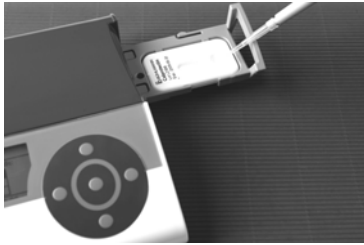


figura.

1. Con una pipeta de precisión, cargue 60 µl de extracto de heces diluido y centrifugado en el punto de acceso de carga de las muestras del cartucho de prueba.



2. Inmediatamente después de cargar, inicie el cronómetro, pulsando el botón “entrar” del lector.

Atención: Para evitar que el aparato óptico del lector se contamine, cierre la bandeja solo después de 30 segundos



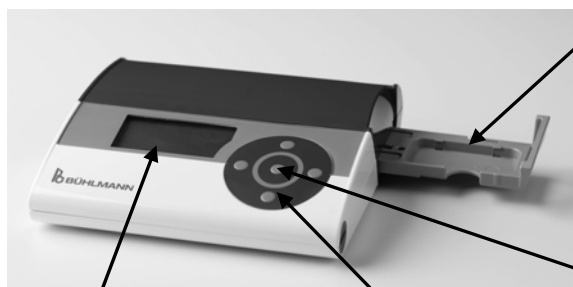
3. Después de 12 minutos, el cartucho de prueba se lee automáticamente y el resultado de la prueba se calcula.
4. Pulse el botón “entrar” para volver al MENÚ PRINCIPAL.

Nota: Los resultados de los 100 últimos procesos se guardarán en la memoria (Memory Menu) y pueden recuperarse (véase el manual del lector).

También puede procesar la prueba en MODO REMOTO, con el programa informático que se suministra aparte (LF-Control). Consulte las instrucciones en el manual del programa informático.

También existe la opción de medir (escanear) el cartucho de prueba sin ceñirse al tiempo de prueba fijado en 12 minutos. Para ello, seleccione <Test type> (tipo de analysis) <CAL_0> y cronometre “manualmente” los 12 minutos de la fase de incubación.

SHORT DESCRIPTION OF THE QUANTUM BLUE® READER, THE RFID READER AND THE RFID CHIP CARD



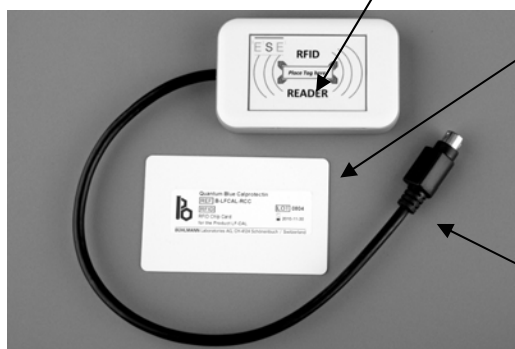
Screen (Display)
Bildschirmanzeige
Ecran
Monitore
Monitor

Loading Insert for test cartridge (Tray)
Ladestation für die Testkassette
Chargement de l'insert pour la cartouche de test (plateau)
Sede di caricamento della cartuccia (vano portacartuccia)
Punto de carga del cartucho de prueba (bandeja)

ENTER Button (central)
Zentraler ENTER-Knopf (in der Mitte)
Bouton ENTER (au milieu)
Pulsante ENTER (centrale)
Botón ENTER (central)

Piloting Buttons (top, bottom, left, right)
Navigierknöpfe (oben, unten, rechts, links)
Boutons de commande (haut, bas, gauche, droite)
Pulsanti di comando (superiore, inferiore, sinistro, destro)
Botones de dirección (arriba, abajo, izquierda, derecha)

Tag Position of RFID Reader (place RFID chip card here)
Etikettenposition des RFID Readers (Position für die RFID Chipkarte)
Emplacement Tag du lecteur RFID (placer la carte à puce RFID à cet endroit)
Posizione tag dell'RFIDlettore (collocare qui la carta chip RFID)
Posición de lectura de etiquetas del dispositivo RFID (sitúe aquí la tarjeta con chip RFID)



RFID Chip card
RFID Chipkarte
Carte à puce RFID
Carta chip RFID
Tarjeta chip RFID

Connecting Plug to the I/O port(s) of the Quantum Blue® Reader
Verbindungskabel zum I/O Port des Quantum Blue® Readers
Raccorder la fiche au(x) port(s) I/O du lecteur Quantum Blue® Reader
Presca di connessione alla(e) porta(e) I/O del lettore Quantum Blue®
Conexión del enchufe al puerto(s) de E/S del lector Quantum Blue®

Figure 1A

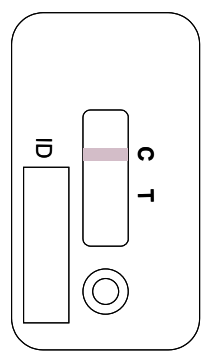


Figure 1B

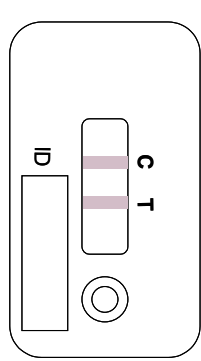


Figure 1C

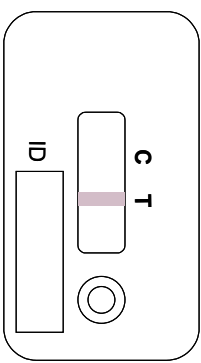


Figure 1D

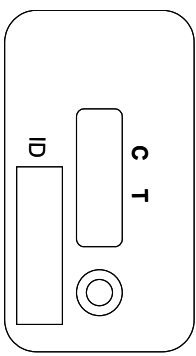


Table 11

Clinical Study

	Calprotectin (EK-CAL)	Lactoferrin
n	401	391
cut-off	50 µg/g	3 µg/ml
Sensitivity	84.4%	74.2%
Specificity	94.5%	91.0%
PPV	87.8%	79.3%
NPV	92.8%	88.4%
LR+	15.4	0.17
LR-	8.25	0.28

Table 12

Inter-Assay Precision

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
S2	32.9	5.4	16.4
S3	32.2	6.3	19.5
S4	62.2	9.5	15.4
S5	89.9	13.4	14.9
S6	138.0	18.0	13.0
S7	185.0	31.0	16.5
S8	271.0	37.3	13.8
Mean			15.6

Figure 2:

Precision Profile

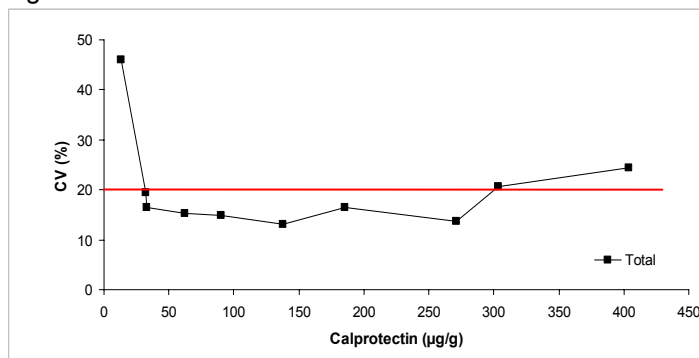


Table 13

Dilution Linearity/Parallelism

Sample	Dilution	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S 4	1:800	208	--	--
	1:1600	90	104	86
	1:3200	52	52	100
	1:6400	24	26	93
	Mean			93
S 5	1:800	149	--	--
	1:1600	75	75	101
	1:3200	53	37	141
	1:6400	24	19	129
	Mean			124
S 7	1:1600	224	--	--
	1:3200	126	112	112
	1:6400	60	56	107
	1:12800	30	28	107
	Mean			109
S 8	1:3200	254	--	--
	1:6400	150	127	118
	1:12800	71	63	112
	1:25600	28	32	88
	Mean			106
Mean				108

Figure 3:

Linearity Plot

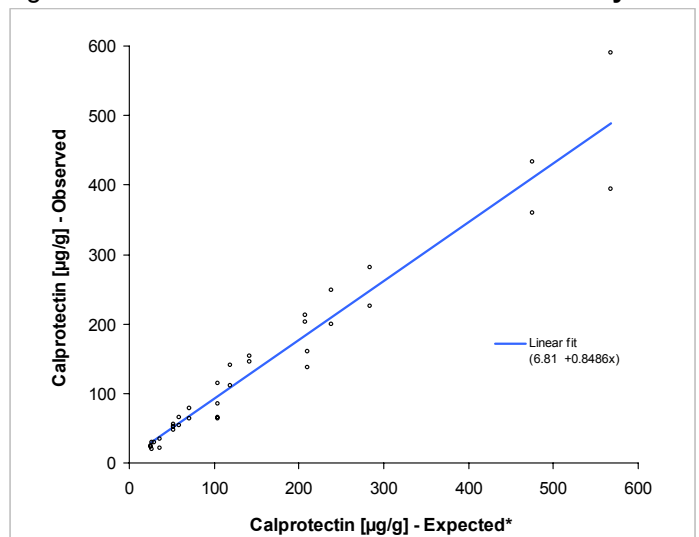


Table 14

Spiking Recovery

Sample	µg/g	spiked with [µg/g]	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
P1	52.5	25	62	78	79
		50	154	103	150
		100	143	152	94
		200	239	252	95
		265	272	318	86
	Mean				101
P2	81	25	107	106	101
		50	120	131	91
		100	162	181	89
		200	265	281	94
		265	357	346	103
	Mean				96
P3	56	25	77	81	94
		50	120	106	113
		100	110	156	71
		200	186	256	73
		265	272	321	85
	Mean				87
P4	160	25	153	185	82
		50	191	210	91
		100	190	260	73
		200	305	360	85
		265	337	425	79
	Mean				82
Mean					91

Figure 4:

Method Comparison

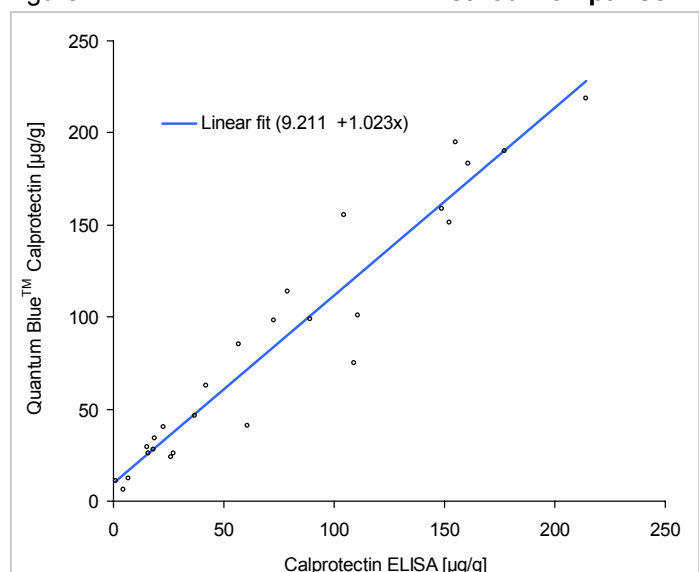


Table description: cf. "Standardization and Interpretation of Result", "Expected Values" and "Performance Characteristics" (pg. 3).

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. 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)
2. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet **356**, 1783-4 (2000)
3. Hessian PA and Fisher L: *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure*. Eur J Biochem **268**, 353-63 (2001).
4. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut **47**, 506-513 (2000).
5. 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)
6. 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)

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
	<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>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso

Symbol	Explanation
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Test Cartridge Test Kassette Cartouche de testi Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba
	Extraction Buffer Extraktions-Puffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción
	Extraction Device Extraktionsbesteck Dispositif d'extraction Sistema di estrazione Dispositivos de extracción
	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip



Printing Date
2010-06-11

Not for sale in the USA, due to current patent restrictions