



Quantum Blue[®] Calprotectin High Range

**Quantitative
Lateral Flow Assay**

LF-CHR20 20 tests

Revision date: 2011-04-11

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range is an immunoassay designed for the quantitative determination of elevated Calprotectin concentrations 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) being highly specific for Calprotectin is coated onto the test membrane. A second monoclonal detection antibody conjugated to gold colloids is deposited onto the conjugate release pad and released into the reaction system after addition of the extracted and diluted stool sample. The Calprotectin/anti-Calprotectin gold conjugate binds to the anti-Calprotectin antibody coated on the test membrane (test line; 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.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cartridge vacuum-sealed in a foil bag	20 cartridges	B-LFCAL-TC	
Extraction Buffer	1 bottle 120 ml	B-CAL-EX	Ready to use
Chase Buffer	1 bottle 100 ml	B-CHR-CB	Dilution buffer; ready to use
RFID Chip Card	1	B-CHR-RCC	

Table 1

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal Extraction Devices described below are not delivered with the kit and either of them **has to be ordered** with the kit .

Smart-Prep	50 devices	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubes	B-CAL-SOFI
	Filled with 1.3 ml Extraction Buffer	

Table 2

Controls **can be ordered** separately.

Controls Low* / High*	2 vials, 0.5 ml	B-CHR-CONSET	Ready to use
------------------------------	--------------------	--------------	--------------

Table 3

* Lot specific concentration of Calprotectin

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

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

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-100 µl and 3 ml
- Centrifuge
- 5 ml polypropylene or polystyrene tubes for dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Gloves and Lab coat
- Soft tissues or blotting paper

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Using the Extraction Devices which can be supplied upon request, less than 1 g 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 additives in the collection device.

ASSAY PROCEDURE

The Assay Procedure consists of three steps:

1. Extraction of stool samples:

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

2. Sample processing:

- Dilute the extracts of the stool samples prior to using them for analysis 1:150 with Chase Buffer (eg. 20 µl sample and 3000 µl buffer).
- Vortex.
- Centrifuge the diluted extract for 5 min at 3'000 x g* and continue with the lateral flow assay procedure. Alternatively, the stool extract can be settled for 10 minutes.
- The supernatant has to be used for the lateral flow assay (refer to pages 18ff).

3. Lateral Flow Assay Procedure

The assay procedure is described and illustrated in details below on pages 18ff.

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 Calprotectin High Range (CHR_0 and CHR_900, respectively) 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.
- Diluted samples (stored at 2-8 °C) should be used within 24 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 15 minutes of incubation time (Figure 1A), the concentration of Calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1B), the Calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the Test Line (T) is detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the Calprotectin High Range assay has to be repeated using another test cartridge.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 15 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the Calprotectin High Range 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 threshold after 15 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Calprotectin High Range 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 ($n \geq 10$ measurements each) from at least 10 Calibration points obtained from different stool samples with known Calprotectin concentrations. The assay range is between 100 and 1800 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 1800 µg/g should be further diluted (e.g. 1:5) with Chase Buffer and assayed again according to the procedure. The resulting dilution factor must be multiplied by the measured concentration to obtain the final results.
- For quantitative measurements, unknown samples reading below 100 µg/g should be re-tested in the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin assay (order code: LF-CAL20).

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimised to measure human Calprotectin in extracted stool samples.
- Fecal Calprotectin values should be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- A Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® High Range Calprotectin rapid assay should be confirmed by measuring other biomarkers (such as C-Reactive Protein) or by repeating the Calprotectin test (with ELISA, order code EK-CAL, or using a second test cartridge) and comparing to the CDAI score and the clinical status of the patient, before any clinical and/or therapeutic decision is made.
- During therapy follow-up, a Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range rapid assay should be interpreted by comparing the result with previous ones and in the context of the patient's clinical picture.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <60 µg/g calprotectin. The LoB has been established in two independent runs using two different lots of Test Cartridges with a total of 60 blank values each using Chase Buffer as sample. The LoB has been calculated as the average of the two runs in accordance with CLSI protocol EP17-A.

Limit of Detection (LoD): 95 µg/g calprotectin. The LoD has been established with two stool extracts with concentrations of 62 and 128 µg/g. The samples were measured with three different lots of Test Cartridges in 2 runs per day over 10-20 days. The SD values were determined and therefrom the LoD has been calculated in accordance with CLSI protocol EP17-A. The data presented are the average of three different lots of Test Cartridges.

Limit of Quantification (LoQ):

Lower LoQ: <100 µg/g calprotectin.

Upper LoQ: >1800 µg/g calprotectin.

The LoQ has been established with 11 stool extracts at concentrations between 24 and 2682 µg/g. Samples were measured with three different lots of Test Cartridges in 2 runs per day over 10-20 days. The Total Precision CV was determined, averaged for each sample and limit of 30% CV was applied.

Linearity: Serial dilution of four independent samples showed linearity between measured value and dilution factor within the indicated measuring range of 100-1800 µg/g ($R^2=0.985-0.996$) As an example, the medians of 4 replicates for each dilution of sample 1 are shown in Figure 2. The average difference between measured and expected concentrations was **3%** (recovery 103 %).

Recovery: 84-125%. Four stool extracts containing low calprotectin concentrations were spiked with different amounts from a highly concentrated calprotectin stock solution. Each sample was measured before and after spiking on three test cartridges according to the assay procedure. The three replicates were averaged and the mean values are presented in Table 16.

Repeatability: 21% CV. The repeatability of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated from

4 extracted stool samples containing between 128 and 917 µg/g calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in one run of 20 replicates set up within 10 minutes. The mean values of 4 different lots of Test Cartridges are presented in.

Between-day Precision: <10% CV. The between-day precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated according to CLSI protocol EP5-A2 from six stool extracts between 128 and 1324 µg/g calprotectin tested as two replicates per day over 10-20 days. The mean values of three different lots of Test Cartridges are presented in Table 17.

Total Precision: 25% CV. The total precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated according to CLSI protocol EP5-A2 from six stool extracts between 128 and 1324 µg/g calprotectin tested in two runs per day (1 in the morning, 1 in the afternoon) over 10-20 days. The mean values of three different lots of Test Cartridges are presented in Table 17.

Inter-lot Precision: 21.1% CV. The inter-lot precision of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay was calculated from 4 extracted stool samples containing between 128 and 917 µg/g calprotectin. Each sample was tested according to the assay procedure in three runs of 20 replicates each set up within 10 minutes using three different lots of Test Cartridges (n=60 replicates each). The inter-lot data of the 4 samples varied from 17.0 to 22.9% CV.

Method Comparison: $R^2 = 0.86-0.93$. 54 stool extracts from patients with suspected IBD exhibiting calprotectin concentrations within the indicated linear range of the Quantum Blue® Calprotectin High Range assay were analyzed according to the assay procedure using two different lots of Test Cartridges (Lot A and Lot B) in two runs each and compared with the values obtained by the BÜHLMANN Calprotectin ELISA, extended range (order code: EK-CAL). The correlations are presented in Table 18 and one example is illustrated in Figure 3.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® Calprotectin High Range von BÜHLMANN ist ein Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von erhöhten Calprotectin Werten 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.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Commentary
Test Kassette In Folientasche vakuumiert	20 Stück	B-LFCAL-TC	
Extraktionspuffer	1 Flasche 120 ml	B-CAL-EX	gebrauchsfertig
Laufpuffer	1 Flasche 100 ml	B-CHR-CB	Zur Verdünnung der Proben; gebrauchsfertig
RFID Chip Karte	1	B-CHR-RCC	

Table 4

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTlich

Stuhlextraktions Device

Extraktions Devices werden zur Stuhlextraktion benötigt, aber nicht mitgeliefert. Eines der beiden Devices muß zusätzlich zum Kit bestellt werden.

Smart-Prep	50 Extraktionsbestecke	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 Röhrchen	B-CAL-SOFI
	Gefüllt mit 1.3 ml Extraktionspuffer	

Table 5

Kontrollen können separat bestellt werden.

Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen, 0.5 ml	B-CHR- CONSET	Gebrauchsfertig
--------------------------------------	-------------------------	------------------	-----------------

Table 6

* 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 Vorsichtsmassnahmen behandelt werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µl und 1 ml
- Zentrifuge
- 5 ml Röhrchen für die Extraktverdünnung
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Handschuhe und Laborkittel
- Papiertücher und Fließpapier

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Für die Stuhlextraktion mit dem im Kit enthaltenen Besteck werden weniger als 1 g 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

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritte:

1. Extraktion der Stuhlproben

Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsbesteckes beschrieben.

2. Verarbeitung des Extraktes

- Die Stuhlextrakte 1:150 mit Laufpuffer (Verdünnungspuffer) verdünnen, bevor sie im Assay eingesetzt werden (z.B. 20 µl Extrakt und 3000 µl Puffer).
- Vortexen.
- 5 Minuten bei 3'000 x g* zentrifugieren. *Alternativ können die Extrakte auch 10 Minuten sedimentieren.
- Der Überstand wird anschließend im Lateral Flow Assay eingesetzt (s. S. 18ff.).

3. Lateral Flow Test/Quantifizierung

Die Assaydurchführung wird auf Seite 18ff. 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. Calprotectin High Range (CHR_0 bzw. CHR_900) 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.
- Verdünnte Proben, gelagert bei 2-8 °C, sollten innerhalb von 24 Stunden abgearbeitet werden und können nicht für einen längeren Zeitraum aufbewahrt 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 15 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Figur 1A), bedeutet dies, dass Calprotectin nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar ist, wird die Calprotectin Konzentration in der Stuhlprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation nur die Testbande (T) sichtbar ist (Figur 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar sind (Figur 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der 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≥10 Messungen) von mindestens 10 Kalibrationspunkten und unterschiedlichen Stuhlproben mit einer bekannten Calprotectin Konzentration berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 100 und 1800 µg/g.
- Für die quantitative Bestimmung von Proben mit Konzentrationen von über 1800 µg/g müssen zusätzliche Verdünnungen mit Laufpuffer (z.B. 1:5) hergestellt werden. Der Gesamt-Verdünnungsfaktor muss mit dem Testergebnis multipliziert werden.

- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, sollten Proben unter 100 µg/g mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Assay (order Code: LF-CAL20) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind zur Bestimmung von humanem Calprotectin in extrahierten Stuhlproben optimiert.
- Fecale Calprotectin Werte sollten als zusätzliches Hilfsmittel genutzt werden, um die Diagnosestellung des Arztes zu erleichtern.
- Ein Wert, der mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range rapid Assay ermittelt wurde, sollte mit der Messung anderer Biomarkers (wie des C-reaktiven Protein) oder durch Wiederholung der Calprotectinmessung bestätigt werden (mit dem ELISA, Bestellcode EK-CAL, oder unter Verwendung einer zweiten Testcartridge). Die Ergebnisse sollten mit dem CDAI Score und der Klinik des Patienten verglichen werden, bevor eine klinische oder therapeutische Entscheidung getroffen wird.
- Während des Therapie-Follow-ups sollte jedes, mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range Schnelltest Calprotectin erzielte Testergebnis, im Vergleich zu den Vorergebnissen und dem klinischen Bild des Patienten befundet werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <60 µg/g Calprotectin. Der LoB wurde in zwei unabhängigen Läufen unter Verwendung zweier verschiedener Cartridge Lots mit insgesamt 60 Blanks ermittelt. Als Probe wurde Chase Puffer verwendet. Der LoB wurde berechnet als Mittelwert der beiden Läufe, gemäss CLSI Protokoll EP17-A.

Limit of Detection (LoD): 95 µg/g Calprotectin. Der LoD wurde mit zwei Stuhlextrakten, die Konzentrationen zwischen 62 und 128 µg/g aufwiesen ermittelt. Die Proben wurden mit drei Lots von Cartridges in zwei Läufen/ Tag über einen Zeitraum von 10-20 Tagen bestimmt. Die Standardabweichung wurde definiert and davon anschliessend die LOD berechnet gemäß EP17-A. Die Abbildung zeigt den Mittelwert der drei verschiedenen Cartridge Lots.

Limit of Quantification (LoQ):

Unterer LoQ: <100 µg/g Calprotectin.

Oberer LoQ: >1800 µg/g Calprotectin.

Der LoQ wurde mit 11 Stuhlextrakten mit Konzentrationen zwischen 24 und 2682 µg/g bestimmt. Die Proben wurden über drei Lots Test Cartridges in 2 Läufen pro Tag über 10-20 Tage ermittelt. Die Total Präzision CV wurde für jede Probe ermittelt, indem ein CV von 30% zu Grunde gelegt wurde.

Linearität: Serielle Verdünnungen von vier Proben zeigten eine Linearität zwischen gemessenem Wert und Verdünnungsfaktor innerhalb des Messbereiches von 100-1800 µg/g ($R^2=0.985-0.996$). In Figure 2 sind die Ergebnisse von 4 verdünnten Proben als Median von jeweils 4 Replikaten pro Verdünnungsstufe dargestellt. Die mittlere Abweichung zwischen gemessenen und erwarteten Konzentrationen betrug 3 % (Wiederfindung 103%).

Wiederfindung: 84-125%. Vier Stuhlextrakte mit niedrigem Calprotectingehalt wurden mit verschiedenen Mengen einer hochkonzentrierten Stocklösung gespickt. Jede Probe wurde vor und nach dem Spiken mit drei Cartridges gemäß der Anleitung gemessen. Die drei Replikate wurden gemittelt und die Ergebnisse in Table 16 dargestellt.

Repeatability: 21% CV. Die Repeatability von Quantum Blue® Calprotectin High Range wurde mit Hilfe von 4 extrahierten Stuhlproben mit Calprotectin-Konzentrationen zwischen 128 and 917 µg/g bestimmt. Jede Probe wurde gemäss der Testanleitung in einem Ansatz von 20 Kassetten innerhalb von 10 Minuten angesetzt. Die Ergebnisse von vier verschiedenen Cartridge Lots wurden gemittelt und in Table 17 dargestellt.

Between-day Präzision: <10% CV. Die Between-day Präzision von Quantum Blue® Calprotectin High Range wurde gemäss dem CLSI Protokoll EP5-A2 von sechs Stuhlextrakten mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 128 and 1324 µg/g mit zwei Replikaten pro Tag über 10-20 Tage ermittelt. Die Ergebnisse von drei verschiedenen Cartridge Lots wurden gemittelt und in Table 17 dargestellt.

Total Precision: 25% CV. Die Total Präzision von Quantum Blue® Calprotectin High Range wurde ermittelt gemäss dem CLSI Protokoll EP5-A2 von sechs Stuhlextrakten mit Calprotectinkonzentrationen zwischen 128 and 1324 µg/g mit zwei Ansätzen pro Tag (1 am Morgen, 1 am Nachmittag) über 10-20 Tage ermittelt. Die Ergebnisse von drei verschiedenen Cartridge Lots wurden gemittelt und in Table 17 dargestellt.

Inter-lot Präzision: 21.1% CV. Die Inter-Lot Präzision von Quantum Blue® Calprotectin High Range wurde bestimmt mit Hilfe von 4 extrahierten Stuhlproben mit Calprotectingehalten zwischen 128 und 917 µg/g. Jede Probe wurde gemäss der Arbeitsanleitung mit drei Lots in jeweils drei Ansätzen mit je 20 Replikaten ermittelt, die innerhalb von 10 Minuten angesetzt wurden (jeweils n=60 Replikate). Die Inter-Lot Präzision der 4 Proben lag zwischen 17.0 to 22.9% CV.

Methodenvergleich: $R^2 = 0.86-0.93$. 54 Stuhlextrakte von Patienten mit Verdacht auf IBD, die Calprotectin Konzentrationen innerhalb des linearen Assaybereiches von Quantum Blue® Calprotectin High Range aufwiesen wurden gemäss der Testanleitung unter Verwendung von zwei Cartridge Lots (Lot A and Lot B) in zwei Ansätzen gemessen. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen verglichen, die im BÜHLMANN Calprotectin ELISA, extended range procedure (Bestellnummer: EK-CAL) ermittelt wurden. Die Korrelation ist in Table 18 aufgelistet und ein Beispiel in Figure 3 dargestellt.

FRANÇAIS

UTILISATION PREVUE

Le test de dosage immunologique BÜHLMANN, Quantum Blue® Calprotectin High Range, est conçu pour la détermination quantitative de concentrations élevées de 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.

RÉACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cartouche de test Scellée sous vide dans un sachet	20 pièces	B-LFCAL-TC	
Chase Buffer (tampon de dilution)	1 flacon 100 ml	B-CHR-CB	Prêt à l'emploi
Tampon d'extraction	1 flacon 120 ml	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CHR-RCC	

Table 7

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SUR DEMANDE

Tubes d'extraction de selles

Les tubes d'extraction de selles décrits ci-après ne sont pas inclus dans le kit. L'un au moins doit être commandé en même temps que le kit.

Smart Prep	50 tubes	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubes	B-CAL-SOFI
	Remplis avec 1.3 ml de tampon d'extraction	

Table 8

Contrôles peuvent être commandé séparément.

Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons, 0.5 ml	B-CHR- CONSET	Prêts à l'emploi
------------------------------	----------------------	------------------	------------------

Table 9

*Concentration en calprotectine spécifique pour chaque lot

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les composants du kit sont stables à 2-8°C jus qu'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
- Tubes de 5 ml pour la dilution des extraits
- 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 ECHANTILLONS

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

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 préférable 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 additif chimique ni biologique dans le dispositif de recueil.

PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage se déroule en 3 étapes :

1. Extraction des échantillons de selle:

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

2. Préparation des extraits:

- Avant la mesure les extraits de selle sont dilués au 1:150ème avec le tampon de dilution (ex : 20 µl d'extrait dans 3000 µl de tampon).
- Vortexer.
- Centrifuger l'extrait dilué pendant 5 min à 3000 x g* et passer à l'étape de mesure en flux latéral.
*Il est possible de laisser l'extrait décanter pendant 10 minutes.
- Le surnageant est utilisé pour le dosage en flux latéral (page 20 et suivantes).

3. Procédure de dosage en flux latéral:

La procédure est décrite et illustrée à la page 20 et les 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 High Range (CHR_0 et CHR_900) 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 (conservés à 2-8 °C) doivent être utilisés dans un délai de 24 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 15 minutes de temps d'incubation (Figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable de calprotectine n'est présente dans l'échantillon de selle. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 15 minutes de temps d'incubation (Figure 1B), la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon de selle est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 15 minutes de temps d'incubation (Figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une 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 15 minutes de temps d'incubation (Figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cartouche de test.

- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil au bout de 15 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non 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≥10 mesures à chaque fois) provenant d'au moins 10 points de calibrage et d'échantillons de selle différents dont la concentration en calprotectine est connue. La gamme de dosage mesurable est entre 100 et 1800 µg/g.
- Pour des mesures quantitatives, la lecture d'échantillons inconnus au-dessus de 1800 µg/g devrait s'accompagner d'une dilution supplémentaire (par exemple : 1/5) avec Chase Buffer (tampon de dilution) et le dosage devrait être effectué à nouveau selon la procédure. Le facteur de dilution résultant doit être pris en compte pour les calculs finaux.
- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs inférieures à 100 µg/g doivent être testés à nouveau avec le test de dosage Quantum Blue® de la calprotectine des laboratoires BÜHLMANN (code de commande : LF-CAL20).

LIMITATIONS

- 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. Les réactifs fournis dans ce coffret sont optimisés pour le dosage de Calprotectine dans les échantillons de selles.
- Les valeurs de Calprotectine des selles doivent être considérées comme des indications supplémentaires et permettre au médecin de poser un diagnostic.
- Confirmez toujours le résultat d'un dosage de calprotectine obtenu avec le dosage rapide Quantum Blue® Calprotectin High Range de BÜHLMANN en dosant d'autres marqueurs biologiques, comme la protéine C réactive, ou en répétant le dosage de la Calprotectine par ELISA (référence : EK-CAL) ou l'utilisation d'une seconde Cartouche d'essai. Comparez l'indice CDAI du patient à son état clinique avant de prendre quelque décision clinique et/ou thérapeutique que ce soit.
- Pendant le suivi thérapeutique, interprétez le résultat d'un dosage rapide de la Calprotectine à l'aide de Quantum Blue® High Range Calprotectin de BÜHLMANN en le comparant aux précédents, dans le contexte du tableau clinique du patient

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LOB) : < 60 µg/g de calprotectine. La LOB est mesurée dans deux analyses indépendantes, avec deux lots différents de Cartouches d'essai pour un total de 60 valeurs de blanc, chacune utilisant le tampon de

Chase au titre d'échantillon. La LOB est la moyenne des deux analyses, calculée selon le protocole CLSI EP17-A.

Limite de détection (LOD) : 95 µg/g de calprotectine. La LOD est établie à partir de deux extraits de selles à des concentrations de 62 et 128 µg/g. Les échantillons sont analysés avec trois lots différents de Cartouches d'essai à raison de 2 analyses par jour sur une période de 10 à 20 jours. La LOD est calculée à partir des valeurs d'écart-type selon le protocole CLSI EP17-A. Les résultats présentés sont les moyennes de trois lots différents de Cartouches d'essai.

Limite de quantification (LOQ) :

LOQ inférieure : < 100 µg/g de calprotectine.

LOQ supérieure : >1800 µg/g de calprotectine.

La LOQ est obtenue à partir de 11 extraits de selles à des concentrations comprises entre 24 et 2682 µg/g. Les échantillons sont analysés avec trois lots différents de Cartouches d'essai à raison de 2 analyses par jour sur une période de 10 à 20 jours. Le CV de la précision totale est calculé puis moyenné pour chaque échantillon. La limite de 30 % de CV est ensuite appliquée.

Linéarité : Des dilutions successives de quatre échantillons indépendants démontrent une linéarité entre la valeur mesurée et le facteur de dilution dans l'intervalle de mesure conseillé, 100 à 1800 µg/g ($R^2=0.985-0.996$). Les medianes des analyses quadruples de chaque dilution de l'échantillon 1 sont illustrées à titre d'exemple sur la Figure 2. La moyenne des différences entre les valeurs attendues et mesurées est de **3 %** (récupération 103%).

Récupération : 84-125 %. Quatre extraits de selles de faible concentration de calprotectine sont additionnés de diverses quantités d'une solution mère de calprotectine fortement concentrée. Chacun des échantillons est analysé avant et après l'addition sur trois Cartouches d'essai, selon le mode opératoire de dosage. Les moyennes des trois analyses d'un même échantillon sont présentées dans la Table 16.

Répétabilité : 21 % de CV. La répétabilité du dosage Quantum Blue® Calprotectin High Range est calculée à partir de 4 échantillons d'extraits de selles contenant entre 128 et 917 µg/g de calprotectine. Chaque échantillon est analysé selon le mode opératoire de dosage, en une analyse répétée 20 fois sur une période de 10 minutes. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de Cartouches d'essai sont répertoriées dans la Table 17.

Précision jour-à-jour : < 10 % de CV. La précision jour-à-jour du dosage Quantum Blue® Calprotectin High Range est calculée selon le protocole CLSO EP5-A2 sur six extraits de selles contenant entre 128 et 1324 µg/g de calprotectine, analysés en double tous les jours pendant 10 à 20 jours. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de Cartouches d'essai sont répertoriées dans la Table 17.

Précision totale : 25 % de CV. La précision totale du dosage Quantum Blue® Calprotectin High Range est calculée selon le protocole CLSO EP5-A2 sur six extraits de selles contenant entre 128 et 1324 µg/g de calprotectine, à raison de deux analyses par jour (une le matin, une l'après-midi) pendant 10 à 20 jours. Les valeurs moyennes pour quatre lots différents de Cartouches d'essai sont répertoriées dans la Table 17.

Précision inter-lots : 21.1%. La précision inter-lots du système de dosage Quantum Blue® de la Calprotectine High Range a été calculée à partir de 4 échantillons d'extraits de selles dont les valeurs de la calprotectine sont comprises entre 128 et 917 µg/g. Chaque échantillon a été mesuré selon la procédure de dosage sur 3 essais à 20 réplicats chacun préparés en 10 minutes avec 3 lots de Cartouches de test différentes. Les valeurs inter-lots des 4 échantillons varient de 17.0 à 22.9% de CV.

Comparaison des méthodes : $R^2 = 0,86-0,93$. 54 extraits de selles de patients souffrant potentiellement de MICI, dont la concentration en calprotectine est incluse dans l'intervalle linéaire conseillé du dosage Quantum Blue® Calprotectin High Range, sont analysés selon le mode opératoire de dosage avec deux lots différents de Cartouches d'essai (Lot A et Lot B), à raison de deux analyses chacun. Les résultats sont comparés aux valeurs obtenues avec le dosage ELISA-calprotectine BÜHLMANN étendu (référence : EK-CAL). Les corrélations sont répertoriées dans la Table 18. L'un des exemples est illustré sur la Figure 3.

USO PREVISTO

Il test BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range è un immunodosaggio per la determinazione quantitativa della calprotectina elevata in campioni di feci umane (1-5) in associazione con lo strumento per la lettura BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. Solo per uso di laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione quantitativa dell'antigene Calprotectina mediante un immunodosaggio a 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 nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione e della banda di controllo vengono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Card 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
Chase buffer (Tampone di diluizione)	1 flacone 100 ml	B-CHR-CB	Pronto per l'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-CHR-RCC	

Table 10

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

I dispositivi di estrazione delle feci descritti di seguito non sono forniti assieme al kit e occorre ordinare l'uno o l'altro di essi assieme al kit.

Smart-Prep	50 dispositivi	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 dispositivi	B-CAL-SOFI
	contenenti ciascuno 1.3 ml di tampone di estrazione	

Table 11

Il set di controlli (basso ed alto) che possono essere usati facoltativamente deve essere ordinato separatamente.

Controlli (alto/basso)*	2 flaconi, 0.5 ml	B-CHR- CONSET	Pronto all'uso
--------------------------------	----------------------	------------------	----------------

*concentrazioni di Calprotectina lotto specifiche

Table 12

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8°C fin o 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
- Provette di 5 ml per la diluizione degli estratti
- Timer (facoltativo)
- Quantum Blue® Reader fornito da BÜHLMANN (codice per ordini: BI-POCTR-ABS)
- Guanti e camice da laboratorio
- Salviette o carta da blotting

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Con il sistema di estrazione la procedura richiede meno di 1 g di feci native per l'estrazione.

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 additivi chimici o biologici nel dispositivo di raccolta.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

1. Estrazione dei campioni di feci:

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

2. Trattamento del campione:

- Diluire 1:150 gli estratti dei campioni di feci con tampone di diluizione prima di utilizzarli per l'analisi (Es. 20 µl di campione estratto + 3000 µl di tampone).
- Vortexare.
- Centrifugare l'estratto diluito per 5 min a 3.000 x g* e continuare con la procedura di dosaggio a flusso laterale.

*In alternativa, è possibile fare depositare l'estratto del campione di feci per 10 minuti.

- Per il dosaggio a flusso laterale utilizzare il surnatante (pagina 20 e seguenti).

3. Dosaggio a flusso laterale/lettura

La procedura è descritta e illustrata in dettaglio a pagina 20 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 (conservati a 2-8 °C) devono essere utilizzati entro 24 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 15 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 15 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 15 minuti di incubazione (Figura 1C), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 15 minuti di incubazione (Figura 1D), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.

- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa 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 dopo 15 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.

STANDARDIZZAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Il dosaggio a flusso laterale è calibrato contro il BÜHLMANN Calprotectin ELISA (codice di ordinazione: EK-CAL).
- Tale curva standard lotto-specifica viene generata con i valori mediani ($n \geq 10$ misurazioni ciascuna) da almeno 10 punti di taratura ottenuti da diversi campioni fecali con concentrazioni note di calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 100 e 1800 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazione superiore a 1800 µg/g devono essere ulteriormente diluiti (ad es. 1:5) con Chase buffer e analizzati nuovamente.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni inferiori a 100 µg/g dovrebbero essere ritestati con il saggio BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin (codice d'ordine: LF-CAL20).

LIMITAZIONI

- I valori di calprotectina rappresentano dati supplementari a disposizione del medico ai fini della diagnosi. I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per la misura della calprotectina umana in campioni di estratti fecali.
- I valori della calprotectina fecale rappresentano dati supplementari a disposizione del medico ai fini della diagnosi.
- Il risultato del test della calprotectina ottenuto con il dosaggio rapido BÜHLMANN Quantum Blue® High Range Calprotectin deve essere confermato misurando altri biomarcatori (come ad esempio la proteina reattiva C) o ripetendo il test della calprotectina (con ELISA, codice ordine: EK-CAL, o utilizzando una seconda cartuccia) e confrontando con il punteggio CDAI e lo stato clinico del paziente, prima di prendere qualsiasi decisione clinica e/o terapeutica.
- Nel seguire gli effetti della terapia, un risultato del test ottenuto con il dosaggio rapido BÜHLMANN Quantum Blue® High Range Calprotectin deve essere interpretato mediante confronto del risultato con i risultati precedenti, e nel contesto del quadro clinico del paziente.

PERFORMANCE

Limite del Bianco (LoB): <60 µg/g di calprotectina. Il LoB è stato stabilito in due run indipendenti utilizzando due diversi lotti di cartucce, con un totale di 60 valori di bianco ciascuna, utilizzando tampone di estrazione come campione. Il LoB è stato calcolato come la media di due run in conformità con il Protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A.

Limite di rilevabilità (LoD): 95 µg/g di calprotectina. Il LoD è stato stabilito con due estratti fecali con concentrazioni di 62 e 128 µg/g. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di cartucce in 2 run al giorno, per un periodo di 10-20 giorni. Sono stati determinati i

valori della deviazione standard (SD) e da essi è stato calcolato il LoD in conformità con il Protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A. I dati presentati sono la media di tre diversi lotti di cartucce.

Limite di Quantificazione (LoQ):

LoQ inferiore <100 µg/g di calprotectina.

LoQ superiore >1800 µg/g di calprotectina

Il LoQ è stato stabilito con 11 estratti fecali con concentrazioni comprese tra 24 e 2682 µg/g. I campioni sono stati misurati con tre diversi lotti di cartucce in 2 run al giorno, per un periodo di 10-20 giorni. È stato determinato il CV della precisione totale, calcolando la media per ciascun campione e applicando il limite del 30% di CV.

Linearità: La diluizione seriale di quattro campioni indipendenti ha mostrato una linearità tra valore misurato e fattore di diluizione all'interno dell'intervallo indicato di 100-1800 µg/g. Le medie di 4 repliche per ciascuna diluizione del campione 1 sono mostrate a scopo esemplificativo in Figure 2. La differenza media tra le concentrazioni misurate o osservate è stata del **3 %** (recupero 103 %).

Recupero: 84-125%. Quattro estratti fecali contenenti basse concentrazioni di calprotectina sono stati addizionati con quantità differenti da una soluzione stock contenente alte concentrazioni di calprotectina. Ciascun campione è stato misurato prima e dopo l'aggiunta su tre cartucce in base alla procedura prevista per il dosaggio. È stata calcolata la media di tre repliche; i valori medi sono presentati in Table 16.

Ripetibilità: 21% di CV. La ripetibilità del saggio con Quantum Blue® Calprotectin High Range è stata calcolata a partire da 4 campioni di estratti fecali contenenti tra 128 e 917 µg/g di calprotectina. Ciascun campione è stato analizzato con la procedura prevista per il dosaggio in un unico run di 20 repliche programmate entro 10 minuti. I valori medi di 4 diversi lotti di cartucce sono presentati in Table 17.

Precisione “da giorno a giorno”: <10% del CV. La precisione “da giorno a giorno” del saggio Quantum Blue® Calprotectin High Range è stata calcolata in conformità con il protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5-A2 da sei estratti fecali con concentrazione di calprotectina tra 128 e 1324 µg/g dosati come due repliche al giorno nell'arco di 10-20 giorni. I valori medi di tre diversi lotti di cartucce sono presentati in Table 17.

Precisione totale: 25% DEL CV. La precisione totale del saggio Quantum Blue® Calprotectin High Range è stata calcolata in conformità con il protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5-A2 da sei estratti fecali con concentrazione di calprotectina tra 128 e 1324 µg/g dosati in due run al giorno (1 al mattino e 1 al pomeriggio) nell'arco di 10-20 giorni. I valori medi di tre diversi lotti di cartucce sono presentati in Table 17.

Inter-lot Precision: 21.1% CV. La precisione inter-lotto del saggio Quantum Blue® Calprotectin High Range è stata calcolata su 4 campioni di estratti di feci contenenti tra i 128 e i 917 µg/g di calprotectina. Ogni campione è stato testato secondo le procedure del saggio in tre run di 20 repliche, ognuna programmata entro 10 minuti usando tre differenti lotti di cartucce test (n=60 repliche ciascuno). I dati inter-lotto dei 4 campioni variavano tra un CV di 17.0 a uno di 22.9%.

Confronto dei metodi: $R^2 = 0,86-0,93$. 54 estratti fecali da pazienti con sospetta malattia infiammatoria intestinale e concentrazioni di calprotectina comprese nell'intervallo lineare indicato del saggio Quantum Blue® Calprotectin High Range sono stati analizzati con la procedura prevista per il dosaggio, utilizzando due diversi lotti di cartucce (Lotto A e Lotto B) in due analisi ciascuna e i risultati sono stati confrontati con i valori ottenuti mediante la procedura BÜHLMANN Calprotectin ELISA a range esteso (codice ordine: EK-CAL). Le correlazioni sono presentate in Table 18 e un esempio è illustrato in Figure 3.

INDICACIONES DE USO

El ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range es un inmunoensayo diseñado para la determinación cuantitativa de concentraciones elevadas de calprotectina en muestras de heces humanas (1-5) en combinación con el lector BÜHLMANN Quantum Blue®. Para uso de laboratorio únicamente.

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.

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
Chase buffer (Tampón de incubación)	1 frasco 100 ml	B-CHR-CB	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 pieza	B-CHR-RCC	

Table 13

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

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

Smart Prep	50 tubos	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubos	B-CAL-SOFI
	Cada uno llenado con 1.3 ml de tampón de extracción	

Table 14

El controlset puede ser pedido adicionalmente.

Controles(alto bajo)*	2 viales, 0.5 ml	B-CHR-CONSET	Listo para usar
------------------------------	---------------------	--------------	-----------------

*concentration de calprotectin específico del lot.

Table 15

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.
- Tubos de 5 ml para la dilución de los extractos
- 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 1 g de heces nativas por extracción usando el aparato de extracción incluido en el equipo de prueba.

Recójense 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 ningún aditivo químico o biológico en el dispositivo de recogida.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

El procedimiento del análisis consiste en tres partes separadas:

1. Extracción de las muestras de heces:

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

2. Procesamiento de las muestras:

- Diluya los extractos de las muestras de heces en proporción 150 con tampón de incubación antes de utilizarlos para análisis (p.ej. 20 µl de muestra y 300 µl de tampón).
- Sométalos a vórtex.
- Centrifugue el extracto diluido durante 5 minutos a 3000g* y prosiga con el procedimiento de ensayo de flujo lateral.
- *De forma alternativa, se puede dejar sedimentar el extracto durante 10 minutos.
- El sobrenadante se va a utilizar en el ensayo de flujo lateral (página 22 y siguientes).

3. Análisis de flujo lateral / lectura

El procedimiento se describe y se ilustra en la página 22 y siguientes.

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 (conservadas a 2-8 °C) deberán utilizarse en un plazo de 24 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 15 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 15 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 15 minutos de tiempo de incubación (figura 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.
- Si ni la línea testigo (C) ni la línea de prueba (T) se detectan después de 15 minutos de tiempo de incubación (figura 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un 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 después de 15 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 de calibrado específica del lote se genera con los valores medianos (n≥10 mediciones cada uno) de al menos 10 puntos de calibración obtenidos de diferentes muestras de heces con concentraciones conocidas de calprotectina. El rango de ensayo es entre 100 y 1800 µg/g.
- Para mediciones cuantitativas, las muestras desconocidas con lecturas por encima de 1800 µg/g deben diluirse adicionalmente (p.ej. 1:5) con tampón de incubación y ensayarse de nuevo.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones debajo de 100 µg/g le recomendamos repetir las con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin assay (código: LF-CAL20).

LIMITACIONES

- Los valores de calprotectina deberán usarse como datos complementarios disponibles para el médico al establecer un diagnóstico. Los reactivos incluidos en este kit están optimizados para medir calprotectina humana en muestras de heces extraídas.
- Los valores de calprotectina fecal deben utilizarse como datos complementarios para ayudar al médico a establecer una diagnosis.
- Los resultados de análisis de calprotectina obtenidos con el ensayo rápido BÜHLMANN Quantum Blue® para calprotectina de rango alto deben confirmarse midiendo otros biomarcadores (como la proteína C reactiva) o repitiendo el análisis de calprotectina (con el método ELISA, código de pedido EK-CAL, o utilizando un segundo cartucho de análisis) y comparándolos con el índice CDAI y el estado clínico del paciente antes de tomar cualquier decisión clínica y/o terapéutica.
- Durante el seguimiento de una terapia, los resultados de análisis de calprotectina obtenidos con el ensayo rápido BÜHLMANN Quantum Blue® para calprotectina de rango alto deben interpretarse comparándolos con los resultados previos y en el contexto del cuadro clínico del paciente.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite para el blanco (LoB): <60 µg/g de calprotectina. El LoB se ha establecido en dos tandas de lecturas independientes utilizando dos lotes diferentes de cartuchos de análisis con un total de 60 valores para el blanco utilizando en cada uno de ellos tampón de detección como muestra. El LoB se ha calculado como el promedio de las dos tandas de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A.

Límite de Detección (LoD): 95 µg/g de calprotectina. El LoD se ha establecido con dos extractos de heces con concentraciones de 62 y 128 µg/g. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de cartuchos de análisis en 2 tandas de lecturas por día a lo largo de 10-20 días. Se determinaron los valores de SD y a partir de ahí se ha calculado el LoD de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A. Los datos presentados son el promedio de tres lotes diferentes de cartuchos de análisis.

Límite de Cuantificación (LoQ):

LoQ inferior: <100 µg/g de calprotectina.

LoQ superior: >1800 µg/g de calprotectina.

El LoQ se ha establecido con 11 extractos de heces con concentraciones de calprotectina entre 24 y 201 µg/g. Las muestras se midieron con tres lotes diferentes de cartuchos de análisis en 2 tandas de lecturas por día a lo largo de 10-20 días. Se determinó el CV correspondiente a la precisión total, promediándolo para cada muestra, y se aplicó un límite del 30% para el CV.

Linealidad: entre <70 y >2000 µg/g de calprotectina.

Diluciones seriadas de cuatro muestras independientes mostraron una total linealidad (100% de correlación entre el valor medido y el factor de dilución) dentro del rango de medición indicado de 100-1800 µg/g. A modo de ejemplo, en la Figure 2 se presentan las medias de 4 réplicas para cada dilución de la muestra 1. La diferencia media entre las concentraciones medidas o esperadas se ha calculado del 3 % (recuperación 103%).

Recuperación: 84-125%. Se adicionaron cuatro extractos de heces que contenían concentraciones bajas de calprotectina con cantidades diferentes de una solución patrón con alta concentración de calprotectina. Cada una de las muestras se midió antes y después de la adición en tres cartuchos de análisis de acuerdo al procedimiento de ensayo. Los valores medios obtenidos tras promediar las tres réplicas se presentan en la Table 16.

Repetibilidad: 21% CV. La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® para calprotectina de rango alto se calculó a partir de 4 muestras de heces extraídas que contenían entre 128 y 917 µg/g de calprotectina. Cada muestra se ensayó de acuerdo al procedimiento de ensayo en una tanda de lectura de 20 réplicas configurada en un intervalo de 10 minutos. En la Table 17 se presentan los valores medios de cuatro lotes diferentes de cartuchos de análisis.

Precisión interdía: <10% CV. La precisión interdía del ensayo Quantum Blue® para calprotectina de rango alto se calculó de acuerdo al protocolo CLSI EP5-A2 a partir de seis extractos de heces con entre 128 y 1324 µg/g de calprotectina ensayados en dos réplicas al día a lo largo de 10-20 días. En la Table 17 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de cartuchos de análisis.

Precisión total: 25% CV. La precisión total del ensayo Quantum Blue® para calprotectina de rango alto se calculó de acuerdo al protocolo CLSI EP5-A2 a partir de seis extractos de heces con entre 128 y 1324 µg/g de calprotectina ensayados en dos tandas de lecturas al día (1 por la mañana, 1 por la tarde) a lo largo de 10-20 días. En la Table 17 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de cartuchos de análisis.

Precisión Inter-lot: 21.1% CV. La precisión Inter-lot de Quantum Blue® Calprotectin High Range assay se ha calculado cuatro extractos de heces con concentraciones de calprotectina entre 128 and 917 µg/g. Cada muestra se

ensayó de acuerdo al procedimiento de ensayo en de lectura de 20 réplicas configurada en un intervalo de 10 minutos utilizando tres lotes de cartuchos de análisis con un total de 60 valores para cada lote. La precisión Inter-lot de las 4 muestras samples ha variado entre 17.0 y 22.9% CV.

Comparación de métodos: $R^2 = 0,86-0,93$. Se analizaron 54 extractos de heces de pacientes con EII sospechada que presentaban concentraciones de calprotectina dentro del rango lineal indicado del ensayo Quantum Blue® para calprotectina de rango alto de acuerdo al procedimiento de ensayo utilizando dos lotes diferentes de cartuchos de análisis (lote A y lote B) en dos tandas de lecturas cada uno y se compararon los resultados con los valores obtenidos con la prueba BÜHLMANN según el método ELISA para calprotectina de rango ampliado (código de pedido: EK-CAL). Las correlaciones se presentan en la Table 18, ilustrándose un ejemplo en la Figure 3.

ENGLISH



Get the Reader ready:

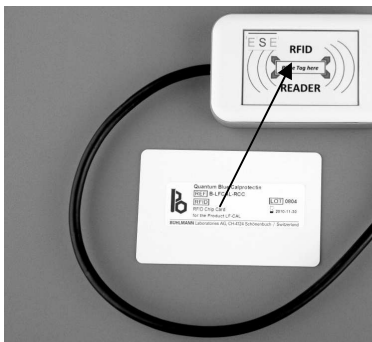
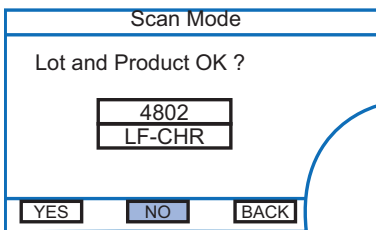
(see Appendix I or consult the Reader Manual).

- 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> <CHR_900>* 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-CHR>.

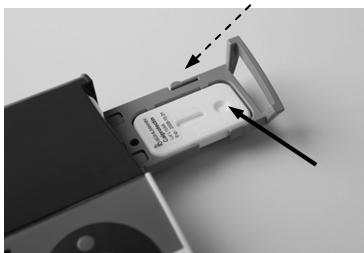
Change lot-specific test parameters using the RFID Chip Card:

This is 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.



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.



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:

- In order to avoid mechanical wear, do not press on the clamp on the backside (hatched arrow) while fixing the test cartridge into the tray.
- Make sure that the sample loading port is

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> <CHR_900>* 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-CHR 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.

Legen 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.

Vorbereitung der Calprotectin Testkassette:

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

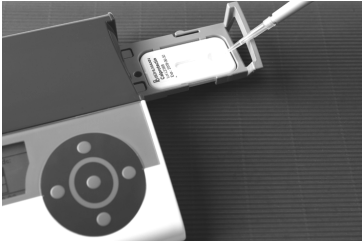
Den Schlitten des Reader's öffnen und die Testkassette einsetzen.

Achtung:

- Um mechanische Abnutzung zu vermeiden, darf beim Einsetzen der Testkassette nicht auf die hintere Klemmvorrichtung gedrückt werden (gestrichelter Pfeil).

located on the right side as indicated on the figure by the arrow.

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



1. Load 80 µl of diluted and centrifuged stool extract onto the sample loading port of the test cartridge with a precision pipette.

1. 80 µl der verdünnten und zentrifugierten Probe mit einer Präzisionspipette auf die Probenladevorrichtung der Testkassette laden.



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

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

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

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



3. After 15 minutes the test cartridge is automatically read and the test result calculated.^{*)}
4. Press ENTER Button to go back to the MAIN MENU.

3. Die Testkassette wird nach 15 Min. automatisch gelesen und das Resultat berechnet.^{*)}
4. Drücke den ENTER Knopf, um zum Hauptmenü zu gelangen.

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

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.

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

^{*)} Alternatively, the test cartridge can be measured (scanned) without the fixed test time of 15 minutes. For this, please select <Test Type> <CHR_0> and perform a "manual" timing of the 15-minutes incubation step.

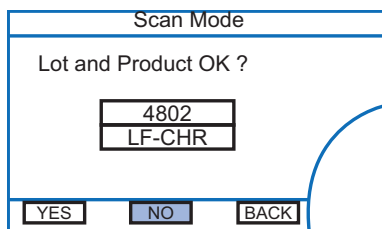
^{*)} Alternativ kann die Testkassette ohne feste Zeiteinstellung gemessen werden. Dafür wählen Sie <Test Type> <CHR_0> und führen Sie die Zeitmessung der 15-minütigen Inkubation mit einem externen Timer durch.

FRANCAIS



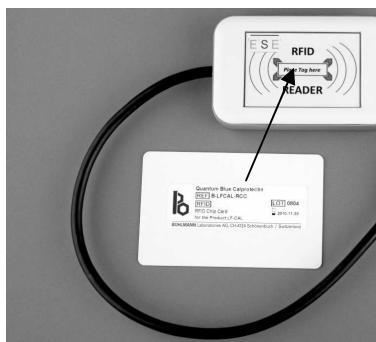
Préparer le lecteur : (voir annexe I ou consulter le mode d'emploi du lecteur Reader).

- 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) <CHR_900>*) 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-CHR>.



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.

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) <CHR_900>*) e premere Enter.
- Selezionare <User I D> (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-CHR>.

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 card 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.



Préparer la cartouche de calprotectine :
Ouvrir le feuillet protecteur de la cartouche de test en la déchirant ou en le 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.

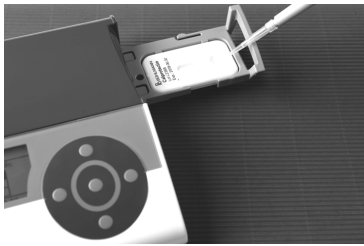
Attention: - pour éviter toute défaillance mécanique, ne pas s'appuyer sur la pince située à l'arrière (flèche hachurée) en fixant la cartouche dans le plateau de cette partie du dispositif. - s'assurer que le port de chargement de l'échantillon est bien situé à droite, comme le montre la flèche du schéma.

Preparare la card per la calprotectina:
Aprire la pellicola protettiva della card, strappandola o tagliandola con le forbici. Contrassegnare la card con il codice di identificazione del paziente.

Aprire il vano portacard del lettore e posizionarvi la card.

Attenzione:

- Per evitare il logoramento meccanico, non premere sul morsetto situato sulla parte posteriore (freccia tratteggiata) fissando la card nel vano da questo lato.
- Assicurarsi che la feritoia per il caricamento dei campioni sia situata a destra, come indicato in figura dalla freccia.



1. Déposer avec une pipette de précision 80 µl d'extrait de selle diluée et centrifuger sur le port de chargement de la cartouche de test.

1. Caricare 80 µl dell'estratto di feci diluito e centrifugato nella feritoia per il caricamento dei campioni della card con una pipetta di precisione.

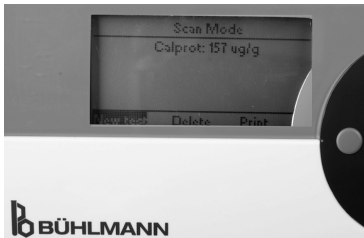


2. Immédiatement après le chargement, démarrer le minuteur en appuyant sur le bouton entré (ENTER) du lecteur.

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 portacard solo dopo circa 30 secondi.



3. Au bout de 15 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 15 minuti saranno stati effettuati la lettura automatica della card 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 15 minutes. Pour cela, veuillez sélectionner <Type de test> <CHR_0> et chronométrer «manuellement» le temps d'incubation de 15 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 card può essere letta (scannerizzata) senza il tempo prestabilito di 15 minuti. In tal caso, selezionare <Tipo di test> <CHR_0> e misurare manualmente i 15 minuti della fase di incubazione.

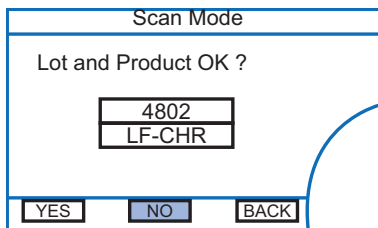
ESPAÑOL



Puesta a punto del lector :

(Vea el Apéndice I o consulte el Manual del lector).

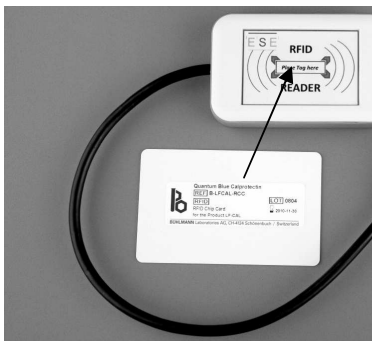
- Oprima el botón ENTER durante 1 segundo para poner en funcionamiento el lector.
- Espere a que terminen el autotest y la comprobación de calibración, que se ejecutan de forma automática.
- Seleccione <Scan> (Lectura) y oprima ENTER.
- Seleccione <Test type> (tipo de analysis) <CHR_900>*) y oprima ENTER.
- 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-CHR>.



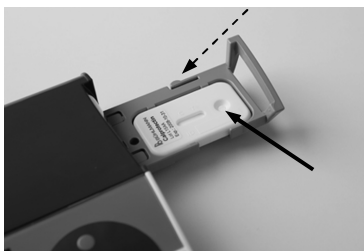
Modifique los parámetros de prueba específicos de lote utilizando la tarjeta con chip RFID:

(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 80 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



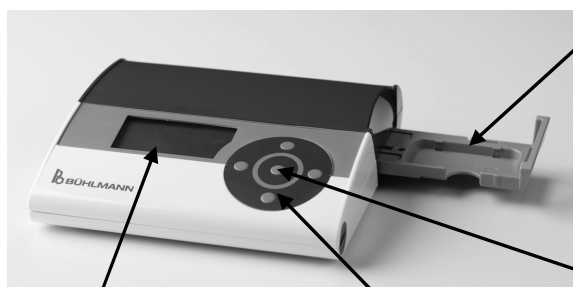
3. Después de 15 minutos, el cartucho de prueba se lee automáticamente y el resultado de la prueba se calcula^{*)}.
4. Pulse el botón “entrar” para volver al MENÚ PRINCIPAL.

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 15 minutos. Para ello, seleccione <Test type> (tipo de analysis) <CHR_0> y cronometre “manualmente” los 15 minutos de la fase de incubación.

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



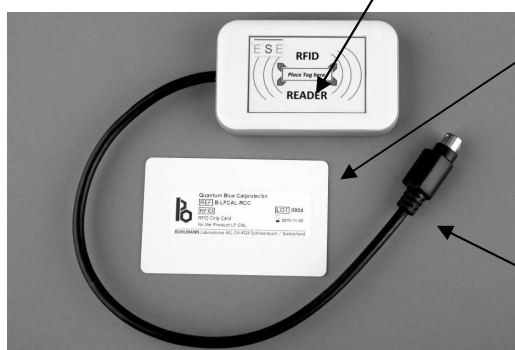
Screen (Display)
Bildschirmanzeige
Ecran
Monitore
Monitor

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®

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

Figure 1

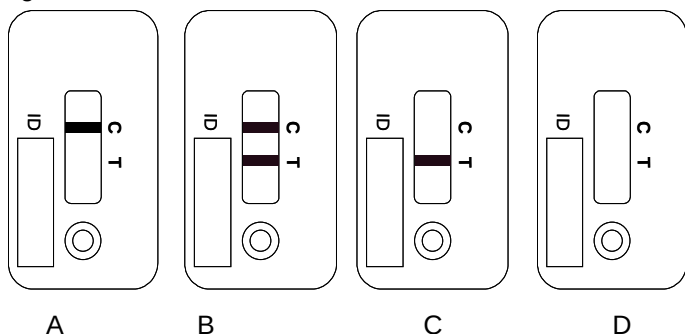


Table 17

Precision

Sample	µg/g	Repeatability [CV]	Between Day [CV]	Total [CV]
S5	128	21.4%	5.4%	26.3%
S6	201	22.9%	6.5%	23.8%
S7	340	nd*	0.0%	26.0%
S8	622	16.5%	2.8%	24.8%
S9	917	24.1%	9.0%	22.4%
S10	1324	nd*	9.4%	26.9%

*nd = not determined

Figure 2

Linearity

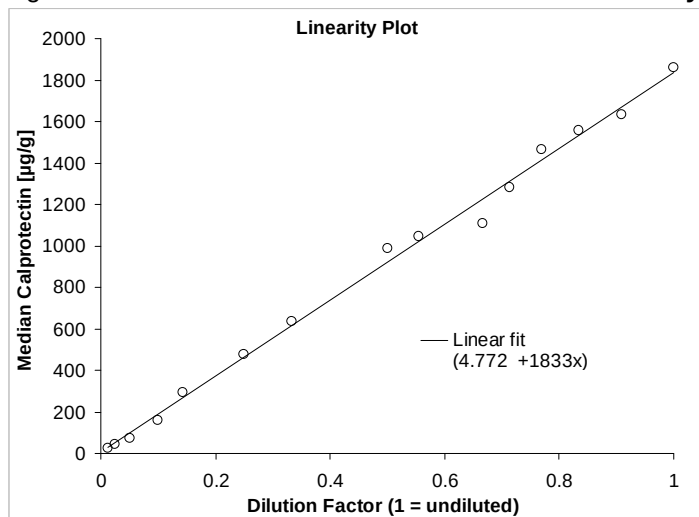


Table 18

Correlations

Comparisons	n	R ²	Bias	Slope
Lot A, run 1 vs. EK-CAL	53	0.86	51	0.86
Lot A, run 2 vs. EK-CAL	52	0.87	76	0.86
Lot B, run 1 vs. EK-CAL	53	0.91	66	0.95
Lot B, run 2 vs. EK-CAL	51	0.86	94	0.97
Mean Lots A+B vs. EK-CAL**	54	0.91	70	0.91
Mean Lot A vs. mean Lot B	54	0.93	38	1.09

**Graph shown in Figure 3

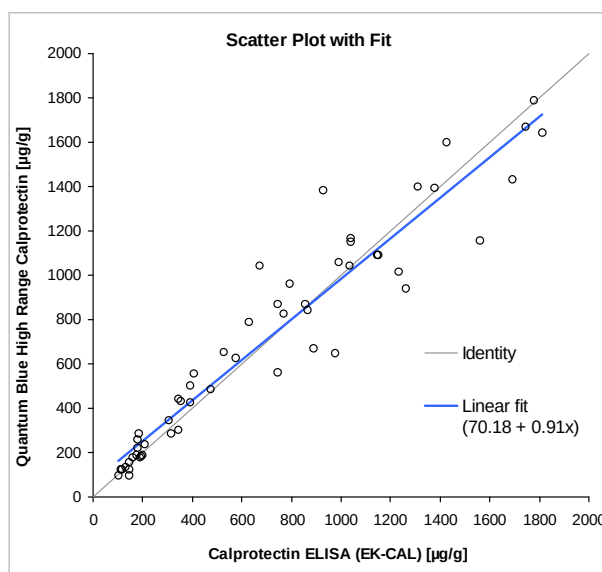
Table 16

Recovery

Sample	µg/g	spiked with [µg/g]	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S1	122	100	257	222	116
		200	376	322	117
		500	845	622	136
		1000	1750	1122	156
		1500	1656	1622	102
	Mean				125
S2	161	100	320	261	123
		200	412	361	114
		500	931	661	141
		1000	1316	1161	113
	Mean				123
S3	163	100	313	263	119
		200	266	363	73
		500	629	663	95
		1000	1018	1163	88
		1500	1406	1663	85
	Mean				92
S4	184	100	270	284	95
		200	300	384	78
		500	671	684	98
		1000	841	1184	71
		1500	1329	1684	69
	Mean				84
Mean					105

Figure 3

Method Comparison



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)

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
	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
TC	Test Cartridge Testkassette Cartouche de testi Cartuccia di rilevazione Cartucho de prueba
BUF EX	Extraction Buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción
BUF CB	Chase Buffer Laufpuffer Tampon de chase Tampone di chase Tampón de chase
RCC	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip



Printing Date
2011-05-23

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