

DRG:HYBRID•XL®



Instructions for Use

Calprotectin

IVD



REF

HYE-5767



40 tests



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

ASSAY PROTOCOL BARCODE (APB)

(Version 2.60 Software or later / ab Softwareversion 2.60 oder höher / Versione Software 2.60 o superiore /
 Versión de Software 2.60 o posterior / Version de logiciel 2.60 et supérieure /
 Wersja oprogramowania 2.6 lub późniejsza)



HYE-5767 – v2.60.3

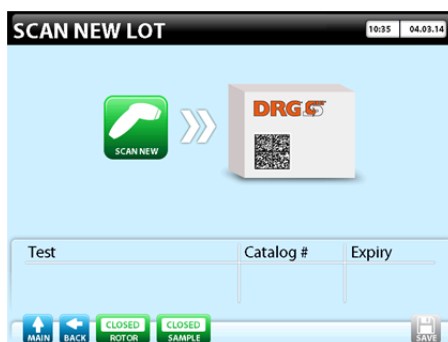
The barcode must be used to install the assay protocol into the DRG:HYBRiD-XL software via the SCAN NEW LOT page.
 Der Barcode muss in dem Menü „NEUES LOT SCANNEN“ eingelesen werden, um das Protokoll in der DRG:HYBRiD-XL-Software zu installieren.

Il codice a barre deve essere utilizzato per installare il protocollo del assay nel software DRG:Hybrid-XL tramite la pagina SCAN NUOVO LOTTO.

El código de barras debe utilizarse para instalar el protocolo de ensayo en el software del DRG:HYBRiD-XL a través del menú SCAN NEW LOT.

Le code barre doit être lu dans le menu SCAN NOUVEAU LOT afin d'installer le protocole DRG:HYBRiD-XL Software.

Kod kreskowy powinien być użyty do instalacji protokołu oznaczenia w analizatorze DRG:HYBRiD-XL w zakładce SKANUJ NOWY LOT



Please refer to section 3: **Routine Procedures: "Installing a new assay product"** of the User Manual v2.60 or later.

Bitte lesen Sie dazu auch Abschnitt 3 **Routineprozeduren: "Installation eines neuen Assays/eines neuen Assay-Protokolls"** im Benutzerhandbuch v2.60 oder höher.

Si prega di fare riferimento alla sezione 3: **Procedure ordinarie: "Installazione di un nuovo Assay"** del Manuale utente v2.60 o superiore.

Consulte la sección 3 **Procesos Rutinarios: "Instalación de un nuevo ensayo"** en el Manual del usuario v2.60 o posterior.

Merci de vous référer au chapitre 3 : **Procédure de routine: " Installation d'un nouvel assay/ un nouveau protocole d'assay"** dans le manuel d'utilisation à partir de la version v2.60.

Proszę zapoznać się z sekcją 3: **Przedury rutynowe: "Instalowanie nowego oznaczenia"** w Instrukcji Użytkownika, wersja 2.60 lub późniejsza

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu / Spis treści

| | | | | | |
|----|--|----|--------------------|---|----|
| 1 | INTRODUCTION | 4 | 1 | WSTĘP | 21 |
| 2 | PRINCIPLE OF THE TEST | 4 | 2 | ZASADA TESTU | 21 |
| 3 | WARNINGS AND PRECAUTIONS | 4 | 3 | ŚRODKI OSTROŻNOŚCI | 21 |
| 4 | REAGENTS | 4 | 4 | ODCZYNNIKI | 21 |
| 5 | SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 5 | 5 | POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK | 22 |
| 6 | ASSAY PROCEDURE | 5 | 6 | PROCEDURA TESTOWA | 22 |
| 7 | QUALITY CONTROL | 6 | 7 | KONTROLA JAKOŚCI | 23 |
| 8 | EXPECTED NORMAL VALUES | 6 | 8 | WARTOŚCI OCZEKIWANE | 23 |
| 9 | LIMITATIONS OF USE | 6 | 9 | OGRANICZENIA | 24 |
| 10 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 6 | 10 | CHARAKTERYSTYKA | 24 |
| 11 | METHOD COMPARISON | 7 | 11 | BADANIA PORÓWNAWCZE | 24 |
| 12 | LEGAL ASPECTS | 8 | 12 | ASPEKTY PRAWNE | 24 |
| | | | | | |
| 1 | EINLEITUNG | 9 | 13 | REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / BIBLIOGRAFIA | 25 |
| 2 | TESTPRINZIP | 9 | SYMBOLS USED | | |
| 3 | WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN | 9 | 26 | | |
| 4 | REAGENZEN | 9 | | | |
| 5 | PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG | 10 | | | |
| 6 | TESTDURCHFÜHRUNG | 10 | | | |
| 7 | QUALITÄTSKONTROLLE | 11 | | | |
| 8 | ERWARTETE WERTE | 11 | | | |
| 9 | GRENZEN DES TESTS | 12 | | | |
| 10 | TESTCHARAKTERISTIKA | 12 | | | |
| 11 | METHODENVERGLEICH | 12 | | | |
| 12 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN | 12 | | | |
| | | | | | |
| 1 | INTRODUZIONE | 13 | | | |
| 2 | PRINCIPIO DEL SAGGIO | 13 | | | |
| 3 | AVVERTENZE E PRECAUZIONI | 13 | | | |
| 4 | REAGENTI | 13 | | | |
| 5 | RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE | 14 | | | |
| 6 | PROCEDIMENTO OPERATIVO | 14 | | | |
| 7 | CONTROLLO QUALITÀ | 15 | | | |
| 8 | VALORI NORMALI ASPETTATI | 15 | | | |
| 9 | LIMITI ALL'USO | 15 | | | |
| 10 | CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO | 15 | | | |
| 11 | COMPARAZIONE METODICA | 16 | | | |
| 12 | ASPETTI LEGALI | 16 | | | |
| | | | | | |
| 1 | INTRODUCCIÓN | 17 | | | |
| 2 | PROCEDIMIENTO DEL TEST | 17 | | | |
| 3 | ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES | 17 | | | |
| 4 | REACTIVOS | 17 | | | |
| 5 | COLECCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN | 18 | | | |
| 6 | PROCEDIMIENTO DEL TEST | 18 | | | |
| 7 | CONTROL DE CALIDAD | 19 | | | |
| 8 | VALORES NORMALES ESPERADOS | 19 | | | |
| 9 | LIMITACIONES DE USO | 19 | | | |
| 10 | CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO | 20 | | | |
| 11 | COMPARATIVA DE MÉTODOS | 20 | | | |
| 12 | ASPECTOS LEGALES | 20 | | | |

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG:HYBRID-XL Calprotectin** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Calprotectin in stool.

Only for use with the DRG:HYBRID-XL Analyzer.

1.2 Summary and Explanation

Calprotectin is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes.

Fecal calprotectin is a marker for acute inflammation in general and for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases (1-3). It is often difficult to distinguish between irritable bowel syndrome and chronic inflammatory bowel disease. This can lead to extensive and unnecessary colonoscopic examinations. In contrast, the fecal calprotectin test allows clear differentiation between patients with inflammatory bowel disease (acute Morbus Crohn's disease and ulcerative colitis) and irritable bowel syndrome (4-9). Fecal calprotectin levels correlate significantly with histologic and endoscopic assessment of disease activity in Morbus Crohn's disease and ulcerative colitis as well as with the fecal excretion of indium-111-labelled neutrophilic granulocytes that has been suggested as the "gold standard" of disease activity in inflammatory bowel disease (10). Elevated levels of calprotectin are a much better predictor of relapse of inflammatory bowel disease than standard inflammatory markers (11). Comparing this marker with standard fecal occult blood screening in colorectal cancer demonstrates clearly the diagnostic advantages of the fecal calprotectin test. The parameter is of a high diagnostic value: if the calprotectin level in stool is low, the probability is high that no organic intestinal disease exists.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG:HYBRID-XL Calprotectin Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The antibody coated wells (ACW) of the reagent cartridges are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards a unique antigenic site of the Calprotectin molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous Calprotectin is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is a monoclonal anti-Calprotectin antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is proportional to the concentration of Calprotectin in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of color developed is proportional to the concentration of Calprotectin in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for *in vitro* diagnostic use only.
For professional use only.
2. This kit can only be used in combination with the DRG:HYBRID-XL Analyzer
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is clear and understood.
4. **Do not remove, exchange, discard or damage any of the barcode labels provided with each kit and its components. All barcodes build an integral system for the kit lot.**
5. Respect the general safety measures for use of laboratory reagents.
6. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
7. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
9. Wear appropriate disposable gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may cause false results.
10. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
11. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
12. Unused reagent cartridges must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant provided.
13. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes.

14. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange reagent cartridges of different kits even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the wells in the reagent cartridges may differ slightly.
15. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
16. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant amount of water and skin with soap and plenty of water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.
18. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets.
For professional users the Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

4.1.1 Reagent Cartridges

40 pieces containing the following:

- **Antibody Coated Well (ACW)**
coated with anti-Calprotectin antibody (monoclonal).
- **Enzyme Conjugate**, 160 µL,
Anti-Calprotectin antibody conjugated with horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
- **Substrate Solution**, 260 µL
Tetramethylbenzidine (TMB).

4.1.2 Re-Calibrator 1 & 2

2 vials, 1 mL each, ready to use;

For re-calibration of the quantitative DRG:HYBRID-XL Calprotectin test.

Concentrations are lot-specific.

Contain non-mercury preservative.

4.1.3 Control 1 & 2

2 vials, 1 mL each, ready to use;

For control values and ranges please refer to the bar code on vial label or to the QC-Datasheet.

Contain non-mercury preservative.

4.2 Materials required but not provided

- General needed laboratory equipment
- Ultra-pure water
DRG recommends to use Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW) according to CLSI guideline 3C-A4 with the following specifications:
Resistivity at 25 °C [MΩ·cm]: > 10
Conductivity at 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 0.1
Total Organic Carbon/p.p.b. [µg/L]: < 50
Colloids [µg/mL]: <0.05
- [REF] HYB-5252 DRG:HYBRID-XL Analyzer
- [REF] HYI-5392: *System Solution 5L*, 5000 mL;
(Instrument Feed Water according to CLSI guideline 3C-A4 with the following specification can also be used:
Resistivity at 25 °C [MΩ·cm]: > 1
Conductivity at 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 1
Total Organic Carbon/p.p.b. [µg/L]: < 200
Colloids [µg/mL]: <0.1)
- [REF] HYI-5394: *Wash Buffer*, 40x concentrate, 25 mL
- [REF] HYI-5395: *Needle Cleaning Solution*, 30 mL. Cleaning solution for the pipetting needle (daily and weekly maintenance, see also user manual)
- [REF] HYI-5387: *Cuvettes*, (2 x 360 pieces)

For use of the *Secondary Sample Holder* for secondary tubes the following tubes are required:

- [REF] HYI-5391: *Sample Tubes (Secondary)*, 2500 pcs.

4.3 Storage Conditions

All kit components should be stored at 2 °C to 8 °C to ensure product performance until the defined expiry date.

When stored at 2 °C to 8 °C, **unopened kits** will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

- Cartridges (stored at 2 °C to 8 °C) in the supplied and unopened zip/foil bags will retain reactivity until expiration date.
- Unopened Re-Calibrators and Controls (stored at 2 °C to 8 °C) will retain reactivity until expiration date.

Opened reagents and the reagent cartridges must be stored at 2 °C to 8 °C.

Once the plastic bag has been opened, care should be taken to tightly close it again along with the supplied desiccant bag.

Immediately after end of each run the Re-Calibrator and Control vials have to be removed from the instrument, tightly capped and stored at 2 °C to 8 °C.

- Unused cartridges in opened zip/foil bags (stored at 2 °C to 8 °C) will retain reactivity until expiration date, if stored as described above.
- Pierced or open cartridges must be disposed of immediately.

4.3.1 On-board Stability

For Re-Calibrators and Controls the on-board stability has been evaluated under controlled laboratory conditions at room temperature (20 °C to 25 °C).

Due to the differences in laboratory environmental conditions and reagent volumes, the on-board stability may deviate from the declared value.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents, such as controls and re-calibrators, to room temperature (20 °C to 25 °C) prior to use. Reagent Cartridges can be used directly after storage in the refrigerator.

Wash Buffer (not included in the kit)

For Wash Buffer (1x) dilute 25 mL of Wash Buffer (40x) with 975 mL ultra-pure water to a final volume of 1000 mL.

The diluted Wash Buffer (1x) is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed of according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples can be used in this assay.

A minimum of 66 µL of sample is needed for one determination.

This includes 6 µL sample and 60 µL dead volume.

- Do not use standards or external controls stabilized with azide.

5.1 Specimen Collection

We **strongly** recommend the use of the **Fecal Extraction System 2.6 (FES; REF: HYI-5989)**.

Only the **Fecal Extraction System 2.6 (FES; REF: HYI-5989)** can be used for stool sample preparation in the DRG:HYBRiD-XL Calprotectin test.

No other stool sample extraction system has been tested for the DRG Calprotectin test (HYE-5767).

For sample preparation please follow the Instructions for Use included in the package of HYI-5989.

After finishing the sample preparation in the FES tubes the stool samples are ready for use in the DRG:HYBRiD-XL Calprotectin test.

Place the opened extraction tube into the adapter for the primary arc.

5.2 Specimen Storage

Raw Stool

Calprotectin in stool is described to be stable for at least 3 days at room temperature (8).

Nevertheless, we recommend storing the samples for no more than 48 h at 2 °C - 8 °C.

Long term storage up to 12 months is recommended at -20 °C.

Allow frozen samples to thaw slowly, preferably at 2 °C - 8 °C, and warm the samples to room temperature before analysis. Avoid repeated freezing and thawing of the sample.

Freezing can cause neutrophil granulocytes in the stool sample to burst and release calprotectin. Therefore frozen samples can be expected to contain slightly elevated concentrations of calprotectin compared to fresh samples.

Stool Extract

Stool extract is stable for nine days at room temperature, 2 °C - 8 °C or -20 °C.

Avoid more than three freeze-thaw cycles.

5.3 Specimen Dilution

5.3.1 Manual Sample Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the **pretreated stool sample (1:100 dilution in FES, see chapter 5.1)** can be diluted with *Sample Diluent** and measured again as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Sample Diluent*
(mix thoroughly)

* *Sample Diluent for manual dilution is not included in this kit, but can be ordered on request (REF: HYE-5767-DIL, 20 mL).*

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents, such as controls and re-calibrators and specimens, must be allowed to come to room temperature (20 °C to 25 °C) before use.
All reagents and samples must be mixed without foaming. Reagent Cartridges can be used directly after storage in the refrigerator.
- Samples, controls and re-calibrators should be measured within 2 hours in order to avoid possible evaporation effects.
- The *Secondary Sample Holder* (HYI-5437) for secondary tubes has the capacity for a maximum of 20 samples including controls and re-calibrators. They all have to be pipetted into the secondary tubes, and the respective barcodes of control/re-calibrator vials and, if available, the sample barcodes have to be read with the external barcode scanner.

6.2 Test Procedure

- **The total assay time for DRG:HYBRiD-XL Calprotectin is 60 minutes.**
- To ensure proper operation of the test, the instructions in the user manual for the DRG:HYBRiD-XL should strictly be followed.
- All test specific information required for the correct operation is included in the respective barcodes of the reagents.
Take care not to damage these bar codes!
- **It is recommended to tap the bottom of the Cartridge Segments containing the reagent cartridges once on the bench before placing them on the rotor. This is to avoid foam and adhering of the liquid on the sealing of the reagent cartridge.**
- Place reagent cartridges on the rotor of the unit. The heating to 37 °C incubation temperature is performed automatically in the unit.

6.3 Calibration

Each DRG:HYBRiD-XL reagent contains a barcode with the specific information for recalibration of the reagent lot. The Master Curve is printed as a 2-D barcode on the outer label of the kit package and on the QC-Datasheet and has to be scanned with the external barcode scanner prior to the first use of the respective kit lot.

Recalibration is recommended:

- if a new kit lot is used. Each new lot should be verified by running the kit internal re-calibrators and controls before routine use.
- if one or both assay controls are found outside the specified range.
- after 1 week of use of the same reagent kit on the unit.

6.4 Calculation of Results

The analyte concentrations are calculated automatically by the DRG:HYBRiD-XL's system software.

7 QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

It is also recommended to participate in national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Apply appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not agree with the established acceptable ranges of control materials, patient results should be considered invalid. In this case, please check the following: expiration dates and storage conditions of reagents, operational reliability of the analyser. In addition, it is indicated to perform a Recalibration.

In case of further questions please contact your local distributor or DRG directly.

7.1 Internal Controls

For Quality Control it is necessary to use the two internal controls provided with each kit.

Acceptance ranges for both internal controls (*Control 1 & 2*) were established by the manufacturer and are summarized in the QC-Datasheet added to the kit. Note that the expected values and acceptance ranges stated in the QC-Datasheet always refer to the current kit lot.

Internal controls should be run in single determination:

- on a routine basis (e.g. once per 24 h)
- if re-calibration is required (if one or both internal controls are out of range)
- if a new kit lot is used (in order to avoid any negative impact on the kit performance by improper transport or to detect improper storage during transport).

7.2 External Controls

Use controls at both normal and pathological levels.

The control intervals and control ranges for external controls should be adapted to the individual requirements of each laboratory. All results must be within the defined limits.

Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values of external controls are not found in the acceptance range.

8 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and pathological values.

Study 1: In a clinical study, faecal Calprotectin concentration was determined in 302 apparently healthy **children** (12).

| Age | n | Median faecal Calprotectin (µg/g) |
|---------------|-----|-----------------------------------|
| 0 - 3 months | 14 | 345 (195 - 621) |
| 3 - 6 months | 13 | 278 (85 - 988) |
| 6 - 12 months | 27 | 183 (109 - 418) |
| 1 - 4 years | 89 | 75 (53 - 119) |
| 4 - 12 years | 159 | 28 (25 - 35) |

Study 2: In this clinical study, faecal Calprotectin concentration was determined in 117 apparently healthy **children** (13).

| Age | n | Median faecal Calprotectin (µg/g) |
|---------------|----|-----------------------------------|
| 4 - 6 years | 27 | 28.2 |
| 7 - 10 years | 30 | 13.5 |
| 11 - 14 years | 27 | 9.9 |
| 15 - 17 years | 33 | 14.6 |

These values correspond well to other reported clinical values (14-15). A suggested cut-off level for adults (50 µg/g) can be used for children aged 4-17 years.

In a study conducted with apparently healthy **adults**, and patients with inflammatory bowel disease using the DRG:HYBRiD-XL HYE-5767 the following data were observed:

| Population | healthy | bowel disease |
|--|--------------|---------------|
| n | 50 | 61 |
| Range (µg/g) | 2.6 - 103 | 51.0 - > 1500 |
| Mean (µg/g) | 17.78 | 524 |
| 2.5 th - 97.5 th Percentile (µg/g) | 4.19 - 71.87 | 63.9 - > 1500 |
| Median (µg/g) | 25.27 | 377 |

8.1 Interpretation of results

- The median value in healthy adults is about 18 µg/g (5).
- Samples with a calprotectin concentration < 50 µg/g are regarded as negative.
- Samples with a calprotectin concentration between 50 µg/g and 200 µg/g are regarded as borderline positive. We recommend repeating the measurement at a later time point in order to confirm the result.
- Samples with a calprotectin concentration > 200 µg/g are regarded as positive.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated with other clinical observations and diagnostic tests.

9 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained, when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Assay Dynamic Range

The dynamic range of the assay is defined by the limit of detection and the maximum value of the Master Curve.

Values found below the measuring range are indicated as "< 7.013 µg/g".

Values found above the measuring range are indicated as "> 1500 µg/g".

The measuring range of the assay is between 7.01 µg/g – 1500 µg/g.

10.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

| | |
|-----------------|----|
| Lysozyme | 0% |
| PMN-Elastase | 0% |
| Myeloperoxidase | 0% |
| Lactoferrin | 0% |

10.3 Sensitivity

The sensitivity study was designed according to CLSI guideline EP17-A2.

The Limit of Blank (LoB) is 1.180 µg/g.

The Limit of Detection (LoD) is 7.013 µg/g.

The Limit of Quantification (LoQ) is 19.697 µg/g.

10.4 Precision Performance

The precision study was designed on the basis of CLSI guideline EP5-A2.

10.4.1 Within-Run (Intra Assay)

The Intra-Assay precision was determined with 4 patient samples covering the measuring range in 5 independent runs on 5 days with 2 different devices in 5 replicates per run. CV was calculated as mean CV of 5 runs.

| Sample | n | Mean (µg/g) | CV (%) |
|--------|---|-------------|--------|
| 1 | 5 | 512.24 | 6.6 |
| 2 | 5 | 80.85 | 5.1 |
| 3 | 5 | 202.60 | 6.4 |
| 4 | 5 | 598.48 | 9.5 |

10.4.2 Total Precision (Inter Assay)

The Inter-Assay precision was determined with 4 patient samples covering the measuring range in 5 independent runs on 5 days with 5 determinations per run. CV was calculated from 25 determinations. The total precision is shown below:

| Sample | n | Mean (µg/g) | CV (%) |
|--------|----|-------------|--------|
| 1 | 25 | 512.24 | 6.6 |
| 2 | 25 | 80.85 | 5.1 |
| 3 | 25 | 202.60 | 6.3 |
| 4 | 25 | 52.78 | 6.4 |

10.4.3 Inter-Lot

The between-lots variation was determined by 6 measurements of 4 samples with 3 different kit lots.

| Sample | n | Mean (µg/g) | CV (%) |
|--------|----|-------------|--------|
| 1 | 18 | 399.33 | 7.9 |
| 2 | 18 | 78.19 | 14.3 |
| 3 | 18 | 185.11 | 7.6 |
| 4 | 18 | 74.52 | 7.8 |

10.5 Recovery

Recovery was determined by adding four increasing concentrations of the analyte to four different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the Master Curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

| Sample | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Concentration (µg/g) | 40.90 | 53.30 | 326.50 | 833.00 |
| Average Recovery (%) | 90.3 | 108.2 | 93.8 | 98.4 |
| Range of Recovery (%) | from 85.7 to 96.5 | 99.6 114.0 | 85.6 104.7 | 87.1 106.1 |

10.6 Linearity

Four samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Sample Diluent*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

| Sample | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Concentration (µg/g) | 760.00 | 650.00 | 663.50 | 351.50 |
| Average Recovery (%) | 96.4 | 101.8 | 99.04 | 91.0 |
| Range of Recovery (%) | from 81.9 to 120.0 | 99.2 107.6 | 84.3 110.3 | 82.7 107.3 |

10.7 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), has no influence on the assay results. Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Calprotectin in a sample.

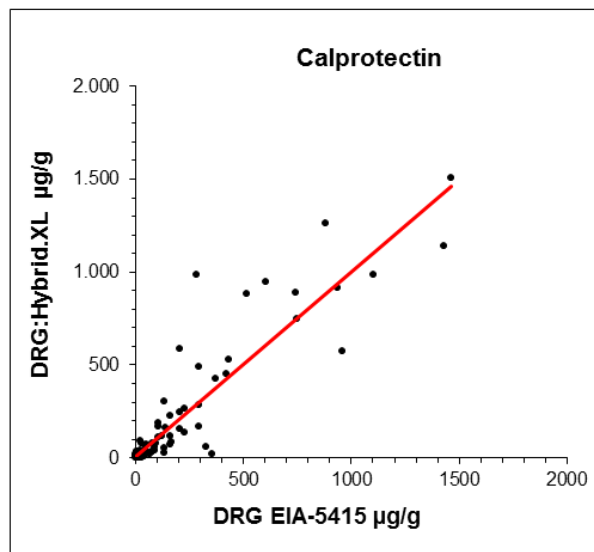
10.8 High-Dose-Hook Effect

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 10,000 µg/g of Calprotectin.

11 METHOD COMPARISON

A comparison of DRG:HYBRID-XL Calprotectin Test HYE-5767 (y) and DRG Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1h) ELISA (EIA-5415) (x) using clinical samples gave the following correlation:

n = 98
 r = 0.912
 y = 0.993x + 9.788



12 LEGAL ASPECTS

Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.

12.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

12.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 12.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

12.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different kit lots could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 12.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

For further information please refer to the User Manual of the DRG:HYBRiD-XL, analyser-specific application sheets, product information and package inserts of all necessary components.

1 EINLEITUNG

1.1 Verwendungszweck

Der **DRG:HYBRiD-XL Calprotectin** ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen in-vitro-Bestimmung von Calprotectin **in Stuhlproben**.

Nur für In-vitro-Diagnostik.

Nur zur Anwendung mit dem DRG:HYBRiD-XL Analyzer.

2 TESTPRINZIP

Das DRG:HYBRiD-XL Calprotectin Kit ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay (ELISA), der auf der **Sandwichtechnik** basiert.

Die mit Antikörper beschichteten Wells (ACW) der Reagenzien-Cartridges sind mit einem monoklonalen Maus- Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Calprotectin-Moleküls gerichtet ist. Ein Aliquot der Patientenprobe, die endogenes Calprotectin enthält, wird in dem beschichteten Well mit einem Enzymkonjugat, das ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Anti-Calprotectin-Antikörper ist, inkubiert. Nach der Inkubation wird das nicht gebundene Konjugat durch Waschen entfernt.

Die Menge des gebundenen Peroxidase-Konjugats ist proportional zur Konzentration von Calprotectin in der Probe.

Nach Zugabe der Substratlösung ist die Intensität der gebildeten Farbe proportional zur Konzentration von Calprotectin in der Patientenprobe.

3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik bestimmt. Nur zur Anwendung durch Fachpersonal.
- Dieser Testkit kann nur zusammen mit dem DRG:HYBRiD-XL Analyzer verwendet werden.
- Gebrauchsanweisung sorgfältig und vollständig durchlesen, bevor ein Testlauf gestartet wird. Nur die gültige, im Testkit enthaltene Gebrauchsanweisung verwenden. Stellen Sie sicher, dass Sie alles eindeutig verstanden haben.
- Die auf den Testkits und den jeweiligen Komponenten vorhandenen Barcode-Etiketten nicht entfernen, austauschen, entsorgen oder beschädigen. Alle Barcodes zusammen bilden eine integrale Einheit für die Testkitcharge.**
- Die allgemeinen Sicherheitsmaßnahmen für den Gebrauch von Laborreagenzien beachten.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche biologische Gefahrstoffe betrachtet werden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit der Haut und den Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien geeignete Einweghandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Handhabung sollte gemäß den entsprechenden nationalen Sicherheitsrichtlinien und -vorschriften für biologische Gefährdung erfolgen.
- Reagenzien nach dem auf den Kit-Etiketten angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Nicht verwendete Reagenzien-Cartridges müssen bei 2 °C bis 8 °C in dem fest verschlossenen Folienbeutel mit dem enthaltenen Trockenmittel gelagert werden.
- Optimale Ergebnisse können nur durch die Verwendung kalibrierter Pipetten erreicht werden.
- Testkit-Komponenten mit unterschiedlichen Chargennummern nicht mischen oder zusammen in einem Lauf verwenden. Es wird nicht empfohlen, Reagenzien-Cartridges von verschiedenen Kits gleichzeitig zu verwenden oder zu vertauschen, auch wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter verschiedenen Bedingungen gelagert oder transportiert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der ACW in den Reagenzien-Cartridges leichte Unterschiede aufweisen kann.
- Einige Reagenzien enthalten Proclin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut sofort mit ausreichend Wasser waschen. Das TMB-Substrat wirkt reizend auf Haut und Schleimhäute. Im Fall eines möglichen Kontakts die Augen mit reichlich Wasser und die Haut mit Seife und viel Wasser waschen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Nach Einatmen betroffene Person an die frische Luft bringen.

- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien und -vorschriften für biologische Gefährdung wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Das Sicherheitsdatenblatt für dieses Produkt ist auf Anfrage für berufsmäßige Benutzer direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 REAGENZIEN

4.1 Kitinhalt

4.1.1 Reagent Cartridges (Reagenzien-Cartridges)

40 Stück, mit folgendem Inhalt:

- Antibody Coated Well (ACW)**, mit Antikörper beschichtete Kavität beschichtet mit Anti-Calprotectin-Antikörpern (monoklonal).
- Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 160 µL, Anti-Calprotectin-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
- Substrate Solution** (Substratlösung), 260 µL, Tetramethylbenzidin (TMB).

4.1.2 Re-Calibrator 1 & 2 (Re-Kalibrator 1 & 2)

2 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;

Zur Re-Kalibration des quantitativen DRG:HYBRiD-XL Calprotectin Tests.

Die Konzentrationen sind chargenspezifisch.

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.1.3 Control 1 & 2 (Kontrolle 1 & 2)

2 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;

Sollwerte und Sollwertbereiche entnehmen Sie bitte dem Barcode auf dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.2 Erforderliche Materialien und Geräte (nicht im Kit enthalten)

- Allgemein übliche Laborausstattung
- Reinstwasser
DRG empfiehlt die Verwendung von CLRW-Wasser (Clinical Laboratory Reagent Water) gemäß der CLSI-Richtlinie 3C-A4 mit den folgenden Spezifikationen:
Spezifischer Widerstand bei 25 °C [MΩ·cm]: > 10
Leitfähigkeit bei 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 0,1
Totaler Organischer Kohlenstoff/ppb [µg/L]: < 50
Kolloide [µg/mL]: < 0,05
- [REF] HYB-5252** DRG:HYBRiD-XL Analyzer
- [REF] HYI-5392: System Solution 5L (Systemflüssigkeit)**, 5000 mL (IFW-Wasser (Instrument Feed Water) gemäß der CLSI-Richtlinie 3C-A4 mit den folgenden Spezifikationen kann ebenfalls verwendet werden:
Spezifischer Widerstand bei 25 °C [MΩ·cm]: > 1
Leitfähigkeit bei 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 1
Totaler Organischer Kohlenstoff/ppb (µg/L): < 200
Kolloide [µg/mL]: < 0,1)
- [REF] HYI-5394: Wash Buffer (Waschpuffer)**, 40-fach konzentriert, 25 mL
- [REF] HYI-5395: Needle Cleaning Solution (Nadelreinigungslösung)**, 30 mL
Reinigungslösung zum Spülen der Pipettiernadelspitze (tägliche bzw. wöchentliche Reinigungsmaßnahmen, siehe auch Benutzerhandbuch)
- [REF] HYI-5387: Cuvettes (Messküvetten)**, (2 x 360 Stück)

Wenn Sie einen *Secondary Sample Holder* (Sekundärprobenhalter) für Sekundärprobenröhrchen verwenden, benötigen Sie zusätzlich:

- [REF] HYI-5391: Sample Tubes (Secondary)** (Sekundärprobenröhrchen), 2500 Stück

4.3 Lagerung und Haltbarkeit

Alle Kitkomponenten müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, um die Produktleistung bis zum angegebenen Verfallsdatum zu gewährleisten.

Bei 2 °C bis 8 °C gelagert behalten **ungeöffnete Kits** ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.

- Cartridges (gelagert bei 2 °C bis 8 °C) im mitgelieferten und ungeöffneten Folienbeutel behalten ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum.
- Ungeöffnete Re-Kalibratoren und Kontrollen (gelagert bei 2 °C bis 8 °C) behalten ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum.

Geöffnete Reagenzien und die Reagenzien-Cartridges müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden, zusammen mit dem enthaltenen Trockenbeutel. **Sofort nach Ende eines Laufes**, sind Rekalibratoren und Kontrollen aus dem Gerät zu entnehmen, sorgfältig zu verschließen und bei 2 °C - 8 °C zu lagern.

- Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten unbenutzte Cartridges in einem geöffneten Folienbeutel (gelagert bei 2 °C bis 8 °C) ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum.
- Durchstochene oder geöffnete Cartridges müssen sofort entsorgt werden.

4.3.1 On-board-Stabilität

Die On-board-Stabilität der Re-Kalibratoren und Kontrollen wurde unter kontrollierten Laborbedingungen bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) evaluiert.

Unterschiede bei den Umgebungsbedingungen im jeweiligen Labor und unterschiedliche Reagenzienvolumina, können dazu führen, dass die On-board-Stabilität von den angegebenen Werten abweicht.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle eingesetzten Reagenzien wie Kontrollen und Re-Kalibratoren müssen vor Gebrauch Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) annehmen. Die Reagenzien-Cartridges können sofort nach der Entnahme aus dem Kühlschrank verwendet werden.

Wash Buffer (nicht im Kit enthalten)

Zur Herstellung des Waschpuffers (1x) 25 mL Wash Buffer (40x) mit 975 mL Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL verdünnen.

Der verdünnte Waschpuffer (1x) ist 2 Wochen bei Raumtemperatur haltbar.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

In diesem Test können **Stuhlproben** als Probenmaterial eingesetzt werden.

Das minimale Probenvolumen für eine Bestimmung beträgt 66 µL (6 µL Probe und 60 µL Totvolumen).

- Keine mit Azid stabilisierten Standards oder externen Kontrollen verwenden.

5.1 Probenentnahme

Wir empfehlen **dringend** den Gebrauch des **Fecal Extraction System 2.6 (FES; Cat. No.: HYI-5989)**.

Für den DRG Calprotectin-Test (HYE-5767) kann **nur** das **Fecal Extraction System 2.6 (FES; Cat. No.: HYI-5989)** für die Stuhlprobenvorbereitung verwendet werden.

Für den DRG Calprotectin-Test (HYE-5767) wurde kein anderes Stuhlproben-Extraktionssystem getestet.

Für die Probenvorbereitung beachten Sie bitte die Gebrauchsanweisung, die in der Packung für HYI-5989 enthalten ist.

Nach Abschluss der Probenvorbereitung im FES-Röhrchen, ist die Stuhlprobe bereit für den Einsatz im DRG:HYBRID-XL Calprotectin-Test

Platzieren Sie das geöffnete Extraktionsröhrchen im Adapter des Primär-Arc.

5.2 Probenlagerung und -vorbereitung

Rohstuhl

Calprotectin in Stuhlproben gilt als stabil für mindestens 3 Tage, wenn der Stuhl bei Raumtemperatur gelagert wird (8).

Dennoch wird eine Lagerung der Stuhlproben für nicht mehr als 48 h bei 2 °C - 8 °C empfohlen.

Für eine Aufbewahrung von bis zu 12 Monaten sollten die Stuhlproben bei -20 °C gelagert werden.

Tauen Sie die gefrorenen Stuhlproben langsam auf (idealer Weise bei 2°C - 8°C) und bringen Sie die Proben vor der Analyse auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe.

Einfrieren der Stuhlprobe kann zur Zerstörung der neutrophilen Granulozyten im Stuhl und damit zu einer Freisetzung von Calprotectin führen. Deshalb ist bei gefrorenen Stuhlproben eine geringfügig höhere Konzentration an Calprotectin zu erwarten als bei frischen Stuhlproben.

Stuhl-Extrakt

Stuhl-Extrakt ist stabil für 9 Tage bei Raumtemperatur, 2 °C - 8 °C und -20 °C.

Vermeiden Sie mehr als 3 Einfrier-Auftau-Zyklen.

5.3 Probenverdünnung

5.3.1 Manuelle Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann die **vorbehandelte Stuhlprobe (Verdünnung 1:100 im FES-Röhrchen, siehe Kap. 5.1)** mit *Sample Diluent* * verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Für die Berechnung der Konzentration muss der entsprechende Verdünnungsfaktor beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Sample Diluent* (gründlich mischen)

* *Sample Diluent zur manuellen Verdünnung ist nicht in diesem Kit enthalten, kann aber auf Anfrage bestellt werden*

(REF) HYE-5767-DIL, 20 mL).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle eingesetzten Reagenzien wie Kontrollen und Re-Kalibratoren sowie die Proben müssen vor Gebrauch Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) annehmen. Alle Reagenzien und Proben müssen gemischt werden, ohne dass sich dabei Schaum bildet. Die Reagenzien-Cartridges können sofort nach der Entnahme aus dem Kühlschrank verwendet werden.
- Auf den Geräten befindliche Proben, Kontrollen und Re-Kalibratoren sollten wegen möglicher Verdunstungseffekte innerhalb von 2 Stunden gemessen werden.
- Sofern mit einem *Secondary Sample Holder (Sekundärprobenhalter)* (HYI-5437) für Sekundärröhrchen gearbeitet wird, können maximal 20 Proben inklusive Kontrollen und/oder Re-Kalibratoren verwendet werden. Diese müssen in die Sekundärröhrchen pipettiert werden und die jeweiligen Barcodes der Kontroll-/ Re-Kalibrator-Fläschchen und, falls vorhanden, auch der Proben müssen analog mit dem externen Barcodescanner eingelesen werden.

6.2 Durchführung

- Der DRG:HYBRiD-XL Calprotectin hat eine **gesamte Testdauer von 60 Minuten**.
- Um eine einwandfreie Funktion des Tests sicherzustellen, sind die gerätespezifischen Anweisungen im Benutzerhandbuch für den DRG:HYBRiD-XL zu befolgen.
- Alle für die korrekte Anwendung benötigten testspezifischen Informationen werden über die jeweiligen Barcodes der Reagenzien eingelesen.
Die Barcodes dürfen nicht beschädigt werden!
- **Es wird empfohlen, die Segmente mit den Reagenzien-Cartridges vor dem Einsetzen auf den Rotor einmal mit der Unterseite auf eine Tischfläche aufzuklopfen. Dadurch sollen ein Anheften der Flüssigkeit an der Versiegelung der Cartridge und Schaumbildung verhindert werden.**
- Reagenzien-Cartridges im Reagenzienrotor des Gerätes platzieren. Das Temperieren auf 37 °C Inkubationstemperatur erfolgt selbsttätig im Gerät.

6.3 Kalibration

Jedes DRG:HYBRiD-XL-Reagenz enthält einen Barcode mit den spezifischen Informationen zur Kalibration der Reagenziencharge. Die vorgegebene Masterkurve befindet sich als 2-D-Barcode auf dem Außenetikett des Kits und auf dem QC-Datenblatt und muss vor erstmaligem Gebrauch der jeweiligen Kitcharge mit dem zugehörigen Barcodescanner eingescannt werden.

Eine Re-Kalibration wird empfohlen:

- wenn eine neue Kitlot verwendet wird. Vor dem Einsatz in der Routine sollte jede neue Lot verifiziert werden, indem ein Rekalibrierungs- und Kontrolllauf mit den Kit-internen Re-Kalibratoren und Kontrollen durchgeführt wird.
- wenn eine der oder beide Assay-Kontrollen nicht innerhalb der definierten Grenzen liegen.
- nach einer Woche bei Verwendung derselben Reagenzpackung auf dem Gerät.

6.4 Ergebnisermittlung

Die DRG:HYBRiD-XL-Systemsoftware berechnet automatisch die Analytkonzentration jeder Probe.

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollen entsprechend den gesetzlichen Vorgaben einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Zur Analyse der Kontrollwerte und Trends müssen geeignete statistische Verfahren angewendet werden. Wenn die Ergebnisse der Kontrollen nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte das Verfallsdatum und die Lagerungsbedingungen der Reagenzien sowie die Funktionstüchtigkeit des Gerätes. Zusätzlich muss eine Re-Kalibration durchgeführt werden.

Sollten diese Überprüfungsmaßnahmen keine Fehler zeigen, setzen Sie sich bitte mit Ihrem lokalen Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

7.1 Interne Kontrollen

Zur Qualitätskontrolle sind die beiden in jedem Kit mitgelieferten internen Kontrollen einzusetzen.

Die Sollwerte und Sollwertbereiche der beiden internen Kontrollen (*Control 1 & 2*) wurden durch den Hersteller ermittelt und sind in dem QC-Zertifikat aufgeführt, das dem Kit beiliegt. Die im QC-Zertifikat angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge.

Die internen Kontrollen sollten in Einfachbestimmung gemessen werden:

- als Routinekontrolle bei Gebrauch des Tests (z.B. einmal alle 24 Stunden)
- bei einer Re-Kalibration (falls eine oder beide internen Assay-Kontrollen außerhalb des Sollbereichs liegen)
- beim ersten Einsatz einer neuen Charge, um eventuelle Beeinträchtigungen der Kitperformance durch nicht sachgemäßen Transport bzw. falsche Lagerung während des Transports zu erkennen.

7.2 Externe Kontrollen

Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollintervalle und Kontrollwertebereiche für externe Kontrollen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors anzupassen. Alle Ergebnisse müssen innerhalb der definierten Grenzen liegen.

Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen treffen für den Fall, dass die Werte der externen Kontrollen außerhalb der Grenzen liegen.

8 ERWARTETE WERTE

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Wertebereiche für normale und pathologische Werte ermittelt.

Studie 1: In einer klinischen Studie wurde Calprotectin im Stuhl von 302 augenscheinlich gesunden **Kindern** bestimmt (12).

| Alter | n | Median Calprotectin im Stuhl (µg/g) |
|---------------|-----|-------------------------------------|
| 0 - 3 Monate | 14 | 345 (195 - 621) |
| 3 - 6 Monate | 13 | 278 (85 - 988) |
| 6 - 12 Monate | 27 | 183 (109 - 418) |
| 1 - 4 Jahre | 89 | 75 (53 - 119) |
| 4 - 12 Jahre | 159 | 28 (25 - 35) |

Studie 2: In dieser klinischen Studie wurde Calprotectin im Stuhl von 117 augenscheinlich gesunden **Kindern** bestimmt (13).

| Alter | n | Median Calprotectin im Stuhl (µg/g) |
|---------------|----|-------------------------------------|
| 4 - 6 Jahre | 27 | 28,2 |
| 7 - 10 Jahre | 30 | 13,5 |
| 11 - 14 Jahre | 27 | 9,9 |
| 15 - 17 Jahre | 33 | 14,6 |

Diese Werte stimmen gut mit publizierten klinischen Daten überein (14-15).

Der empfohlene Cut-off-Wert für Erwachsene (50 µg/g) kann auch für Kinder von 4 - 17 Jahren verwendet werden.

In einer Studie mit offensichtlich gesunden **Erwachsenen** sowie Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ergaben sich mit dem DRG:HYBRiD-XL HYE-5767 folgende Werte:

| | Population | Gesund | Entzündliche Darmerkrankung |
|--------------------------------|------------|--------------|-----------------------------|
| n | | 50 | 61 |
| Bereich (µg/g) | | 2,6 - 103 | 51,0 - > 1500 |
| Mittelwert (µg/g) | | 17,78 | 524 |
| 2,5. - 97,5. Perzentile (µg/g) | | 4,19 - 71,87 | 63,9 - > 1500 |
| Median (µg/g) | | 25,27 | 377 |

8.1 Interpretation der Ergebnisse

- Der Median für gesunde Erwachsene liegt bei zirka 18 µg/g (5).
- Proben mit einer Konzentration von Calprotectin < 50 µg/g werden als negativ bewertet.
- Proben mit einer Konzentration von Calprotectin zwischen 50 µg/g und 200 µg/g werden als grenzwertig positiv bewertet. Eine Messung zu einem späteren Zeitpunkt wird empfohlen, um das Ergebnis zu bestätigen.
- Proben mit einer Konzentration von Calprotectin > 200 µg/g werden als positiv bewertet.

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

9 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10 TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Messbereich

Der Messbereich ist definiert durch die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) und den Maximalwert der Masterkurve.

Werte unterhalb des Messbereichs werden mit „< 7,013 µg/g“ angegeben.

Werte oberhalb des Messbereichs werden mit „> 1500 µg/g“ angegeben.

Der Messbereich des Tests liegt zwischen 7,01 µg/g - 1500 µg/g.

10.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version.

10.3 Sensitivität

Die Sensitivitätsstudie wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 1,180 µg/g.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 7,013 µg/g.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 19,697 µg/g.

Die Daten zu

10.4 Präzision

10.5 Wiederfindung

10.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10.7 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL) hat keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Calprotectin in einer Probe haben.

10.8 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 10000 µg/g Calprotectin nicht auf.

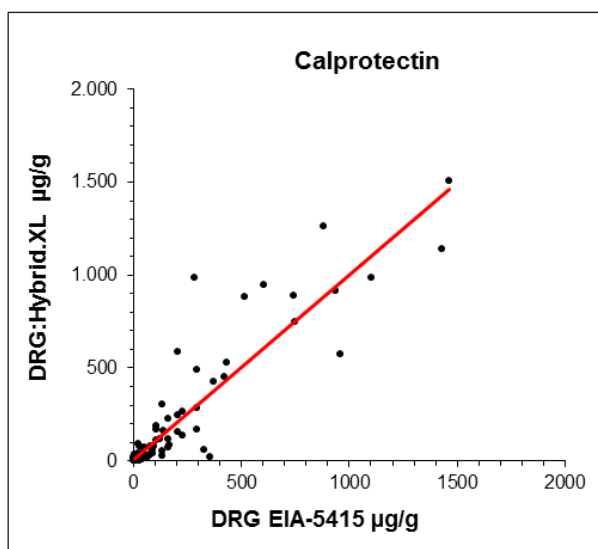
11 METHODENVERGLEICH

Ein Vergleich des DRG:HYBRID-XL Calprotectin Tests HYE-5767 (y) mit dem DRG Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1h) ELISA (EIA-5415) (x) in einem klinischen Patientenkollektiv ergab folgende Korrelation:

$$n = 98$$

$$r = 0,912$$

$$y = 0,993x + 9,788$$



12 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

12.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers durchgeführt werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitzuführen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

12.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 12.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

12.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Testkit-Chargen können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausche haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Ansprüche, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 12.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Weitergehende Informationen siehe Benutzerhandbuch des DRG:HYBRID-XL, gerätespezifische Applikationsblätter, Produktinformationen und Packungsbeilagen aller erforderlichen Komponenten.

1 INTRODUZIONE

1.1 Campo di applicazione

Il DRG:HYBRiD-XL Calprotectin è un dosaggio immuno-enzimatico per la determinazione *diagnostica in vitro* di calprotettina **nelle feci**. Da usare soltanto con il Sistema DRG:HYBRiD-XL Analyzer.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il DRG:HYBRiD-XL Calprotectin Kit è un saggio immune-assorbente, legante enzimi nella fase solida (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I pozzetti sensibilizzati (ACW) delle cartucce di reagenti sono adesi con anticorpi monoclonali diretti contro un sito antigenico unico della molecola calprotettina.

Un'aliquota del campione del paziente contenente calprotettina endogena viene incubato nei pozzetti sensibilizzati con un coniugato enzimatico, che è un anti-calprotettina anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano.

Dopo un'incubazione, il coniugato non legato viene rimosso durante il lavaggio dell'pozzetto.

La quantità di coniugato con perossidasi legato è proporzionale alla concentrazione di calprotettina nel campione.

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato, l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di calprotettina nel campione.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Questo test kit è per l'uso diagnostica in vitro. Solo per l'uso professionale.
- Questo test kit può essere usato soltanto in combinazione con il DRG:HYBRiD-XL Analyzer
- Prima di iniziare il saggio, leggere le istruzioni completamente ed attentamente. Usare la versione valida fornita assieme al kit. Assicurarsi che ogni passaggio sia chiaro e compreso.
- Non rimuovere, cambiare, scaricare o danneggiare le etichette con il codice a barra fornito con ogni kit e i suoi componenti. Tutti i codici a barra fanno parte di un Sistema integrale per il lotto del kit.**
- Rispettare le misure generali di sicurezza per l'uso di reagenti da laboratorio.
- Tutti reagenti di questo kit che contengono siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi per HIV I/II, HBsAg e HCV da procedimenti approvati dal FDA. Tutti reagenti, comunque, devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente dannoso nell'uso e nella scarica.
- Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le membrane mucose.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici in aree dove i reagenti del kit o i campioni sono trattati.
- Utilizzare guanti usa e getta durante la manipolazione di campioni e reagenti. La contaminazione microbica dei campioni o reagenti può causare risultati falsi.
- Il lavoro deve essere eseguito seguendo i procedimenti definiti dalle linee guide nazionali appropriate sulla sicurezza di materiale biologico.
- Non utilizzare reagenti scaduti, come indicata dall'etichetta.
- Cartucce di reagenti non usati devono essere conservate a 2 °C a 8 °C nella busta chiudibile fornita con il materiale essiccante.
- Risultati del test ottimali sono ottenuti soltanto usando pipette calibrate.
- Non mescolare o usare component provenienti da numeri di lotto differenti. Si avverte di non interscambiare cartucce di reagenti di differenti kit, anche se dello stesso lotto. I test kit possono essere trasportati o conservati sotto condizioni diverse e le caratteristiche di legame dei ACW nelle cartucce può variare leggermente.
- Alcuni reagenti contengono Proclin 300, BND e/o MIT come conservanti. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, lavare immediatamente con acqua abbondante.
- Il substrato TMB ha un effetto irritante per la pelle e le mucose. In caso di un possibile contatto, lavare gli occhi con abbondante acqua e la pelle con sapone e abbondante acqua. Lavare oggetti contaminate prima di ri-usarli. Se inalato, portare la persona all'aria aperta.
- Sostanze chimiche e reagenti preparati o usati devono essere trattati come rifiuto pericoloso, seguendo le linee guide o regolamenti nazionali sul materiale biologico a rischio.

18. Per informazioni su sostanze rischiose inclusi nel kit si prega di consultare la scheda di sicurezza.

Per personale professionale le schede di sicurezza sono disponibile su richiesta direttamente dalla DRG.

4 REAGENTI

4.1 Reagenti forniti

4.1.1 Reagent Cartridges (Cartucce di reagenti)

40 pezzi contenenti il seguente:

- **Antibody Coated Well (ACW)** (pozzetti ricoperti con anticorpi) Ricoperti con anti-calprotettina anticorpo (monoclonale).
- **Enzyme Conjugate** (Coniugato enzimatico), 160 µL, Anti-calprotettina anticorpo coniugato con perossidasi di rafano; Contiene conservanti non a base di mercurio.
- **Substrate Solution** (Soluzione substrato), 260 µL Benzidine tetrametilico (TMB).

4.1.2 Re-Calibrator 1 & 2 (Re-Calibratore 1 & 2)

2 flaconi, 1 mL ognuno, pronto all'uso;

Per la re-calibrazione del test quantitativo DRG:HYBRiD-XL Calprotectin.

Concentrazioni sono specifiche al lotto.

Contiene conservanti non a base di mercurio.

4.1.3 Control 1 & 2 (Controllo 1 & 2)

2 flaconi, 1 mL ognuno, pronto all'uso;

Per valori di controllo e limiti si prega di fare riferimento al codice di barra sull'etichetta o al QC-Datasheet.

Contiene conservanti non a base di mercurio.

4.2 Materiale necessario ma non fornito

- Attrezzatura da laboratorio richiesto
- Acqua ultra-pura
DRG raccomanda l'uso di acqua per reagenti di laboratorio clinico (CLRW) in accordo alle linee guide CLSI 3C-A4 con la seguente specificazione:
Resistività a 25 °C [MΩ·cm]: > 10
Conducibilità a 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 0.1
Carbonio organico totale/p.p.b.[µg/L] : < 50
Colloidi [µg/mL]: < 0.05
- [REF] HYB-5252 DRG:HYBRiD-XL Analyzer
- [REF] HYI-5392: *System Solution 5L*, 5000 mL;
(Acqua da alimentazione strumentale in accordo con le linee guide CLSI 3C-A4 con la seguente specificazione può essere usata:
Resistività a 25 °C [MΩ·cm]: > 1
Conducibilità a 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 1
Carbonio organico totale/p.p.b.[µg/L] : < 200
Colloidi [µg/mL]: < 0.1)
- [REF] HYI-5394: *Wash Buffer* (Tampone di lavaggio), 40x concentrato, 25 mL
- [REF] HYI-5395: *Needle Cleaning Solution* (Soluzione lavaggio ago), 30 mL.
Soluzione di lavaggio per l'ago (manutenzione giornaliera e settimanale; fare riferimento al manuale d'uso DRG:HYBRiD-XL)
- [REF] HYI-5387: *Cuvettes* (Cuvette), (2 x 360 pezzi)

Per l'uso del *Secondary Sample Holder* (Sostegno secondario dei campioni) per tubetti secondari i seguenti tubetti sono richiesti:

- [REF] HYI-5391: *Sample Tubes (Secondary)* (Tubetti di campioni secondari), 2500 pezzi.

4.3 Condizioni di conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a 2 °C a 8 °C al fine di garantire le prestazioni del prodotto fino alla data di scadenza definita.

Se conservato a 2 °C a 8 °C, i kit **non aperti** sono stabili fino alla data di scadenza. Non utilizzare i kit oltre questa data.

- Le cartucce conservati a 2 °C a 8 °C nella bustina di plastica trasparente fornita, non aperti, sigillati accuratamente e protetta dall'umidità sono stabili fino alla data di scadenza.
- Re-calibratori e controlli non aperti (conservati a 2 °C a 8 °C) sono stabili fino alla data di scadenza.

Reagenti aperti e le cartucce reagenti devono essere conservati a 2 °C a 8 °C.

Una volta che la busta di plastica è stata aperta, occorre prestare attenzione a richiuderla ermeticamente con il sacchetto dessiccante in dotazione.

Immediatamente dopo l'analisi svolta bisogna rimuovere i re-calibratori ed i controlli dallo strumento e conservarli ben chiusi a 2 °C a 8 °C.

- Cartucce non usati e conservati (a 2 °C a 8 °C) nella bustina di plastica trasparente fornita sono stabili fino alla data di scadenza, se conservato come descritto sopra.
- Cartucce aperti o forati devono essere smaltiti immediatamente.

4.3.1 Stabilità a bordo

Per re-calibratori e controlli la stabilità a bordo è stata valutata in condizioni controllate di laboratorio a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C).

A causa delle differenze nelle condizioni ambientali di laboratorio e dei volumi dei reagenti, la stabilità a bordo può discostarsi dal valore dichiarato.

4.4 Preparazione dei reagenti

Portare tutti reagenti, i controlli e i re-calibratori a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) prima dell'uso.

Le cartucce dei reagenti possono essere usate direttamente dal frigorifero.

Wash Buffer (Tampone di lavaggio) (non incluso nel kit)

Per il tampone di lavaggio (1x) diluire 25 mL di *Tampone di lavaggio* (40x) con 975 mL di acqua ultra-pura fino ad un volume finale di 1000 mL.

Il tampone di lavaggio diluito (1x) è stabile per 2 settimane a temperature ambiente.

4.5 Scarica del kit

La scarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali.

Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nella scheda di dati di sicurezza.

4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DRG deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricezione del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

5 RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Campioni di feci possono essere usati per questo saggio.

Per una determinazione si bisogna di almeno 66 µL di un campione. Questo include 6 µL di campione e un volume morto di 60 µL.

- Non usare calibratori o controlli esterni stabilizzati con azidi.

5.1 Raccolta dei campioni

Raccomandiamo **fortemente** l'uso del sistema **Fecal Extraction System 2.6 (FES; Cat. No.: HYI-5989)**.

Per la preparazione delle feci per il test DRG:HYBRiD-XL Calprotectin si può usare **soltanto Fecal Extraction System 2.6 (FES; Cat. No.: HYI-5989)**.

Per il test DRG Calprotectin test (HYE-5767) non sono stati testati altri sistemi d'estrazione.

Per la preparazione dei campioni si prega di seguire le istruzioni allegati al pacchetto HYI-5989.

Dopo aver preparato i campioni nei tubetti FES, i campioni delle feci sono pronti all'uso per il DRG:HYBRiD-XL Calprotectin test.

Spostare i tubetti aperti nell'adattatore per l'arco primario.

5.2 Conservazione e preparazione dei campioni

Feci puri

Calprotettina nelle feci è descritta di essere stabile per circa 3 giorni a temperatura ambiente (8).

Nonostante raccomandiamo di conservare i campioni per non più di 48 h a 2 °C a 8 °C.

Una conservazione prolungata (fino a 12 mesi) è possibile a -20 °C. Permettere ai campioni di scongelare lentamente, preferibilmente a 2 °C - 8 °C e portare i campioni a temperatura ambiente prima dell'analisi. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Il congelamento dei campioni può causare la rottura dei granulociti neutrofili con conseguente rilascio di calprotettina. Pertanto si aspetta di trovare livelli di calprotettina leggermente più alti in campioni congelati rispetto a campioni freschi.

Estratti di feci

L'estratto di feci è stabile a temperatura ambiente, 2 °C - 8 °C e -20 °C per 9 giorni.

Evitare più di tre cicli di congelamento-scongelamento.

5.3 Diluizione dei campioni

5.3.1 Diluizione dei campioni manuale

Se in un primo saggio un campione contiene concentrazioni più alte rispetto allo standard più alto, questo **campione pre-diluito di feci (diluizione 1:100 nel tubetto FES, vedi capitolo 5.1)** deve essere diluito ulteriormente con il diluente dei campioni (Sample Diluent*) e analizzato nuovamente come descritto nel procedimento del saggio. Per il calcolo delle concentrazioni questo fattore di diluizione deve essere considerato.

Esempio:

a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Sample Diluent* (mescolare intensamente)

* *Sample Diluent per la diluizione manuale non è incluso in questo kit, ma può essere ordinato (REF) HYE-5767-DIL, 20 mL.*

6 PROCEDIMENTO OPERATIVO

6.1 Note generali

- Tutti i reagenti, i controlli, i re-calibratori e i campioni devono essere portati a temperature ambiente (20 °C a 25 °C) prima dell'uso. Tutti i reagenti e campioni devono essere mescolati evitando la formazione di schiume. Le cartucce dei reagenti possono essere usate direttamente dal frigorifero.
- I campioni, controlli e re-calibratori devono essere saggiati entro 2 ore per evitare eventuali effetti di evaporazione.
- Il *Secondary Sample Holder* (HYI-5437) (la porta campioni secondari) per provette secondarie ha la capacità per un massimo di 20 campioni incluso i controlli e i re-calibratori. Tutti questi devono travasati nelle provette secondarie e i rispettivi codici a barra dei controlli /re-calibratori e, se disponibili, i codici dei campioni devono essere letti con lo scanner esterno per codici a barra.

6.2 Procedimento del test

- **Il tempo di dosaggio totale per DRG:HYBRiD-XL Calprotectin è 60 minuti.**
- Per assicurare uno svolgimento appropriato del saggio, si devono seguire strettamente le istruzioni nel manuale d'uso per DRG:HYBRiD-XL.
- Tutte le informazioni richieste per il test per una corretta operazione sono incluse nei codici a barra rispettivi dei reagenti. **Attenzione a non danneggiare questi codici a barra!**
- **Si raccomanda di battere leggermente il fondo delle cartucce dei reagenti prima di inserirli nel rotore. Questo serve per evitare la formazione di schiume e l'adesione dei liquidi sulla chiusura delle cartucce dei reagenti.**
- Posizionare le cartucce nel rotore dello strumento. Il riscaldamento alle temperature d'incubazione di 37 °C avviene automaticamente nello strumento.

6.3 Calibrazione

Ogni reagente del DRG:HYBRiD-XL contiene un codice a barra con le informazioni specifiche per la re-calibrazione del lotto dei reagenti. La curva Master è stampata come un codice a barra 2-D sull'etichetta esterna del pacchetto del kit e sul "QC-Datasheet" incluso e deve essere letto con lo scanner esterno da codici a barra prima del primo uso del rispettivo lotto del kit.

Si raccomanda la re-calibrazione:

- se si utilizza un nuovo lotto del kit. Ogni nuovo lotto dovrebbe essere verificato eseguendo i re-calibratori e controlli interni del kit prima dell'uso routine.
- se uno o entrambi i controlli del saggio sono fuori specifiche.
- Dopo 1 settimana d'uso dello stesso kit di reagenti sullo strumento.

6.4 Calcolo dei risultati

Le concentrazioni degli analiti sono calcolate automaticamente dal Sistema software del DRG:HYBRID-XL.

7 CONTROLLO QUALITÀ

Si raccomanda di usare campioni di controllo in base ai regolamenti statali o federali. L'uso dei campioni di controllo è consigliato per assicurare la validità dei risultati giorno per giorno.

Si raccomanda inoltre di partecipare ai programmi nazionali o internazionali della valutazione della qualità per assicurare la precisione dei risultati.

Applicare metodi statistici appropriate per analizzare i valori di controllo e i trend. Se i risultati del saggio non sono in accordo con i campi accettabili del materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati non validi. In questo caso si prega di controllare il seguente: date di scadenza e condizioni di conservazione dei reagenti, affidabilità operativa dell'analizzatore. Inoltre, è indicato performare la ri-calibrazione.

In caso di ulteriori domande si prega di contattare direttamente Suo distributore locale DRG.

7.1 Controlli Interni

Per il controllo qualità è necessario usare due controlli interni provisti con ogni kit.

I limiti di accettazione di entrambi i controlli (*Control 1 & 2*) sono stati stabiliti dal produttore e sono riportati sul Datasheet QC incluso nel kit. Notare che i valori d'attesa e i limiti di accettazione riportati nel Datasheet QC si riferiscono sempre al lotto del kit attuale.

I controlli interni sono da eseguire in determinazione singola:

- Come routine (p.es. uno ogni 24 h)
- Se una re-calibrazione è richiesta (se uno o entrambi controlli interni sono fuori specifiche)
- Se un nuovo lotto di un kit è usato (per evitare ogni eventuale impatto negativo sul rendimento del test dovuto a trasporto non idoneo o per rilevare una conservazione inadeguata durante il trasporto).

7.2 Controlli esterni

Usare controlli sia per livelli normali sia patologici. Gli intervalli dei controlli esterni devono essere adattati alle richieste individuali di ogni laboratorio. Tutti i risultati devono essere all'interno degli intervalli definiti. Ogni laboratorio deve stabilire le misure correttive da intraprendere in caso che i valori dei controlli esterni non sono trovati negli intervalli definiti.

8 VALORI NORMALI ASPETTATI

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisce i propri valori normali e patologici.

Studio 1: in uno studio clinico, la concentrazione di calprotectina è stata determinata in 302 **bambini** apparentemente sani (12).

| Età | n | Valore mediano di calprotectina fecale (µg/g) |
|-------------|-----|---|
| 0 - 3 mesi | 14 | 345 (195 - 621) |
| 3 - 6 mesi | 13 | 278 (85 - 988) |
| 6 - 12 mesi | 27 | 183 (109 - 418) |
| 1 - 4 anni | 89 | 75 (53 - 119) |
| 4 - 12 anni | 159 | 28 (25 - 35) |

Studio 2: in uno studio clinico, la concentrazione di calprotectina è stata determinata in 117 **bambini** apparentemente sani (13).

| Età | n | Valore mediano di calprotectina fecale (µg/g) |
|--------------|----|---|
| 4 - 6 anni | 27 | 28,2 |
| 7 - 10 anni | 30 | 13,5 |
| 11 - 14 anni | 27 | 9,9 |
| 15 - 17 anni | 33 | 14,6 |

Questi valori corrispondono con altri valori clinici riportati (14-15). Un valore cut-off per adulti (50 µg/g) può essere usato per bambini tra 4 e 17 anni.

In uno studio clinico con **adulti** apparentemente sani e con pazienti con malattia infiammatoria cronica intestinale usando il DRG:HYBRID-XL HYE-5767 sono stati ottenuti i seguenti risultati:

| Popolazione | Sani | malattia infiammatoria cronica intestinale |
|--------------------------------|--------------|--|
| n | 50 | 61 |
| Intervallo (µg/g) | 2,6 - 103 | 51,0 - > 1500 |
| Media (µg/g) | 17,78 | 524 |
| 2,5% - 97,5% Percentile (µg/g) | 4,19 - 71,87 | 63,9 - > 1500 |
| Mediano (µg/g) | 25,27 | 377 |

8.1 Interpretazione dei risultati

- o Il valore medio in adulti sani è circa 18 µg/g (5).
- o Campioni con una concentrazione di calprotectina < 50 µg/g sono ritenuti negativi.
- o Campioni con una concentrazione di calprotectina tra 50 µg/g e 200 µg/g sono ritenuti come positivi borderline. Raccomandiamo di ripetere l'analisi in un secondo tempo per confermare il risultato.
- o Campioni con una concentrazione di calprotectina > 200 µg/g sono ritenuti positivi.

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio.

Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

9 LIMITI ALL'USO

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP). Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

10 CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

10.1 Intervallo dinamico del saggio

L'intervallo dinamico del saggio è definito dai limiti di rilevabilità e dal valore massimo della Curva Master.

Valori trovati sotto l'intervallo del saggio sono indicati come "< 7,013 µg/g".

Valori trovati sopra l'intervallo del saggio sono indicati come "> 1500 µg/g".

Il campo del saggio sta tra 7,01 µg/g – 1500 µg/g.

10.2 Specificità degli anticorpi (Reattività ad incrocio)

Per i dati si prega di far riferimento alla versione inglese più dettagliata delle istruzioni d'uso.

10.3 Sensibilità

Lo studio della sensibilità è stato disegnato seguendo le linee guida CLSI EP17-A2.

Il limite del bianco (LoB) è 1,180 µg/g.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 7,013 µg/g.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 19,697 µg/g.

Dati dettagliati su

10.4 Precisione

10.5 Recupero

10.6 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10.7 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), non influenza i risultati del test.

Fino ad oggi nessuna sostanza (droga), a nostra conoscenza, ha un effetto sul risultato di calprotectina in un campione.

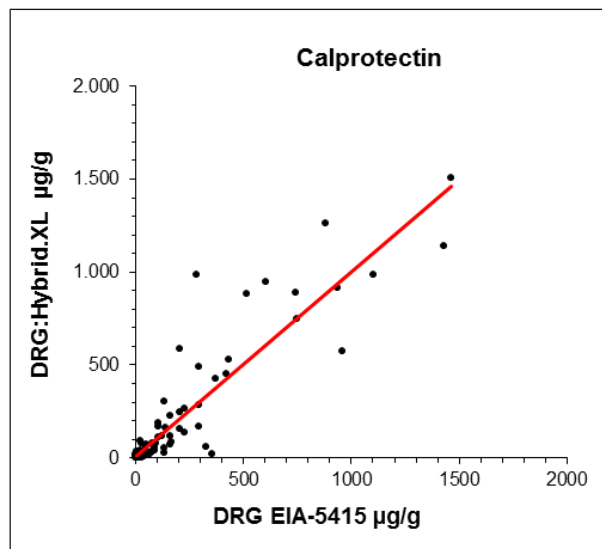
10.8 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Nessun effetto Hook (gancio) è stato osservato in questo prodotto fino a 10000 µg/g di calprotectina.

11 COMPARAZIONE METODICA

Una comparazione del DRG:HYBRID-XL Calprotectin Test HYE-5767 (y) e del DRG Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1h) ELISA (EIA-5415) (x) e usando campioni clinici da la seguente correlazione:

$$\begin{aligned} n &= 98 \\ r &= 0,912 \\ y &= 0,993x + 9,788 \end{aligned}$$

**12 ASPETTI LEGALI****12.1 Affidabilità dei risultati**

Il test deve essere eseguito esattamente come descritto nelle istruzioni d'uso del produttore. Inoltre, l'utente deve seguire strettamente le regole di GLP (Practice Buona pratica del laboratorio) o altri standard e/o leggi nazionali applicabili. Questo è specialmente applicabile per l'uso dei reagenti di controllo. È importante includere sempre un numero sufficiente di controlli all'interno di ogni saggio per validare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutti i controlli stanno all'interno dell'intervallo specificato e se tutti i parametri del test entrano le specifiche dichiarate. In caso di dubbio si prega di prendere contatto con la DRG.

12.2 Conseguenze terapeutiche

Conseguenze terapeutiche non devono mai essere basate su singoli risultati da laboratorio, anche se tutti i risultati del saggio sono in accordo con l'oggetto come riportato nel punto 12.1. Ogni risultato da laboratorio fa soltanto parte del quadro clinico totale di un paziente.

Soltanto in casi dove i risultati del laboratorio sono in accordo ragionevole con il quadro clinico complessivo del paziente, si possono derivare delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato stesso del test non deve essere mai usato da solo per determinare qualunque conseguenza terapeutica.

12.3 Responsabilità

Ogni modifica del test kit e/o lo scambio o il mescolamento di alcun componente proveniente dal kit con diversi numeri di lotto può avere effetti negativi sui risultati e sulla validità dell'intero test.

Queste modifiche e/o scambi annullano ogni richiesta di garanzia.

Richieste dovute all'interpretazione errata da parte del cliente dei risultati del laboratorio soggetto al punto 12.2 sono invalide.

Comunque, in caso di una richiesta di garanzia, la responsabilità del produttore non eccede il valore del test kit.

Ogni danno causato al test kit durante il trasporto non è soggetto alla responsabilità del produttore.

Per ulteriori informazioni si prega di far riferimento al manuale d'uso del DRG:HYBRID-XL, ai fogli specifici per l'analizzatore, alle informazioni del prodotto e agli inserti del pacco di tutti i componenti necessari.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Uso previsto

El **DRG:HYBRiD-XL Calprotectin** es un inmunoensayo enzimático para el diagnóstico in vitro por medio de la medición cuantitativa de calprotectina en heces.

Solo para uso con el analizador DRG:HYBRiD-XL.

2 PROCEDIMIENTO DEL TEST

El Kit DRG:HYBRiD-XL Calprotectin es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) **tipo sandwich**.

Los pocillos con anticuerpos de los cartuchos de reactivos (ACW) están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único sitio antigénico de la molécula calprotectina.

Una alícuota de la muestra del paciente que contiene calprotectina endógena se incuba en el pocillo recubierto con conjugado enzimático, que es un anticuerpo contra calprotectina conjugado con peroxidasa de rábano.

Después de la incubación, el conjugado no unido es lavado.

La cantidad de conjugado con peroxidasa unida es directamente proporcional a la concentración de calprotectina en la muestra.

Una vez añadida la solución sustrato, la intensidad de la coloración que aparece es directamente proporcional a la concentración de calprotectina en la muestra del paciente.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El kit es exclusivamente para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.
2. Este kit puede usarse únicamente en combinación con el analizador DRG:HYBRiD-XL.
3. Antes de comenzar el ensayo, lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Utilice la versión vigente del prospecto que se acompaña con el kit. Asegúrese de que entiende todo correctamente.
4. **No quite, cambie, deseche o dañe las etiquetas de código de barras provistas con cada kit y sus componentes. Todos los códigos de barras forman parte de un mismo sistema integral característico del lote del kit.**
5. Respete las normas generales de seguridad para el uso de reactivos de laboratorio.
6. Todos los componentes del kit que contienen suero humano o plasma han sido analizados y han resultado negativos para VIH I/II, HBsAg (hepatitis B) y HCV (hepatitis C) usando procedimientos aprobados por la FDA. Todos los reactivos, de cualquier modo, son potencialmente dañinos al usarlos y al desecharlos.
7. No pipetee con la boca y evite el contacto de reactivos y muestras con la piel y membranas mucosas.
8. No fume, coma, beba o use cosméticos en áreas en las que se usen las muestras o reactivos del kit.
9. Lleve guantes desechables apropiados cuando manipule muestras y reactivos. La contaminación microbiana de reactivos y muestras puede generar resultados erróneos.
10. Use el kit de acuerdo con los procedimientos definidos por las bases reguladoras nacionales de seguridad ante riesgos biológicos.
11. No use los reactivos más allá de la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas del kit.
12. Los cartuchos de reactivos no usados han de almacenarse a 2 °C - 8 °C en las bolsitas de aluminio selladas que han de incluir el desecante provisto.
13. Únicamente pueden obtenerse resultados óptimos en el test usando pipetas calibradas.
14. No mezcle o use componentes de kits con distintos números de lote. Se recomienda no intercambiar cartuchos de reactivos de distintos kits incluso del mismo lote. Los kits han podido ser transportados o almacenados en diferentes condiciones y las características de unión de los pocillos recubiertos con anticuerpos pueden variar ligeramente.
15. Algunos reactivos contienen Proclin 300, BND y/o MIT como conservantes. En caso de contacto con los ojos o la piel, aplique agua inmediatamente.
16. La Solución sustrato TMB tiene un efecto irritante en la piel y mucosas. En caso de posible contacto, lave los ojos con un abundante volumen de agua y la piel con jabón y mucha agua. Lave objetos contaminados antes de reusarlos. En caso de inhalación, exponga a la persona al aire libre.

17. Los productos químicos y reactivos preparados o usados del kit han de ser tratados como desechos peligrosos siguiendo las bases reguladoras nacionales de seguridad ante riesgos biológicos.
18. Para información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit consulte las hojas de datos de seguridad de los materiales. Éstas están disponibles para uso profesional y han de solicitarse directamente a DRG.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos provistos

4.1.1 Cartuchos de reactivos

40 unidades que contienen lo siguiente:

- **Antibody Coated Well (ACW)** (Pocillos recubiertos con anticuerpos)
Recubiertos con anticuerpo anti-calprotectina (monoclonal).
- **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 160 µL,
Anticuerpo anti-calprotectina conjugado con peroxidasa de rábano;
Contiene conservantes sin mercurio.
- **Substrate Solution** (Solución sustrato), 260 µL
Tetrametilbenzidina (TMB).

4.1.2 Re-Calibrator 1 & 2 (Re-Calibrador 1 & 2)

2 tubos, 1 mL cada, listos para usar;

Para la re-calibración del test cuantitativo DRG:HYBRiD-XL Calprotectin.

Las concentraciones varían dependiendo del lote.

Contiene conservantes sin mercurio.

4.1.3 Controles 1 & 2

2 tubos, 1 mL cada, listos para usar;

Para comprobar los valores control y sus rangos, por favor mire en el código de barras de la etiqueta del tubo o en la ficha técnica (QC-Datasheet).

Contiene conservantes sin mercurio.

4.2 Materiales requeridos pero no provistos

- Equipamiento general de laboratorio requerido
- Agua ultrapure
DRG recomienda el uso de agua del tipo "*Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW)*" de acuerdo con las directrices 3C-A4 del CLSI con las siguientes especificaciones:
Resistividad a 25 °C [MΩ·cm]: > 10
Conductividad a 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 0.1
Carbono orgánico total/p.p.b.[µg/L]: < 50
Coloides [µg/mL]: < 0.05
- [REF] HYB-5252 Analizador DRG:HYBRiD-XL
- [REF] HYI-5392: *System Solution 5L* (Solución de sistema), 5000 mL;
El agua para el instrumento ha de seguir las directrices 3C-A4 del CLSI con las siguientes especificaciones:
Resistividad a 25 °C [MΩ·cm]: > 1
Conductividad a 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 1
Carbono orgánico total/p.p.b.[µg/L]: < 200
Coloides [µg/mL]: < 0.1
- [REF] HYI-5394: *Wash Buffer* (Tampón de lavado), 40x concentrate, 25 mL.
- [REF] HYI-5395: *Needle Cleaning Solution* (Solución de lavado de la aguja), 30 mL. Solución de lavado para la aguja de la pipeta (mantenimiento diario y semanal, ver también el manual de usuario).
- [REF] HYI-5387: *Cuvettes* (Cubetas), (2 x 360 unidades).

Para el uso del soporte de muestras para tubos secundarios (Secondary Sample Holder) se necesitan los siguientes tubos:

- [REF] HYI-5391: *Sample Tubes; Secondary* (Tubos de muestra secundarios), 2500 unidades.

4.3 Condiciones de almacenamiento

Todos los componentes del kit deben de almacenarse a 2 °C y 8 °C para asegurar el rendimiento del producto hasta la fecha de caducidad definida.

Los kits **sin abrir** almacenados a 2 °C y 8 °C mantendrán la reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilice los reactivos después de esta fecha.

- Cartuchos (conservado entre 2 °C y 8 °C) en las bolsas Zip suministradas sin abrir, mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad.
- Re-calibradores y controles (conservado entre 2 °C y 8 °C) sin abrir, mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad.

Los reactivos abiertos y los cartuchos de reactivos deben almacenarse a 2 °C y 8 °C.

Una vez que la bolsa Zip ha sido abierta, se debe cerrar herméticamente de nuevo junto con la bolsa desecante.

Los recalibradores y controles tienen que ser retirados del instrumento **inmediatamente después de cada ensayo**, así como cerrados cuidadosamente y almacenados de 2 °C a 8 °C.

- Cartuchos almacenados en las bolsas Zip (conservado entre 2 °C y 8 °C) mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad, si se almacena como se describe anteriormente.
- Cartuchos perforados o abiertos deben desecharse inmediatamente.

4.3.1 Estabilidad a bordo

Para Re-calibradores y controles la estabilidad a bordo ha sido evaluada bajo condiciones de laboratorio controladas y a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C).

Debido a las diferentes condiciones ambientales de los laboratorios y a los volúmenes diferentes de reactivos, la estabilidad a bordo puede diferir del valor declarado.

4.4 Preparación de los reactivos

Deje que todos los reactivos, como controles y re-calibradores, alcancen temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) antes de su uso.

Los cartuchos de reactivos pueden usarse directamente tras su almacenamiento en un refrigerador.

Wash Buffer (no incluido en el kit)

Para la preparación del tampón de lavado (*Wash Buffer*; 1x), diluya 25 mL del concentrado (*Wash Buffer*; 40x) con 975 mL de agua ultrapura hasta un volumen final de 1000 mL.

El tampón de lavado diluido (1x) es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Desecho del Kit

El desecho del kit y de los materiales/reactivos usados ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor.

Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad (*Safety Data Sheet*).

4.6 Kits defectuosos

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DRG ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

5 COLECCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Deben utilizarse muestras de heces en este ensayo.

Se requiere un mínimo de 66 µL de muestra por medición. Esto incluye 6 µL de muestra y 60 µL de volumen muerto.

- No use estándares o controles externos estabilizados con azida.

5.1 Colección de muestras

Se recomienda **encarecidamente** el uso del **Sistema Fecal de Extracción 2.6 (Fecal Extraction System 2.6, FES; [REF]: HYI-5989)**.

Sólo el Sistema de Extracción Fecal 2.6 (FES, [REF]: HYI-5989) se puede utilizar para la preparación de muestras de heces en el DRG: HYBRID-XL Calprotectin test.

Ningún otro sistema de extracción de calprotectina en heces ha sido probado para el test de Calprotectina de DRG (HYE-5767)

Para la preparación de la muestra siga las Instrucciones de Uso incluidas en el paquete HYI-5989.

Una vez finalizado el proceso de extracción de Calprotectina en heces con el tubo FES, las muestras están listas para usar en el DRG:HYBRID-XL Calprotectin test.

Colocar el tubo de extracción abierto en el adaptador para el arco primario.

5.2 Almacenamiento y preparación de las muestras Muestra reciente de heces

La calprotectina fecal es estable por lo menos 3 días a temperatura ambiente (8).

Sin embargo, se recomienda almacenar las muestras por un máximo de 48 h de 2 °C - 8 °C.

El almacenamiento a largo plazo de hasta 12 meses se recomienda a -20 °C.

Permita que las muestras se descongelen lentamente, preferiblemente de 2 °C - 8 °C, y caliente las muestras a temperatura ambiente antes del análisis. Evite congelar y descongelar las muestras en repetidas ocasiones.

Congelar las muestras puede provocar la liberación de granulocitos neutrófilos en las heces liberando también calprotectina. Por ello, se pueden observar concentraciones levemente más elevadas de calprotectina en las muestras que hayan sido congeladas en comparación con muestras frescas.

Extracto de heces

El extracto de heces es estable por lo menos 9 días a temperatura ambiente, 2 °C - 8 °C o -20 °C.

Evite congelar y descongelarlo más de 3 veces.

5.3 Dilución de muestras

5.3.1 Dilución de muestras manual

Si en un primer ensayo, una muestra contiene más que el estándar más alto, **la muestra fecal pretratada (Dilución 1:100 en el tubo FES, ver capítulo 5.1)** puede ser diluida con diluyente de muestras (Sample Diluent*) y repetir el ensayo como se describe en Procedimiento del Ensayo.

Este factor de dilución ha de tenerse en cuenta para el cálculo de las concentraciones.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL de *Sample Diluent*. Mezclar bien.

* *El diluyente de muestra (Sample Diluent) para dilución manual no se incluye en este kit, pero puede obtenerse por pedido ([REF] HYE-5767-DIL, 20 mL).*

6 PROCEDIMIENTO DEL TEST

6.1 Observaciones generales

- Se debe permitir que todos los reactivos, como controles, re-calibradores y muestras alcancen temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) antes de su uso. Todos los reactivos y muestras deben mezclarse evitando la formación de espuma. Los cartuchos de reactivos pueden usarse directamente después de su almacenamiento en el refrigerador.
- Las muestras, controles y re-calibradores deberían medirse en un periodo de 2 horas para evitar los efectos de una posible evaporación.
- El soporte para tubos secundarios (*Secondary Sample Holder*; HYI-5437) tiene una capacidad máxima de 20 muestras incluyendo los controles y re-calibradores. Todos han de pipetarse en los tubos secundarios. Los códigos de barras de los tubos control/re-calibrador y si están disponibles, los códigos de barra de las muestras, han de leerse con el escáner de código de barras externo.

6.2 Procedimiento del test

- **El tiempo total del ensayo para el DRG:HYBRID-XL Calprotectin es 60 minutos.**
- Para garantizar la correcta utilización del test, han de seguirse cuidadosamente las instrucciones en el manual de usuario del DRG:HYBRID-XL.
- Toda la información específica para la utilización adecuada del test se incluye en los códigos de barras de los reactivos.
¡Intente no dañar los códigos de barras!

- Se recomienda golpear la base de los segmentos de cartucho que contienen los cartuchos de reactivos una vez en la mesa de laboratorio antes de colocarlos en el rotor. Esto es para evitar la formación de espuma y la adherencia de líquido en el envoltorio del cartucho de reactivos.
- Coloque los cartuchos de reactivos en el rotor de la unidad. El calentamiento para la incubación a 37 °C de temperatura se lleva a cabo por la unidad de forma automática.

6.3 Calibración

Cada reactivo en el DRG:HYBRID-XL contiene un código de barras con la información específica para la re-calibración del lote de reactivos. La curva maestra se imprime como un código de barras 2-D en la etiqueta externa del envoltorio del kit y en la ficha técnica (QC-Datasheet) y tiene que ser escaneado con el escáner de código de barras externo antes del primer uso del lote del kit respectivo.

Se recomienda la recalibración:

- si se utiliza un lote de kit nuevo. Cada nuevo lote debe verificarse mediante el análisis de Re-Calibradores y controles internos del kit antes de su uso rutinario.
- si uno o los dos controles del ensayo se encuentran fuera del rango específico descrito.
- después de 1 semana de uso del mismo kit de reactivos en la unidad.

6.4 Cálculo de los Resultados

Las concentraciones de los analitos se calculan automáticamente por el software del sistema.

7 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de muestras control de acuerdo con la normativa estatal y federal. El uso de muestras control se aconseja para asegurar la validez de los resultados.

También se recomienda participar en programas nacionales o internacionales de Evaluación de Calidad para asegurar la exactitud de los resultados.

Use los métodos estadísticos apropiados para analizar los valores control y estimar las tendencias. Si los resultados del ensayo no se encuentran en el rango aceptable establecido de materiales control, los resultados de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor compruebe lo siguiente: fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento de los reactivos y la fiabilidad del funcionamiento del analizador. Además, se indica la realización de una Recalibración (ver capítulo 6.3).

En caso de que tengan dudas por favor contacten su distribuidor local o DRG directamente.

7.1 Controles Internos

Para un apropiado Control de Calidad es necesario el uso de dos controles internos incluidos en cada kit.

Los rangos aceptables para los dos controles internos (Control 1 & 2) han sido establecidos por el fabricante y se resumen en la ficha técnica (QC-Datasheet) incluida en el kit. Note que los valores esperados y los rangos aceptables que se resumen en la ficha técnica (QC-Datasheet) siempre se refieren al lote del kit actual.

Los controles internos han de medirse en una sola determinación:

- de forma rutinaria (p.e. una vez cada 24 h)
- si se requiere re-calibración (si uno o los dos controles internos están fuera del rango aceptable)
- si se usa un nuevo lote del kit (para así evitar cualquier tipo de impacto negativo en el funcionamiento del kit por transporte inapropiado o para detectar un almacenamiento no adecuado durante el transporte).

7.2 Controles Externos

Use controles a niveles fisiológicos (normales) y patológicos.

Los intervalos y rangos control para controles externos deben adaptarse a los requerimientos individuales de cada laboratorio. Todos los resultados han de encontrarse dentro de los límites definidos.

Cada laboratorio debería establecer medidas correctivas si los valores de los controles externos no se encuentran dentro del rango aceptable.

8 VALORES NORMALES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales y patológicos propios.

Estudio 1: En un estudio clínico, la concentración de calprotectina fecal ha sido determinada con 302 niños aparentemente sanos (12).

| Edad | n | Mediana de calprotectina fecal (µg/g) |
|--------------|-----|---------------------------------------|
| 0 - 3 meses | 14 | 345 (195 - 621) |
| 3 - 6 meses | 13 | 278 (85 - 988) |
| 6 - 12 meses | 27 | 183 (109 - 418) |
| 1 - 4 años | 89 | 75 (53 - 119) |
| 4 - 12 años | 159 | 28 (25 - 35) |

Estudio 2: En un estudio clínico, la concentración de calprotectina fecal ha sido determinada con 117 niños aparentemente sanos (13).

| Edad | n | Mediana de calprotectina fecal (µg/g) |
|--------------|----|---------------------------------------|
| 4 - 6 años | 27 | 28.2 |
| 7 - 10 años | 30 | 13.5 |
| 11 - 14 años | 27 | 9.9 |
| 15 - 17 años | 33 | 14.6 |

Estos valores corresponden correctamente con otros valores clínicos conocidos (14-15).

El valor de corte (cut-off) sugerido para adultos (50 µg/g) puede ser usado con niños de 4-17 años.

En un estudio realizado con **adultos** aparentemente sanos y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se observaron los siguientes datos usando el DRG:HYBRID-XL HYE-5767:

| | Población sanos | enfermedad intestinal |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------|
| n | 50 | 61 |
| Rango (µg/g) | 2,6 - 103 | 51.0 - > 1500 |
| Media (µg/g) | 17,78 | 524 |
| Percentil 2,5 - 97,5 (µg/g) | 4,19 - 71,87 | 63.9 - > 1500 |
| Mediana (µg/g) | 25,27 | 377 |

8.1 Interpretación de los resultados

- El valor de la mediana en adultos sanos es aproximadamente 18 µg/g (5).
- Las muestras con una concentración de calprotectina < 50 µg/g están consideradas como negativas.
- Las muestras con una concentración de calprotectina entre 50 µg/g y 200 µg/g están consideradas en el límite de las positivas. Se recomienda repetir la medición en un tiempo posterior para confirmar el resultado.
- Las muestras con una concentración de calprotectina > 200 µg/g están consideradas como positivas.

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica.

Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

9 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio. Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

10 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

10.1 Rango Dinámico del Ensayo

El rango dinámico del ensayo se define de acuerdo con el límite de detección y el valor máximo de la curva maestra.

Los valores que se encuentren por debajo del rango de medida se indican como " $< 7,013 \mu\text{g/g}$ ".

Los valores que se encuentren por encima del rango de medida se indican como " $> 1500 \mu\text{g/g}$ ".

El rango del ensayo se encuentra entre $7,01 \mu\text{g/g}$ - $1500 \mu\text{g/g}$.

10.2 Especificidad de los anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Para información adicional por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10.3 Sensibilidad

El estudio de sensibilidad se diseñó de acuerdo con la normativa EP17-A2 del CLSI.

El límite del blanco (LoB) es $1,180 \mu\text{g/g}$.

El Límite de Detección (LoD) es $7,013 \mu\text{g/g}$.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es $19,697 \mu\text{g/g}$.

Para información sobre

10.4 Resultados de Precisión

10.5 Recuperación del analito

10.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10.7 Sustancias Interferentes

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL) no influencia los resultados del ensayo. Hasta el día de hoy, ninguna sustancia (droga) conocida por nosotros tiene influencia en los resultados de medición de calprotectina en una muestra.

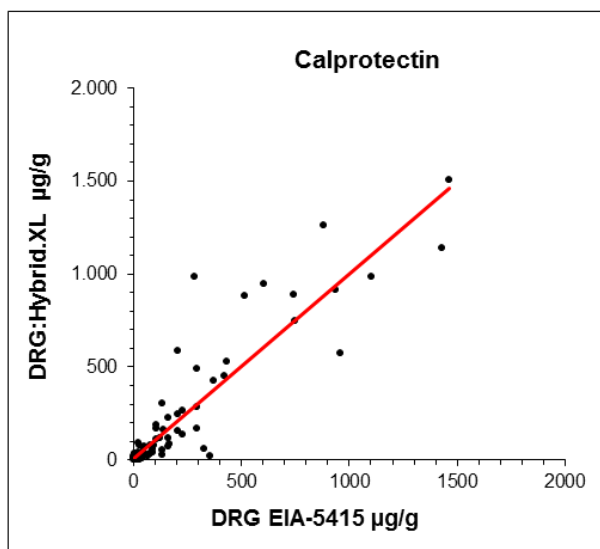
10.8 Efecto de Alta Concentración (Gancho)

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta $10000 \mu\text{g/g}$ de calprotectina.

11 COMPARATIVA DE MÉTODOS

La comparación del test DRG:HYBRiD-XL Calprotectin HYE-5767 (y) y del DRG Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1h) ELISA (EIA-5415) (x) usando muestras clínicas resultó en la siguiente correlación:

$$\begin{aligned} n &= 98 \\ r &= 0,912 \\ y &= 0,993x + 9,788 \end{aligned}$$



12 ASPECTOS LEGALES

12.1 Fiabilidad de los Resultados

El test ha de realizarse siguiendo de forma exacta las instrucciones de uso del fabricante. Adicionalmente, el usuario debe seguir estrictamente las normas de buenas prácticas de laboratorio u otras normativas y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, en el procedimiento del test, un número suficiente de controles para validar la exactitud y precisión del test.

Los resultados del test son válidos solamente si todos los controles se encuentran dentro de los rangos específicos dados y si todos los otros parámetros del test siguen las especificaciones del ensayo dadas. En caso de cualquier duda o inquietud por favor contacte DRG.

12.2 Consecuencias terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas no han de basarse únicamente en los resultados en el laboratorio incluso si todos los resultados del test están de acuerdo con los requisitos mencionados en el punto 12.1. Cualquier resultado en el laboratorio es solo una parte del cuadro clínico del paciente.

Solo en los casos en los que los resultados de laboratorio estén en completa sintonía con el cuadro clínico general del paciente deben aplicarse medidas terapéuticas.

El resultado del test solamente nunca debería ser el único motivo para intervención terapéutica alguna.

12.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o intercambio o mezcla de cualquier componente de distintos lotes del kit podrían afectar negativamente los resultados y la validez de la totalidad del test. La citada modificación y/o intercambio invalida cualquier reclamación de reemplazo.

Las reclamaciones realizadas en base a la interpretación errónea del cliente de los resultados de laboratorio de acuerdo con las directrices del punto 12.2 son también inválidas. De cualquier modo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no sobrepasa el valor del kit. Cualquier daño al kit causado durante su transporte no es responsabilidad del fabricante.

Para información adicional, por favor consulten el Manual de Usuario del DRG:HYBRiD-XL, hojas de aplicaciones específicas del analizador, información del producto y los prospectos de todos los componentes necesarios.

1 WSTĘP

1.1 Przeznaczenie

Test **DRG:HYBRiD-XL** Calprotectin jest testem immunoenzymatycznym stosowanym w diagnostyce *in vitro* do ilościowego pomiaru kalprotektyny **w kale**.

Wyłącznie do użytku razem z analizatorem DRG:HYBRiD-XL Analyzer.

2 ZASADA TESTU

Zestaw testowy HYBRiD-XL Calprotectin jest testem immunosorpcyjnym (ELISA) fazy stałej, opartym o **zasadę sandwich (sandwich principle)**.

Pokryte przeciwciałem studzienki [antibody coated wells (ACW)] kartridżów z odczynnikami są opłaszczane monoklonalne przeciwciałem skierowanym przeciwko jednemu specyficznemu miejscu antygenowemu w cząsteczce kalprotektyny.

Endogenny kalprotektyny próbki pacjenta konkuruje z koniugatem kalprotektyny sprzężonym z peroksydazą chrzanową o wiązanie z powleczonym przeciwciałem.

Po inkubacji, niezwiązany koniugat jest usuwany przez wypłukanie.

Ilość związanego peroksydazą koniugatu jest proporcjonalna do poziomu stężenia kalprotektyny w badanej próbce.

Po dodaniu roztworu substratu, otrzymana intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do poziomu stężenia kalprotektyny w próbce pacjenta.

3 ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Niniejszy zestaw służy tylko do diagnostyki *in vitro*. Tylko do użytku profesjonalnego.
- Niniejszy zestaw może być użyty wyłącznie w połączeniu z DRG:HYBRiD-XL Analyzer.
- Przed rozpoczęciem testu należy dokładnie i uważnie zapoznać się z załączoną instrukcją. Używać aktualnej wersji instrukcji dołączonej do zestawu. Należy upewnić się, czy wszystko jest jasne i zrozumiałe.
- Przed rozpoczęciem testu należy dokładnie i uważnie zapoznać się z załączoną instrukcją. Używać aktualnej wersji instrukcji dołączonej do zestawu. Należy upewnić się, czy wszystko jest jasne i zrozumiałe.**
- Przestrzegać ogólnych środków bezpieczeństwa stosowanych przy pracy z odczynnikami laboratoryjnymi.
- Wszystkie odczynniki niniejszego zestawu testowego, które zawierają surowicę lub osocze pochodzenia ludzkiego, zostały przebadane zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez FDA [Food and Drug Administration: Agencja Żywności i Leków]. W wyniku tych testów stwierdzono, że badane odczynniki są negatywne w kierunku HIV I/II, antygeny HBs oraz HCV. Wszystkie odczynniki powinny być jednak traktowane jako potencjalnie zakaźny materiał biologiczny podczas używania i utylizacji.
- Nie zasysać pipety ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi.
- Nie palić, nie jeść, nie pić i nie używać kosmetyków w miejscach, gdzie pracuje się z próbkami lub odczynnikami zestawu.
- Podczas pracy z próbkami i odczynnikami należy nosić odpowiednie jednorazowe rękawiczki. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne odczynników lub próbek może dać fałszywe wyniki testu.
- Sposób obchodzenia się z komponentami zestawu powinien być zgodny z procedurami bezpieczeństwa określonymi przez odpowiednie krajowe wytyczne lub rozporządzenia dotyczące zagrożenia biologicznego.
- Nie używać odczynników po upływie terminu ważności wskazanego na etykietach zestawu
- Niewykorzystane kartridże z odczynnikami należy przechowywać w temperaturze od 2 °C do 8 °C w szczelnie zamkniętej torebce foliowej z dostarczonym pochłaniaczem wilgoci.
- Optymalne wyniki badań można uzyskać tylko w przypadku korzystania z kalibrowanych pipet.
- Nie mieszać i nie używać komponentów z zestawów o różnych numerach serii. Zaleca się, aby nie wymieniać pasków odczynnikowych pochodzących nawet z tej samej partii. Zestawy mogły być transportowane lub przechowywane w różnych warunkach, co w rezultacie mogło spowodować nieco inne właściwości wiązania studzienek w paskach odczynnikowych.
- Niektóre odczynniki zawierają Proclin 300, BND i/Lub MIT jako środki konserwujące. W przypadku kontaktu z oczami lub skórą, należy niezwłocznie przepłukać je wodą.

- Substrat TMB ma drażniący wpływ na skórę i błony śluzowe. W przypadku ewentualnego kontaktu, należy przemyć oczy obfitą ilością wody, a skórę umyć mydłem i dużą ilością wody. Przepłukać zanieczyszczone przedmioty przed ich ponownym użyciem. W przypadku wdychania, należy zaprowadzić daną osobę na świeże powietrze.
- Substancje chemiczne oraz sporządzone lub użyte odczynniki muszą być traktowane jako odpady niebezpieczne, zgodnie z krajowymi wytycznymi lub przepisami bezpieczeństwa dotyczącymi zagrożenia biologicznego.
- Informacje na temat niebezpiecznych substancji zawartych w niniejszym zestawie znajdują się w kartach charakterystyki [ang. Safety Data Sheets – SDS]. Dla użytkowników profesjonalnych karty charakterystyki dla tego produktu są dostępne na życzenie bezpośrednio u firmy DRG.

4 ODCZYNNIKI

4.1 Odczynniki dostarczone

4.1.1 Reagent Cartridges (Kartridże z odczynnikami)

40 sztuk zawierające:

- **Antibody Coated Well (ACW (Studzienka pokryta przeciwciałem))**, opłaszczona (monoklonalnym) przeciwciałem -kalprotektyny
- **Enzyme Conjugate (Koniugat enzymatyczny)**, 160 µL, anty kalprotektyny przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową; Nie zawiera rtęciowego środka konserwującego.
- **Substrate Solution (Roztwór Substratu)**, 260 µL Tetrametylobenzodyna (TMB).

4.1.2 Re-Calibrator 1 & 2 (Re-Kalibratory 1 & 2)

2 fiołki, każda po 1 mL, gotowe do użycia; Do rekaliibracji testu ilościowego DRG:HYBRiD-XL XL Calprotectin. Stężenia są specyficzne dla danej serii produktu. Nie zawiera rtęciowego środka konserwującego.

4.1.3 Control 1 & 2 (Kontrola 1 & 2)

2 fiołki, każda po, 1 mL, gotowe do użycia; Aby uzyskać informacje na temat wartości oraz zakresów kontroli, należy odnieść się do kodów kreskowych na etykiecie fiołki lub do Arkuszu Kontroli Jakości (QC-Datasheet). Nie zawiera rtęciowego środka konserwującego.

4.2 Materiały wymagane, ale niedołączone do zestawu

- General needed laboratory equipment
- Ultra czysta woda
Firma DRG zaleca użycie wody używanej jako odczynnik w laboratoriach klinicznych (ang. Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW)) zgodnie z opracowanymi przez Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. CLSI) wytycznymi 3C-A4 i posiadającej następujące parametry:
Rezystywność w temperaturze 25 °C [MΩ·cm]: > 10
Przewodnictwo w temperaturze 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 0,1
Całkowity węgiel organiczny/p.p.b.[µg/L] : < 50
Koloidy [µg/mL]: < 0,05
- **[REF] HYB-5252 DRG:HYBRiD-XL Analyzer**
- **[REF] HYI-5392: System Solution 5L (Roztwór systemowy 5L)**, 5000 mL;
(Woda Zasilająca do Analiz Instrumentalnych zgodnie z opracowanymi przez Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. CLSI) wytycznymi 3C-A4 posiadająca następujące parametry może być również użyta:
Oporność w temperaturze 25 °C [MΩ·cm]: > 1
Przewodność w 25 °C [µS·cm⁻¹]: < 1
Całkowity węgiel organiczny /p.p.b.[µg/L] : < 200
Koloidy [µg/mL]: <0.1)
- **[REF] HYI-5394: Wash Buffer (Bufor Płuczący)**, koncentrat o stężeniu czterdziestokrotnym (40x), 25 mL
- **[REF] HYI-5395: Needle Cleaning Solution (Roztwór do czyszczenia igły)**, 30 mL.
Roztwór czyszczący stosowany do czyszczenia igły pipetującej (do dziennej i tygodniowej konserwacji, patrz: instrukcja obsługi)
- **[REF] HYI-5387: Cuvettes [Kuwety]**, (2 x 360 sztuk)

W przypadku korzystania z Secondary Sample Holder (Uchwyty do Próbek Wtórnych) dla próbek wtórnych, wymagane są następujące próbki:

- **[REF]** HYI-5391: *Sample Tubes (Secondary)* (Probówki próbkowe (wtórne)), 2500 sztuk.

4.3 Warunki przechowywania

Wszystkie komponenty zestawu powinny być przechowywane w temperaturze od 2 °C do 8 °C, aby zapewnić wydajność produktu aż do określonej daty ważności.

W przypadku przechowywania w temperaturze od 2 °C do 8 °C, **nieotwarte zestawy** zachowują reaktywność do terminu ważności. Nie używać odczynników po upływie tego terminu.

- Kartridże (przechowywane w temperaturze od 2 °C do 8 °C) dostarczone i zamknięte w foliowych workach zachowują reaktywność do terminu ważności.
- Nieotwarte re-kalibratory i kontrole (przechowywane w temperaturze od 2 °C do 8 °C) zachowują reaktywność aż do daty ważności.

Po otwarciu odczynników i kartridże odczynnikowe muszą być przechowywane w temperaturze od 2 °C do 8 °C. Gdy torebka foliowa została otwarta, należy zachować ostrożność, aby ponownie szczelnie ją zamknąć wraz z dostarczonym pochłaniaczem wilgoci.

Natychmiast po zakończeniu przebiegu kalibratory i kontrole z urządzenia powinny być wyjęte, starannie uszczelnione i przechowywane w temperaturze 2 °C - 8 °C.

- Zamknięte kartridże w otwartych foliowych workach (przechowywane w temperaturze od 2 °C do 8 °C) zachowują reaktywność do daty ważności, jeżeli są przechowywane w sposób opisany powyżej.
- Przebite lub otwarte kartridże muszą być natychmiast usuwane.

4.3.1 Stabilność na pokładzie

Dla re-kalibratorów i kontroli stabilność na pokładzie została oceniona w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych w temperaturze pokojowej (20 °C do 25 °C).

Ze względu na różnice w laboratoryjnych warunkach środowiskowych i objętości reagentów, stabilność na pokładzie może odbiegać od podanej wartości.

4.4 Przygotowanie odczynników

Przed użyciem odczekać, aż wszystkie odczynniki, takie jak kontrole i re-kalibratory, osiągną temperaturę pokojową (20 °C do 25 °C). Wkłady odczynnikowe mogą zostać użyte bezpośrednio po okresie przechowywania w chłodzarkę.

Wash Buffer (Bufor Płuczący) (nie dostarczony w zestawie)

Aby otrzymać Wash Buffer (Bufor Płuczący) (1x), należy rozcieńczyć 25 mL Wash Buffer (Buforu Płuczającego) w postaci koncentratu (40x) za pomocą 975 mL ultra czystej wody, do otrzymania końcowej objętości 1000 mL.

Roztwór (Wash Buffer) Buforu Płuczającego (1x) zachowuje stabilność w temperaturze pokojowej przez 2 tygodnie.

4.5 Utylizacja zestawu

Utylizacji zestawu oraz wszelkich użytych materiałów/ odczynników należy dokonać zgodnie z przepisami obowiązującymi w danym kraju. Informacje specjalne dotyczące tego produktu podane są w kartach charakterystyki (ang. Safety Data Sheets – SDS).

4.6 Uszkodzone zestawy testowe

W każdym przypadku uszkodzenia zestawu testowego lub jego komponentów, należy poinformować firmę DRG na piśmie, najpóźniej na tydzień po otrzymaniu zestawu. Uszkodzone pojedyncze komponenty nie powinny być wykorzystane do przeprowadzenia testu. Należy je przechowywać do momentu podjęcia ostatecznej decyzji rozwiązującej ten problem. Gdy to nastąpi, należy je zutylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami.

5 POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

Do przeprowadzenia niniejszego testu można użyć próbek kału.

Potrzeba co najmniej 66 µL próbki na jedno oznaczenie. Wartość ta obejmuje 6 µL próbki oraz 60 µL objętości martwej.

- Nie używać standardów lub zewnętrznych kontroli stabilizowanych azydkiem.

5.1 Pobieranie próbek

Zalecane jest użycie Systemu do Ekstrakcji Kału 2.6 (**Fecal Extraction System 2.6, FES; [REF]: HYI-5989**).

W teście DRG:HYBRID XL do oznaczania Kalprotektyny może być stosowany **tylko** i wyłącznie **System do Ekstrakcji Kału 2.6 (Fecal Extraction System 2.6, FES; [REF]: HYI-5989)** do przygotowywania próbek kału.

Nie można stosować innych zestawów do ekstrakcji dla testu DRG do oznaczania kalprotektyny (HYE-5767).

Dla przygotowywania próbek należy zapoznać się z Instrukcją Użytkownika znajdującą się w teście HYI-5989.

Po zakończeniu przygotowania próbki w probówkach FES, próbki kału są gotowe do użycia w teście DRG:HYBRID-XL do oznaczania kalprotektyny.

Należy umieścić otwarte probówki ekstrakcyjne w adapterze do próbek pierwszorzędowych.

5.2 Przechowywanie i przygotowywanie próbek Pierwotny kał

Kalprotektyna w kale jest trwała przez co najmniej 3 dni w temperaturze pokojowej (8).

Niemniej jednak, zalecamy przechowywania próbek przez okres nie dłuższy niż 48 godzin w temperaturze 2 °C - 8 °C.

Długie przechowywanie aż do 12 miesięcy, zaleca się w temperaturze -20 °C.

Pozostawić zamrożone próbki do dowolnego rozmrożenia, w temperaturze od 2 °C - 8 °C, i ogrzać próbki do temperatury pokojowej przed analizą. Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek. Zamrażanie może powodować pęknięcie ziarnistości w neutrofilach w próbce kału i uwolnienie kalprotektyny. W związku z tym można oczekiwać, że zamrożone próbki zawierają nieco podwyższone stężenia kalprotektyny w porównaniu do świeżych próbek.

Ekstrakt kału

Ekstrakt kału jest stabilny do dziewięciu dni w temperaturze pokojowej, 2 °C - 8 °C lub -20 °C.

Unikać więcej niż trzech cykli zamrażania i rozmrażania.

5.3 Rozcieńczanie próbek

5.3.1 Manualne rozcieńczanie próbek

Jeśli w początkowym oznaczeniu okazuje się, że próbka zawiera więcej niż najwyższy standard, **wstępnie przygotowane próbki kału (rozcieńczenie 1:100 w próbówce FES, patrz rozdział 5.1)** można rozcieńczyć za pomocą **Sample Diluent (Rozcieńczalnika Próbek)*** i poddać ponownemu oznaczeniu w sposób opisany w Procedurze Testowej.

Do obliczenia stężeń należy wziąć pod uwagę ten współczynnik rozcieńczenia.

Przykład:

- a) Rozcieńczenie 1:10: 10 µL próbki + 90 µL *Sample Diluent* (Dobrze wymieszać)

* *Sample Diluent do manualnego rozcieńczania nie jest zawarty w niniejszym zestawie testowym, ale jest dostępny na zamówienie [REF] HYE-5767-DIL, 20 mL.*

6 PROCEDURA TESTOWA

6.1 Uwagi ogólne

- Wszystkie odczynniki, takie jak kontrole, re-kalibratory oraz próbki, należy przed użyciem doprowadzić do temperatury pokojowej (20 °C do 25 °C). Wszystkie odczynniki i próbki należy zmieszać unikając ich spienienia. Wkłady odczynnikowe mogą zostać użyte bezpośrednio po okresie przechowywania w chłodzarkę.
- Próbki, kontrole oraz re-kalibratory powinny być mierzone w przeciągu 2 godzin, aby uniknąć ewentualnych skutków parowania.

- Uchwyt do *Secondary Sample Holder* (Próbek Wtórnych) (HYI-5437) dla próbek wtórnych jest w stanie pomieścić maksymalnie 20 próbek, wliczając w to kontrole i rekaliibratory. Wszystkie one muszą zostać naniesione pipetą do próbek wtórnych, a odpowiednie kody kreskowe z fiolek kontroli/ rekaliibratorów oraz, jeśli są dostępne, kody kreskowe próbek muszą być odczytane za pomocą zewnętrznego czytnika kodów kreskowych.

6.2 Procedura badania

- **Całkowity czas potrzeby do przeprowadzenia testu DRG:HYBRiD-XL Calprotectin wynosi 60 minut**
- Aby zapewnić poprawne działanie testu, należy ściśle przestrzegać poleceń zawartych w instrukcji obsługi dla DRG:HYBRiD-XL.
- Wszystkie informacje specyficzne dla danego testu, które są potrzebne do prawidłowego przeprowadzenia badania, są zawarte w odpowiednich kodach kreskowych odczynników.
Należy bardzo uważać, aby nie uszkodzić kodów kreskowych!
- **Zaleca się jednorazowe opukanie dna Segmentów Wkładu zawierających wkłady odczynnikowe na stanowisku badawczym przed umieszczeniem ich na wirniku. Ma to na celu uniknięcie utworzenia się piany i przywierania cieczy do uszczelnienia wkładu odczynnikowego.**
- Wkłady odczynnikowe należy umieścić na wirniku urządzenia. Ogrzewanie do temperatury inkubacji, tj. 37 °C rozpocznie się w urządzeniu automatycznie.

6.3 Kalibracja

Każdy z odczynników DRG:HYBRiD-XL posiada kod kreskowy zawierający konkretną, szczegółową informację dotyczącą ponownej kalibracji serii odczynników.

Krzywa Wzorcowa wydrukowana jako kod kreskowy 2D na zewnętrznej etykiecie opakowania zestawu oraz na Arkuszu Kontroli Jakości (QC-Datasheet) i należy ją zeskanować za pomocą zewnętrznego czytnika kodów kreskowych przed pierwszym użyciem danej serii zestawu.

Zaleca się ponowną kalibrację w następujących przypadkach:

- W przypadku użycia nowej serii zestawu. Każda nowa seria powinna zostać zweryfikowana poprzez użycie wewnętrznych rekaliibratorów i kontroli zestawu przed rutynowym stosowaniem.
- W przypadku okazania się, że jedna lub obie kontrole testu znajdują się poza wyznaczonym przedziałem.
- Po 1 tydzień używania tego samego zestawu odczynnikowego na danym urządzeniu.

6.4 Kalkulacja wyników

Stężenia analitów są obliczane automatycznie za pomocą oprogramowania systemu DRG:HYBRiD-XL.

7 KONTROLA JAKOŚCI

Zalecane jest, aby używać próbek kontrolnych według przepisów stanowych i federalnych. Zaleca się używanie próbek kontrolnych w celu zagwarantowania ważnych wyników na co dzień.

Zaleca się również brać udział w krajowych lub międzynarodowych programach Oceny Jakości [Quality Assessment programs] w celu zagwarantowania dokładności wyników.

Należy stosować odpowiednie metody statystyczne do analizy wartości kontrolnych i trendów. Jeżeli wyniki testu nie pasują do ustalonych dopuszczalnych zakresów materiałów kontrolnych, wyniki pacjentów powinny zostać uznane za nieważne. W takim przypadku, należy sprawdzić następujące rzeczy: daty ważności i warunki przechowywania odczynników, niezawodność pracy analizatora. Ponadto, wskazane jest przeprowadzenie ponownej kalibracji.

W przypadku dodatkowych pytań, należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub bezpośrednio z firmą DRG.

7.1 Kontrole wewnętrzne

Do przeprowadzenia Kontroli Jakości niezbędne jest użycie dwóch wewnętrznych kontroli dostarczonych w każdym zestawie.

Przyjęte zakresy dla obu kontroli wewnętrznych (*Control 1 & 2*) zostały ustalone przez producenta i są opisane w Arkuszu Kontroli Jakości (QC-Datasheet) dołączonym do zestawu. Należy pamiętać, że wartości oczekiwane i przyjęte zakresy podane w Arkuszu Kontroli Jakości zawsze odnoszą się do aktualnej serii zestawu.

Kontrole wewnętrzne powinny zostać przeprowadzone w pojedynczym oznaczeniu:

- jako standardowa procedura postępowania (np. raz na 24 h)
- jeśli wymagana jest ponowna kalibracja (gdy jedna lub obie kontrole są poza zakresem)

- jeśli używany jest zestaw z nowej serii (w celu uniknięcia jakiegokolwiek negatywnego wpływu na działanie zestawu spowodowane niewłaściwym sposobem transportu lub w celu wykryci niewłaściwego sposobu przechowywania podczas transportu).

7.2 Kontrole zewnętrzne

Należy używać kontroli zarówno na prawidłowych, jak i patologicznych poziomach.

Przedziały i zakresy kontroli dla kontroli zewnętrznych powinny być dostosowane do indywidualnych potrzeb każdego laboratorium. Wszystkie wyniki muszą mieścić się w określonych limitach.

Każde laboratorium powinno określić jakie środki korygujące należy podjąć w przypadku, gdy wyniki kontroli zewnętrznych znajdą się poza przyjętym zakresem.

8 WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zdecydowanie zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło swoje własne wartości prawidłowe i nieprawidłowe.

Badanie 1: W badaniu klinicznym, Kalprotectyny w kale oznaczono stężenia u 302 zdrowych dzieci (12).

| Wiek | n | Mediana kalprotectyny w kale (µg/g) |
|-----------------|-----|-------------------------------------|
| 0 - 3 miesiące | 14 | 345 (195 - 621) |
| 3 - 6 miesięcy | 13 | 278 (85 - 988) |
| 6 - 12 miesięcy | 27 | 183 (109 - 418) |
| 1 - 4 lata | 89 | 75 (53 - 119) |
| 4 - 12 lat | 159 | 28 (25 - 35) |

Badanie 2: W badaniu klinicznym, Kalprotectyny w kale oznaczono stężenia u 117 zdrowych dzieci (13).

| Wiek | n | Mediana kalprotectyny w kale (µg/g) |
|-------------|----|-------------------------------------|
| 4 - 6 lat | 27 | 28.2 |
| 7 - 10 lat | 30 | 13.5 |
| 11 - 14 lat | 27 | 9.9 |
| 15 - 17 lat | 33 | 14.6 |

Wartości te są porównywalne również do innych zgłoszonych wartości klinicznych (14-15).

Sugerowany poziom odcięcia dla dorosłych (50 µg/g) może być stosowany dla dzieci w wieku 4-17 lat.

W badaniu przeprowadzonym u zdrowych osób dorosłych, jak i u pacjentów z chorobami zapalnymi jelit przy użyciu DRG:HYBRiD-XL HYE-5767 zaobserwowano następujące dane:

| Populacja | zdrowy | choroby jelit |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| n | 50 | 61 |
| Zakres (µg/g) | 2,6 - 103 | 51.0 - > 1500 |
| Średnia (µg/g) | 17,78 | 524 |
| 2,5 – 97,5 percentyl (µg/g) | 4,19 - 71,87 | 63.9 - > 1500 |
| Mediana (µg/g) | 25,27 | 377 |

8.1 Interpretacja wyników

- o Mediana zdrowych dorosłych wynosi około 18 µg/g (5).
- o Próbk o stężeniu kalprotectyny < 50 µg/g uznawane są za negatywne.
- o Próbk o stężeniu kalprotectyny pomiędzy 50 µg/g a 200 µg/g, są traktowane jako granicznie pozytywne. Zaleca się powtórzenie pomiaru w późniejszym czasie w celu potwierdzenia wyników.
- o Próbk o stężeniu kalprotectyny > 200 µg/g są postrzegane jako pozytywne.

Same wyniki nie powinny być jedyną podstawą do jakichkolwiek działań terapeutycznych. Otrzymane wyniki powinny zostać skorelowane z innymi obserwacjami klinicznymi i badaniami diagnostycznymi.

9 OGRANICZENIA

Wiarygodne i powtarzalne wyniki można uzyskać pod warunkiem, że procedura testowa jest przeprowadzana przy całkowitym zrozumieniu instrukcji użycia i przy zachowaniu dobrej praktyki laboratoryjnej. Wszelkie niewłaściwe obchodzenie się z próbkami lub wprowadzanie modyfikacji do niniejszego testu może wpłynąć na otrzymane wyniki.

10 CHARAKTERYSTYKA

10.1 Zakres metody

Zakres metody został określony za pomocą granicy wykrywalności (LoD) i oraz wartości maksymalnej Krzywej Wzorcowej.

Wartości poniżej zakresu pomiarowego są wskazane jako " $< 7,013 \mu\text{g/g}$ ".

Wartości powyżej zakresu pomiarowego są wskazane jako " $> 1500 \mu\text{g/g}$ ".

Zakres metody zawiera się w przedziale: $7,01 \mu\text{g/g} - 1500 \mu\text{g/g}$.

10.2 Specyficzność Przeciwciał (reaktywność krzyżowa)

Proszę odnieść się do szczegółowych instrukcji obsługi w języku angielskim.

10.3 Czułość

Badanie czułości zostało skonstruowane zgodnie z opracowaną przez CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, ang. Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych) wytyczną EP17-A2.

Granica próby ślepej (LoB) wynosi $1,180 \mu\text{g/g}$.

Granica wykrywalności (LoD) wynosi $7,013 \mu\text{g/g}$.

Granica oznaczalności (LoQ) wynosi $19,697 \mu\text{g/g}$.

Dla następujących danych:

10.4 Precyzja metody

10.5 Odzysk

10.6 Liniowość

proszę odnieść się do szczegółowych instrukcji obsługi w języku angielskim.

10.7 Substancje zakłócające

Hemoglobina (do 4 mg/mL), nie ma wpływu na wyniki testu.

Do dziś nie są nam znane żadne substancje (leki) C, które mają wpływ na pomiar kalprotektyny w próbce.

10.8 „Efekt haka” wysokiej dawki (High-Dose-Hook Effect)

Nie zaobserwowano „efektu haka” w niniejszym teście przy wartości stężenia do $10000 \mu\text{g/g}$ kalprotektyny.

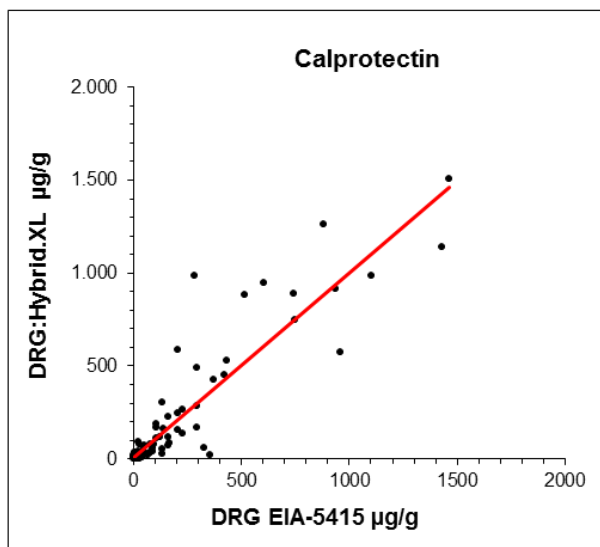
11 BADANIA PORÓWNAWCZE

Porównanie testu DRG:HYBRiD-XL Calprotectin Test HYE-5767 (y) oraz DRG Calprotectin (MRP 8/14) Stool (1h) ELISA (EIA-5415) (x) przy użyciu próbek klinicznych dało następującą korelację:

$$n = 98$$

$$r = 0,912$$

$$y = 0,993x + 9,788$$



12 ASPEKTY PRAWNE

12.1 Wiarygodność wyników

Test należy przeprowadzić dokładnie według instrukcji użycia podanej przez producenta. Ponadto, użytkownik testu powinien ściśle przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP) oraz innych obowiązujących krajowych norm i/Lub przepisów. Ma to szczególne zastosowanie w przypadku używania odczynników kontrolnych. Bardzo istotne jest, aby zawsze włączać w ramach procedury testowej odpowiednią liczbę kontroli w celu walidacji dokładności i precyzji testu.

Wyniki testu są ważne tylko wtedy, gdy wszystkie kontrole są w określonych zakresach i gdy wszystkie pozostałe parametry testowe zawierają się w podanych specyfikacjach testu. W przypadku jakichkolwiek pytań lub wątpliwości, prosimy o kontakt z firmą DRG.

12.2 Wskazania terapeutyczne

Wskazania terapeutyczne nigdy nie powinny opierać się jedynie na wynikach testów laboratoryjnych, nawet jeśli wszystkie wyniki badań zgadzają się co do wytycznych o których mowa w pkt. 12.1. Wszelkie wyniki badań laboratoryjnych stanowią jedynie część obrazu klinicznego pacjenta.

Jedynie w przypadkach, gdzie wyniki laboratoryjne są w akceptowalnej zgodzie z ogólnym obrazem klinicznym pacjenta, należy wywieść wskazania terapeutyczne.

Same wyniki testu nigdy nie powinny być jedynym wyznacznikiem do określenia jakichkolwiek wskazań terapeutycznych.

12.3 Odpowiedzialność

Wprowadzenie jakichkolwiek modyfikacji do zestawu testowego i/Lub wymiana lub wymieszanie jakichkolwiek komponentów z różnych serii zestawu może negatywnie wpłynąć na zamierzone wyniki i ważność całego testu. Tego typu modyfikacje i/Lub wymiana powodują utratę wszelkich roszczeń do wymiany.

Reklamacje złożone w wyniku błędnej interpretacji wyników laboratoryjnych przez klienta z zastrzeżeniem punktu 12.2 są również nieważne. Bez względu na rodzaj roszczenia, odpowiedzialność producenta nie przekracza wartości zestawu testowego.

Bez względu na rodzaj roszczenia, odpowiedzialność producenta nie przekracza wartości zestawu testowego.












Wszelkie uszkodzenia zestawu testowego powstałe podczas transportu nie podlegają odpowiedzialności producenta.

Dodatkowe informacje można uzyskać w Instrukcji Obsługi DRG:HYBRiD-XL, arkuszach aplikacyjnych dla poszczególnych analizatorów, w informacji o produkcie i w ulotkach do wszystkich niezbędnych komponentów.

13 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / LITERATURA / BIBLIOGRAFIA

1. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet*, 2000, 356, 1783-4.
2. van Rheenen PF. Et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2010, 341, c3369.
3. Poullis A., et al. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2002, 16, 675-81.
4. Konikoff MR. & Denson, LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006, 12, 524-34.
5. D'Haens, G. et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2012, 18, 2218-24.
6. Önal İK. Et al. The value of fecal calprotectin as a marker of intestinal inflammation in patients with ulcerative colitis. *Turk J Gastroenterol*.2012;23(5):509-14.
7. Kalantari H., Taheri A., Yaran M. Fecal calprotectin is a useful marker to diagnose ulcerative colitis from irritable bowel syndrome. *Adv Biomed Res*. 2015, 4:85.
8. von Arnim U. et al. Fecal calprotectin: a marker for clinical differentiation of microscopic colitis and irritable bowel syndrome. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016; 9:97-103.
9. Wright EK. Comparison of Fecal Inflammatory Markers in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016, 1086-94.
10. Røseth AG., Schmidt PN., Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1999, 50-4.
11. Tibble J A., et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000, 119, 15-22.
12. Hestvik, E. et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. *BMC pediatrics*. 2011, 11, 9.
13. Fagerberg UL. Et al. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2003, 37, 468-72.
14. Li F. Fecal calprotectin concentrations in healthy children aged 1-18 months. *PLoS One*. 2015, 10(3).
15. Krzesiek E. Fecal Calprotectin as an Activity Marker of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Adv Clin Exp Med*. 2015, 24(5):815-22.

SYMBOLS USED

| Symbol | English | Deutsch | Italiano | Español | Français | Polski |
|--|--|--------------------------------|-------------------------------------|--|--|---|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conformità europea | Conformidad europea | Conforme aux normes européennes | Zgodność z normami europejskimi |
|  | Consult instructions for use* | Gebrauchsanweisung beachten* | Consultare le istruzioni per l'uso | Consulte las Instrucciones | Consulter les instructions d'utilisation | Zapoznać się z instrukcją użytkowania |
|  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device* | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum* | Per uso Diagnostica in vitro | Para uso Diagnóstico in vitro | Usage Diagnostic in vitro | Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Solo a scopo di ricerca | Sólo para uso en investigación | Seulement dans le cadre de recherches | Tylko do użytku w badaniach |
|  | Catalogue number* | Artikelnummer* | No. di Cat. | Número de catálogo | Référence | Numer katalogowy |
|  | Batch code* | Chargencode* | Lotto no | Número de lote | No. de lot | Numer LOT |
|  | Contains sufficient for <n> tests * | Ausreichend für <n> Prüfungen | Contenuto sufficiente per "n" saggi | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenu suffisant pour "n" tests | Zawartość przeznaczona na <n> testów |
|  | Temperature limit* | Temperaturbegrenzung* | Temperatura di conservazione | Temperatura de conservación | Température de conservation | Przechowywać w temperaturze |
|  | Use-by date* | Verwendbar bis* | Data di scadenza | Fecha de caducidad | Date limite d'utilisation | Data przydatności |
|  | Manufacturer* | Hersteller* | Fabbricante | Fabricante | Fabricant | Producent |
|  | Caution* | Achtung* | | | | UWAGA |
| <i>Distributed by</i> | Distributor | Vertreiber | Distributore | Distribuidor | Distributeur | Dystrybutor |
| <i>Content</i> | Content | Inhalt | Contenuto | Contenido | Contenu | Zawartość |
| <i>Volume/No.</i> | Volume / No. | Volumen/Anzahl | Volume/Quantità | Volumen/Número | Volume/Numéro | Objętość / Numer |
| <i>Reagent Cartridge</i> | Reagent Cartridge | Reagenzien-Cartridge | Cartucce di reagente | Cartucho de reactivo | Cartouche de réactif | Kartridż z odczynnikami |
| <i>Re-Calibrator</i> | Re-Calibrator | Re-Kalibrator | Re-Calibratore | Re-Calibrador | Re-calibrateurs | Re-kalibrator |
| <i>Control</i> | Control | Kontrolle | Controllo | Control | Contrôle | Kontrola |
| <i>Enzyme Conjugate</i> | Enzyme Conjugate | Enzymkonjugat | Tracciante enzimatico | Conjugado enzimático | Conjugué enzymatique | Koniugat enzymatyczny |
| <i>Enzyme Complex</i> | Enzyme Complex | Enzymkomplex | Complesso enzimatico | Complex enzimático | | Enzymu kompleks |
| <i>Substrate Solution</i> | Substrate Solution | Substratlösung | Soluzione di substrato | Solución de sustrato | Solution substrat | Roztwór Substratu |
| <i>Sample Diluent</i> | Sample Diluent | Probenverdünnungsmedium | Diluyente dei campioni | Solución para dilución de la muestra | Diluant d'échantillon | Rozcieńczalnik Próbkki |
| <i>Reagent 1</i> | Reagent 1 | Reagenz 1 | Reagente 1 | Reactivo 1 | Réactif 1 | Reagent 1 |
| <i>Reagent 2</i> | Reagent 2 | Reagenz 2 | Reagente 2 | Reactivo 2 | Réactif 2 | Reagent 2 |
| <i>Wash Buffer</i> | Wash Buffer | Waschpuffer | Tampone di lavaggio | Tampón de lavado | Tampon de lavage | Bufor Płuczący |
| <i>System Solution</i> | System Solution | Systemlösung | | Solución de sistema | Solution système | Roztwór systemowy |
| <i>Needle Cleaning Solution</i> | Needle Cleaning Solution | Nadel-Reinigungslösung | Soluzione lavaggio ago | Solución de lavado de la aguja | Solution de nettoyage des aiguilles | Roztwór Czyszczący Igły |
| <i>Denaturation Buffer</i> | Denaturation Buffer | Denaturierungspuffer | Tampone die denaturazione | Tampón de denaturalización | Tampon de dénaturation | |
| <i>Neutralization Buffer</i> | Neutralization Buffer | Neutralisierungspuffer | Tampone di neutralizzazione | Tampón de neutralización | Tampon de neutralisation | |
| <i>Assay Buffer</i> | Assay Buffer | Assaypuffer | Tampone del test | Tampón de ensayo | Tampon d'essai | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| <i>Secondary Sample Holder</i> | Secondary Sample Holder | Sekundärprobenhalter | Sostegno secondario dei campioni | Soporte de muestras para tubos secundarios | Support d'échantillons secondaires | Statyw na próbkówki drugorzędowe |
| <i>Sample Tubes (Secondary)</i> | Sample Tubes (Secondary) | Sekundärprobenröhrchen | Tubetti di campioni secondari | Tubos de muestra secundarios | Tubes échantillon secondaires | Próbówki drugorzędowe |
| <i>Dilution Cartridge</i> | Dilution Cartridge | | | | Cartouches de dilution | Kartridż do rozcieńczeń |
| <i>Vial Adapter</i> | Vial Adapter | Fläschchen-Adapter | l'adattatore dei tubetti | Adaptador de tubos | l'Adaptateur de flacons | Nakładki na butelki dla kontroli i kalibratorów |