

Calprest[®] NG

For in vitro diagnostic use

Intended use

Calprest[®] NG is a quantitative ELISA for detecting concentration of faecal calprotectin that is intended to aid in the diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases (IBD), specifically Crohn's disease and ulcerative colitis, and to differentiate IBD from Irritable Bowel Syndrome (IBS) in conjunction with other clinical and laboratory findings.

Summary and Explanation

Calprotectin^{1,2} is a calcium and zinc binding protein produced by PolyMorphoNuclear cells (PMNs), monocytes and squamous epithelial cells except those in normal skin. After binding calcium it can resist degradation by leukocytic and bacterial enzymes.^{3,5} By competing with different enzymes for limited local amounts of zinc, calprotectin may inhibit many zinc dependent enzymes and thereby kill microorganisms or animal and human cells in culture. Calprotectin can be detected even in small (less than one gram) random stool samples. Furthermore, organic diseases of the bowel give a strong fecal calprotectin signal, i.e. elevations are often five to several thousand times the upper reference in healthy individuals indicating intestinal inflammation.^{6,9} Patients with organic or functional abdominal disorders may have similar symptoms, and clinical examination alone may not be sufficient to give a specific diagnosis. Additionally, the Calprotectin assay has been demonstrated to be a marker of inflammatory bowel disease in both children and adult patients.¹⁰⁻¹³ Inflammatory bowel disease (IBD), i.e. ulcerative colitis and Crohn's disease, may appear from early childhood to late adulthood, and the diagnosis is often delayed due to vague symptoms or reluctance to perform endoscopy and biopsy.

Test Principle

Calprest NG is an enzyme linked immuno-sorbent assay system with colorimetric detection based on the use of polyclonal and monoclonal antibodies against calprotectin. Calprotectin present in the diluted sample is bound by the antibody adsorbed to the surface of the plastic well. The enzyme-conjugate antibody binds to the captured antigen and subsequently the enzyme catalyses the conversion of the substrate to a colored product. The intensity of the color is proportional to the amount of conjugate bound, and thus to the amount of captured calprotectin. Concentration of calprotectin in the samples is calculated using the provided Calibrators.

Materials provided with the kit

(quantity sufficient for 96 tests)

Antibody coated plate	12x8 wells
Enzyme-conjugate antibody (IgG, mouse)	1x15 ml
Stop Solution	1x15 ml
Substrate	1x15 ml
Washing solution (20x)	1x50 ml
Diluent (10x)	1x20 ml
Extraction solution (2.5x)	2x50 ml
Calibrators	6x1.5 ml
Control 1 (low)	1x 1.5 ml
Control 2 (high)	1x 1.5 ml

Composition of supplied reagents/materials

1. Antibody coated plate

12x8 wells coated with antibody against calprotectin. Plastic sealed bag containing a desiccant.

2. Enzyme conjugate antibody (IgG)

1 vial containing 15 ml Horse-radish peroxidase-labeled mouse anti-human calprotectin IgG antibodies in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative. Ready-to-use.

3. Substrate

1 vial containing 15 ml substrate reagent (TMB). Ready-to-use

4. Stop Solution

1 vial containing 15 ml H₂SO₄ (0.5M). Ready-to-use

5. Washing solution (20x)

1 vial containing 50 ml concentrated washing solution. To be diluted with distilled water.

6. Diluent(10x)

1 vial containing 20 ml concentrated diluent solution to be diluted with distilled water.

7. Extraction solution(2.5x)

2 vials containing 50 ml concentrated extraction solution to be diluted with distilled water. This concentrated solution is irritating to eyes and skin.

8. Calibrators

6 vials containing 1.5 ml Calprotectin solution at six known concentrations (0, 2.5, 12.5, 25, 50, 150 ng/ml). The value of each Calibrator is printed on the vial label. Ready-to-use.

9. Control 1

1 vial containing 1.5 ml of control 1. Ready-to-use. Do not dilute. The range of values is printed on the vial label.

10. Control 2

1 vial containing 1.5 ml of control 2. Ready-to-use. Do not dilute. The range of values is printed on the vial label.

Materials required but not provided

Faeces sample collection

1. Sample collection device (optional alternative use, i.e. EasyCal cat. 9062)
2. Sample collection tube
3. Transport container

Faeces preparation

1. Disposable, breakable sterile inoculation loops or wooden stick
2. Disposable polystyrene screw cap tubes, 14 ml
3. Eppendorf tubes (1-1.5 ml)
4. Sensitive digital scale (40-150 mg)
5. Vortex mixer
6. Shaker
7. Microcentrifuge (10000g)
8. Freezer (-20°C)

Equipment for ELISA measurements

1. Multi-channel pipette, 50 200 µl.
2. Precision pipettes 5, 100 and 1000 µl
3. ELISA plate washer
4. ELISA plate reader (filter 450 nm)
5. Distilled water

Precautions and warnings

1. For in vitro use only.
2. Follow universal precautions. The product does not use human origin materials.
3. Reagents, samples and microtiter strips should be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the test.

- Warning: do not interchange components from different kit batches. Satisfactory performance of the test is guaranteed only when components from the same batch of Calprest NG are used.
- Unused microtiter strips should be re-sealed airtight in the foil bag with the enclosed drying pad and stored at 2-8°C.
- Insufficient washing of the ELISA plate can lead to erroneous values of Calprotectin due to incomplete removal of reagents. Routine maintenance of aspiration/wash system is strongly recommended.
- Substrate is light sensitive, store in the dark and shake before use.
- TMB substrate solution is irritating to the skin and mucous membranes. In case of contact, rinse eyes with plenty of water and wash skin with soap and plenty of water. Wash contaminated clothing before reuse. Do not discard the product into sewers. Store in the dark.
- The Stop Solution contains sulfuric acid. Although diluted may cause burns must be handled with gloves, goggles and lab coat. In case of contact, rinse thoroughly with water. Use the same precautions when handling the extraction solution.
- All reagents, except to the substrate and the concentrated washing solution, contain Proclin 300. It may cause an allergic reaction.
- In case of external damage to packaging, make sure that all components listed in the "Materials Provided with the kit are present and undamaged". In the presence of liquid leakage from the vials, the kit should not be used.

Preparation of working solutions

Extraction solution

Dilute concentrated Extraction solution by adding 1 part (50 ml) of it to 1.5 parts (75 ml) of freshly distilled water to obtain 125 ml working solution. Mix well.

Diluent

Dilute concentrated Diluent solution by adding 1 part (20 ml) of it to 9 parts (180 ml) of distilled water to obtain 200 ml working solution. Mix thoroughly.

Washing solution

Prepare the washing solution by diluting the content of the whole vial (50 ml) into 950 ml of distilled water.

Storage and stability of reagents and working solutions

- All reagents and working solutions, except washing solution, must be stored at 2-8°C.
- The expiration date is printed on all component labels. See table below for open- vial stability.
- Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity.
- Unused microtiter strips should be resealed airtight in the plastic bag with the desiccant inside and stored at 2-8°C.

Reagent stability (open-vial reagents)

Reagent	Storage conditions	Storage time
Conjugate	2-8°C	30 days
Substrate	2-8°C	90 days
Calibrators	2-8°C	30 days
Controls	2-8°C	30 days

The Substrate reagent is light sensitive. Store in the dark and shake before use.

Stability of working solutions

Reagent	Storage conditions	Storage time
Washing solution	20-25°C	30 days
Extraction solution	2-8°C	90 days
Diluent solution	2-8°C	30 days

Sample collection

Random stool collection. Loose or liquid stool samples are acceptable as normalization to stool weight is part of the calculation of the result. Submission of stool samples from diapers should be avoided unless the sample submitted can be taken from a portion of the stool which is not in contact with the diaper material.

Sample requirements

1-5 g stool in a screw-top clean vial. No preservative is necessary or indicated.

Sample transport

Stool specimen should be received by the laboratory and extracted within 10 days of collection. Temperature during shipment should not exceed 30°C.

Sample Storage

Stool samples at the laboratory should be stored at 2-8 C for up to 4 days before testing. If not immediately tested, freeze the stored samples at -20°C.

Procedure

Specimen Preparation

Thaw frozen stool samples at room temperature and ensure that all reagents reach room temperature (20-25 C).

There are two alternative stool sample preparation methods, manual and by using EasyCal stool extraction device. Users can choose their preferred sample preparation method.

A. EasyCal Specimen Preparation

1. For the collection/extraction procedure, please refer to EasyCal cat. 9062 box insert.
2. After the extraction procedure the faecal extract is ready to be tested either manually or automatically by placing the EasyCal tube (devoid of funnel and stick) directly into the ELISA instrumentation.

B. Manual Specimen Preparation

1. Weigh (tare) the empty screw cap tube together with the inoculation loop or the wooden applicator stick.
2. Mix well the stool and then take out approx. 100 mg (between 80-120 mg) stool by means of the inoculation loop or wooden applicator stick and place into a screw-cap-tube.
3. Weigh tube and loop with feces and calculate net feces weight (between 80-120 mg).
4. Break off the loop handle or the wooden applicator stick, leaving the loop or wooden stick with feces and a 4-6 cm handle inside the screw cap tube.
5. Add pre-diluted extraction solution (weight/volume ratio 1:50), e.g. 100 mg feces + 4.9 ml diluted extraction solution as described in the table below. Close the tube.

Faeces (mg)	Extraction solution (ml)	Faeces (mg)	Extraction solution (ml)
120	5.9	100	4.9
115	5.6	95	4.7
110	5.4	90	4.4
105	5.2	85	4.2
		80	3.9

6. Shake/mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex.
7. Homogenize 25 ± 5 minutes on a shaker or roller. The inoculation loop or the wooden stick inside the tube will act as an agitator.
8. Transfer the homogenate (1 ml) to an Eppendorf tube and centrifuge for 20 minutes at 10000 x g at Room Temperature (RT) using a bench-top centrifuge.
9. Transfer 0.5 ml of the clear extract supernatant to a new Eppendorf tube. Avoid contact with the pellet as aggregates or particles can cause erroneous calprotectin values.
10. The extracts may be tested immediately or stored at -20°C (up to three months) for later measurement.

ELISA Procedure

1. Ensure that all reagents reach room temperature (20-25°C).
2. Thaw frozen sample at room temperature.
3. Dilute samples 1:400 using two consecutive steps. In the first step, dilute 5 μ l of extracted sample into 995 μ l of diluent solution (1:200). Then take 500 μ l of the first dilution and further dilute it 1:2 by adding 500 μ l of diluent solution.
4. Suggested plate layout is shown below. Fit the strip holder with the required number of micro ELISA strips. Use uncoated strips to complete the strip holder if the washer requires a full plate. Calibrators and Controls must be included in each run.

	1	2	3	4	5	6
A	Calibrator 1	Calibrator 5	Sample	Sample	Sample	
B	Calibrator 1	Calibrator 5	Sample	Sample	Sample	
C	Calibrator 2	Calibrator 6	Sample	Sample		
D	Calibrator 2	Calibrator 6	Sample	Sample		
E	Calibrator 3	Control 1	Sample	Sample		
F	Calibrator 3	Control 1	Sample	Sample		
G	Calibrator 4	Control 2	Sample	Sample		
H	Calibrator 4	Control 2	Sample	Sample		

5. Add 100 μ l of each Calibrator in duplicate wells (A1-B1, C1-D1,.....)
6. Add 100 μ l of each control in duplicate wells (E2-F2, G2-H2,....)
7. Mix diluted sample well before application to the plate and add 100 μ l of each sample in following wells (A3, B3, C3, D3,....)
8. Cover plate with plate cover and incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 60 minutes.
9. At the end of the incubation time, wash the plate by adding 0.3 ml of diluted washing solution to each well. Remove as much liquid as possible. Repeat this step two more times up to a total of 3 washing steps. After the final aspiration, invert plate and tap gently on absorbent tissue to ensure complete removal of washing solution.
10. Add 100 μ l conjugate to each well.
11. Cover plate with plate cover and incubate the plate at room temperature for 30 minutes.
12. Repeat washing step as above (see step 9).
13. Add 100 μ l substrate solution to each well.
Note: a multi-channel pipette is recommended in order to avoid variation in substrate development time. Avoid also the formation of bubbles during substrate pipetting.
14. Incubate the plate at room temperature for approximately 15 minutes in a dark place or wrap the plate with aluminium foil.
15. Add 100 μ l of Stop Solution to all wells.
16. Read the O.D. values by means of an ELISA reader at 450 nm. The OD value of Calibrator 6 must be higher than 1.4 OD. It is possible to monitor the development of the color by reading the OD values at 620 nm. Values around 0.6 OD at 620 nm correspond to 1.8 \div -2.0 at 450 nm.
17. After addition of Stop Solution, plates may be stored at 4°C for 24 hours.

Assay calibration and quality control

1. A new calibration curve is used with each run.
2. The O.D. value of Calibrator S1 should be <0.2 OD.
3. Control 1 and 2 are to be included in each run.

Reportable range

1.355 - 150 ng/ml (27.1 - 3000 mg/kg)

Calculation of test results

Calculation of results is done by means of logit-log 4 parameter. Plot the Calibrator curve with actual calprotectin concentration

of Calibrators as ng/ml and corresponding mean OD values on an x-y system. If the data processing system utilizes a log scale for X axis (concentration), the Calibrator 0 value should be entered as >0 (e.g. 0.001). The readings of the Samples from the Calibrator curve is corrected for the dilution and converted to mg/kg by multiplying 20 (e.g. a reading of 20 ng/ml becomes 400 mg/kg). If samples are further diluted this must be compensated for during calculations. Concentrations can also be determined by use of a computer linked to the ELISA reader.

Limitations

1. False-negative results could occur in patients who have granulocytopenia due to bone marrow depression.
2. Some patients who are taking Non-Steroid-Anti-Inflammatory-Drugs (NSAIDs) will have elevations in their faecal calprotectin levels.¹⁴
3. Patients with IBD fluctuate between active (inflammatory) and inactive stages of the disease. These stages must be considered when using the Calprest[®]NG assay.
4. The use of proton pump inhibitors (PPIs), microscopic colitis and diverticular disease may also lead to elevated calprotectin level. Patients affected by untreated celiac disease may occasionally show elevated calprotectin value.¹⁵
5. Other intestinal impairments, including many gastrointestinal infections and colorectal cancer, can result in elevated levels of calprotectin. These specimens will test positive with the Calprest NG assay. Therefore, a diagnosis of active IBD cannot be established solely on the basis of a positive result with the CalprestNG assay.
6. Faecal calprotectin is an indicator of neutrophilic presence in the stool and is not specific for IBD.

Expected values

An internal cut-off study was performed and the values are reported in the table below:

Calprotectin Concentration	Interpretation	Follow-Up
<50 mg/kg	Normal	None
50-120 mg/kg	Borderline	Re-evaluate after 4-6 week
> 120 mg/kg	Abnormal	Repeat as clinically indicated

Further evaluations including asymptomatic patients, as well as patients with IBS (to differentiate from IBD) and international studies¹⁰⁻¹³ confirmed the appropriateness of such values.

Clinical Evaluation

For the Calprest NG assay, the clinical study included 273 samples, of which 130 patients affected by Crohn's disease, Ulcerative and Intermediate Colitis and 143 negative samples from Irritable Bowel Syndrome (IBS), Recurrent Abdominal Pain (RAP) and other disease patients. The positive patient samples were diagnosed by means of clinical findings and/or confirmed with colonoscopy. Tables 1 and 2 below demonstrate the clinical performance of the Calprest NG assay.

Table 1 - Clinical Performance of Calprest NG assay (with Calprest NG borderline sample values considered positive with a cut-off of 50 mg/kg).

Borderline values considered as Positives		Clinical Diagnosis		Total
		Positive	Negative	
Calprest NG	Positive	123	14	137
	Negative	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensitivity		94.6%	95%C.I. [†] (89.2% - 97.8%)	
Specificity		90.2%	95%C.I. (84.1% - 94.5%)	
PPV*		89.8%	95%C.I. (83.4% - 94.3%)	
NPV**		94.9%	95%C.I. (89.7% - 97.9%)	

Table 2 - Clinical Performance of Calprest NG assay (with Calprest NG borderline sample values considered negative with a cut-off of 120 mg/kg).

Borderline values considered as Negative		Clinical Diagnosis		Total
		Positive	Negative	
Calprest NG	Positive	108	3	111
	Negative	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensitivity		83.1%	(95% C.I. 75.5% - 89.1%)	
Specificity		97.9%	(95% C.I. 94.0% - 99.6%)	
PPV*		97.3%	(95% C.I. 92.3% - 99.4%)	
NPV**		86.4%	(95% C.I. 80.2% - 91.3%)	

* PPV: Positive Predictive Value

** NPV: Negative Predictive Value

[§] C.I.: Confidence Interval

Method Comparison

A method comparison study was performed which compared the Calprest NG to a comparator test using 157 clinical samples. These samples consist of clinically diagnosed IBD patients (clinical history and/or biopsy), while the negative samples were obtained from patients with IBS or other diseases. All samples were tested with the Calprest NG (y) and the predicate device (x) according to their corresponding package inserts. The results are summarized in Tables 3, 4 and 5.

Table 3 - Deming Regression Analysis

	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)
$Y = 0.9232x + 0.1285$	0.9232 (0.8410 ÷ 1.005)	0.1285 (-4.643 ÷ 4.9)

Table 4 - Method comparison (with calprotectin borderline sample values considered positive with a cut-off of 50 mg/kg).

Borderline Value considered as Positive		Comparator test		Total
		Pos	Neg	
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
	Total	117	40	157
Positive Agreement		96.6%	(95% C.I. 91.5% - 98.7%)	
Negative Agreement		100.0%	(95% C.I. 91.2% - 100.0%)	
Overall agreement		97.5%	(95% C.I. 93.9% - 99.0%)	

Table 5 - Method comparison (with calprotectin borderline sample values considered negative with a cut-off of 120 mg/kg).

Borderline Value considered as Negative		Comparator test		Total
		Pos	Neg	
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
	Total	76	81	157
Positive Agreement		96.1%	(95% C.I. 89.0% - 98.6%)	
Negative Agreement		96.3%	(95% C.I. 89.7% - 98.7%)	
Overall agreement		96.2%	(95% C.I. 91.9% - 98.2%)	

Performance characteristics

Matrix and aqueous linearity

Three (3) high positive extracted stool samples, three (3) low concentration extracted stool samples (matrix linearity) or a calprotectin reference material for Calprotectin kit (aqueous linearity) were used in the study. The three (3) high positive extracted stool samples were pooled (H) and diluted with a pool of the three low concentration extracted stool samples (L). The results of the assessment of the linearity ranges show that Calprest NG has both acceptable linearity and accuracy from 25.2 - 3066 mg/kg for matrix and from 27.8 - 2889.3 mg/kg for aqueous linearity.

Matrix Linearity					
	Test Range (mg/kg)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% Recovery Rate (Obtained/Theoretical)
1	25.2 ÷ 3066	1.014 (0.9868 ÷ 1.041)	9.279 (-26.54 ÷ 45.10)	0.994	86.9 ÷ 112.8
Aqueous Linearity					
	Test Range (mg/kg)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% Recovery Rate (Obtained/Theoretical)
1	27.8 ÷ 2889.3	1.0322 (1.006 ÷ 1.0574)	-5.7463 (-36.40 ÷ 24.91)	0.999	93.0 ÷ 118.7

Limits of Blank, Detection and Quantization

LoB, LoD and LoQ studies were performed according to EP17-A. The results are reported in the following table:

Criteria	Value (ng/ml)	Concentration (mg/kg)
LoB	0.87	17.50
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.10

Accuracy/Recovery

The study was carried out by testing 7 different stool samples. Each extracted stool sample was "spiked" with a constant quantity/volume of calprotectin or with an equal volume of sample diluent to compensate for volume adjustments. Each sample was assayed in triplicate. Data are shown in table below.

Calprotectin Recovery Data								
Sample		1	2	3	4	5	6	7
Baseline	mg/kg	9.3	51.7	162.7	307.7	458.3	1204.0	1975.2
CSpike Value	mg/kg	32.3	32.3	32.3	115.0	115.0	115.0	115.0
Theoretical (Base + Spike)	mg/kg	41.7	84.0	195.0	422.7	573.3	1319.0	2090.2
Observed (Base + Spike)	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1397.7	2343.8
Recovery	%	101.6%	94.8%	102.9%	100.6%	103.3%	106.0%	112.1%

Extraction Reproducibility:

In order to determine the extraction-to-extraction reproducibility, four (4) samples (2 positive, 1 around cut-off and 1 negative) were extracted 10 times each, and each extract tested in duplicate. The results are reported below.

Extracted stool sample	1	2	3	4
Mean (mg/kg)	29.6	52.7	227.0	1973.3
SD	4.3	5.8	15.5	117.3
CV%	14.6	11.1	6.8	5.9

Single-Site Precision Evaluation study

The study has been carried out by extracting seven (7) different stool samples (six (6) positive and one (1) around cut-off) and assaying each extract in two (2) replicates during two separate (2) runs per day for ten (10) days by three (3) different operators. The CV% values should be equal and lower than 20%. Data are presented in the table below:

Single-Site Precision Evaluation study: Results												
ID#	N	Mean (mg/kg)	Within Run		Between Run		Between Day		Between Operator		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
1	120	170.88	3.40	2.0%	6.77	4.0%	5.51	3.2%	0.80	0.5%	9.40	5.5%
2	120	741.60	17.38	2.3%	43.12	5.8%	55.37	7.5%	0.00	0.0%	72.30	9.7%
3	120	248.74	6.44	2.6%	11.98	4.8%	12.21	4.9%	0.00	0.0%	18.28	7.3%
4	120	42.60	1.28	3.0%	4.30	10.1%	0.00	0.0%	0.55	1.3%	4.52	10.6%
5	120	1193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%
6	120	1006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%
7	120	2267.29	223.08	9.8%	83.22	3.7%	155.52	6.9%	58.33	2.6%	290.31	12.8%

Multisite Precision Evaluation Study

The study has been carried out in three (3) centers by testing eight (8) different stool sample extracts (six (6) positive, one (1) around cut-off and one (1) negative). Each center has tested each extract in five (5) replicates over five (5) days. The CV% values should be equal and lower than 20%.

Sample	N	Mean (mg/kg)	Repeatability		Precision		Reproducibility	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%
B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%
C	75	1180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%
D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%
E	75	1629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%
F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%
G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%
H	75	2152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%

Sample	Repeatability 95% CIs		Precision 95% CIs		Reproducibility 95% CIs	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	11.39 ÷ 16.35	2.6% ÷ 3.8%	46.39 ÷ 103.09	10.7% ÷ 23.8%	47.26 ÷ 101.80	10.9% ÷ 23.5%
B	3.13 ÷ 4.49	8.6% ÷ 12.3%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%
C	60.33 ÷ 86.54	5.1% ÷ 7.3%	118.0 ÷ 230.93	10.0% ÷ 19.6%	119.47 ÷ 225.50	10.1% ÷ 19.1%
D	30.45 ÷ 43.68	4.5% ÷ 6.4%	40.42 ÷ 64.14	5.9% ÷ 9.4%	49.28 ÷ 193.64	7.2% ÷ 28.4%
E	81.72 ÷ 117.23	5.0% ÷ 7.2%	162.28 ÷ 317.59	10.0% ÷ 19.5%	168.95 ÷ 345.24	10.4% ÷ 21.2%
F	3.56 ÷ 5.10	5.7% ÷ 8.2%	4.63 ÷ 7.22	7.5% ÷ 11.6%	5.42 ÷ 21.29	8.7% ÷ 34.3%
G	10.19 ÷ 14.61	2.9% ÷ 4.1%	22.56 ÷ 45.07	6.3% ÷ 12.6%	31.11 ÷ 149.23	8.7% ÷ 41.8%
H	147.32 ÷ 211.32	6.8% ÷ 9.8%	240.6 ÷ 428.66	11.2% ÷ 19.9%	242.64 ÷ 437.93	11.3% ÷ 20.3%

Calprest® NG

96 test, code: 9069



Date of revision:

2019.11.29

Rev. 2

ETS9069

Eurospital 

The Eurospital logo features the company name in a bold, blue, sans-serif font. To the right of the text is a graphic element consisting of several curved, overlapping lines in shades of blue and green, suggesting a stylized wave or a modern architectural structure.

Manufactured by:

Eurospital SpA

Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia

Phone: +39 040 8997.1 Fax: +39 040 280944

info@eurospital.it www.eurospital.com

Calprest® NG

Per uso diagnostico in vitro.

Destinazione d'uso

Calprest® NG è un test ELISA quantitativo per la determinazione della concentrazione di calprotectina nelle feci. Calprest® NG può essere usato come complemento diagnostico in vitro per la diagnosi delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI o IBD), malattia di Crohn e colite ulcerativa, e distinguerle dalla Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII o IBS) affiancando l'interpretazione del risultato del test alle informazioni cliniche del paziente e da altre analisi di laboratorio.

Introduzione

La calprotectina^{1,2} è una proteina prodotta dalle cellule polimorfonucleate (PMNs), monociti e cellule epiteliali squamose di tessuti non sani, in grado di legare il calcio e lo zinco. A seguito del legame con il calcio diventa resistente alla degradazione indotta dai leucociti o da enzimi batterici^{3,5}. E' inoltre in grado di inibire le metalloproteasi zinco dipendenti abbassando la concentrazione di zinco presente in loco, provocando quindi la morte di microorganismi o colture cellulari animali od umane.

La calprotectina può essere rilevata in campioni di feci di meno di un grammo di peso, in più, nelle patologie organiche dell'intestino, il livelli di calprotectina aumentano da cinque a diverse migliaia di volte rispetto a quelli degli individui sani, indicando uno stato infiammatorio intestinale^{6,9}.

Pazienti con disturbi intestinali causati da disfunzione spesso presentano sintomi simili a quelli delle patologie organiche e la sola valutazione clinica potrebbe non essere sufficiente a formulare una diagnosi specifica, l'analisi dei livelli di calprotectina può quindi aiutare a distinguere le due condizioni.

Le MICI, come la colite ulcerativa o la malattia di Crohn, possono manifestarsi a partire dall'infanzia fino all'età adulta e la diagnosi è spesso ritardata a causa della sintomatologia poco chiara o della reticenza a sottoporsi all'endoscopia o alla biopsia. L'esame della calprotectina si è dimostrato un buon marker dello stato infiammatorio intestinale sia degli adulti che dei bambini¹⁰⁻¹³.

Principio del test

Calprest® NG è un test immunoenzimatico a rilevazione colorimetrica che sfrutta anticorpi policlonali e monoclonali diretti contro la calprotectina. La calprotectina presente nel campione diluito viene legata dall'anticorpo adsorbito sulla superficie dei pozzetti. Gli anticorpi coniugati con perossidasi di rafano (HRP) legano l'antigene e quindi l'enzima catalizza la conversione del substrato in prodotto colorato. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità del coniugato legato e pertanto alla quantità di calprotectina presente. La concentrazione di calprotectina nel campione viene calcolata usando i calibratori forniti nel kit.

Materiali forniti

(quantità sufficiente per 96 test)

Pozzetti con anticorpi	12x8
Coniugato (IgG, topo)	1x15 ml
Substrato	1x15 ml
Soluzione di arresto	1x15 ml
Soluzione di lavaggio (20x)	1x50 ml
Diluyente (10x)	1x20 ml
Soluzione di estrazione (2,5x)	2x50 ml
Calibratori	6x1.5 ml
Controllo 1 (basso)	1x1.5 ml
Controllo 2 (alto)	1x1.5 ml

Composizione dei materiali/reagenti forniti

1. Pozzetti con anticorpi

12x8 pozzetti rivestiti con anticorpi anti-calprotectina. Sacchetto sigillato di plastica contenente un desiccante ed il coperchio.

2. Coniugato (IgG)

1 fialone contenente 15 ml di anticorpi IgG di topo anti-calprotectina umana marcati con perossidasi di rafano (HRP) in soluzione tamponata con aggiunta di Proclin 300 come conservante. Pronto per l'uso.

3. Substrato

1 fialone contenente 15 ml di reagente substrato (TMB). Pronto per l'uso.

4. Soluzione di arresto

1 fialone contenente 15 ml di soluzione H_2SO_4 (0,5M). Pronto per l'uso.

5. Soluzione di lavaggio (20x)

1 fialone contenente 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata. Diluire con acqua distillata.

6. Diluente (10x)

1 fialone contenente 20 ml di soluzione di diluizione concentrata. Diluire con acqua distillata.

7. Soluzione di estrazione (2,5x)

2 fialoni contenenti 50 ml di soluzione di estrazione concentrata. Diluire con acqua distillata. Questa soluzione è irritante per gli occhi e la pelle.

8. Calibratori

6 fiale contenenti 1.5 ml di soluzione di calprotectina a 6 concentrazioni (0; 2.5; 12.5; 25; 50; 150 ng/ml). Il valore di ciascun calibratore è riportato in etichetta. I calibratori sono pronti per l'uso.

9. Controllo 1

1 fiala contenente 1.5 ml di controllo 1. Pronto per l'uso. Non diluire. Il range dei valori è stampato sull'etichetta.

10. Controllo 2

1 fiala contenente 1.5 ml di controllo 2. Pronto per l'uso. Non diluire. Il range dei valori è stampato sull'etichetta.

Materiali richiesti ma non forniti

Per la raccolta dei campioni di feci

1. Provette per raccolta campioni
2. Contenitore per trasporto

Per la preparazione delle feci

1. Anse per inoculazione monouso, sterili
2. Provette con tappo a vite da circa 14 ml
3. Provette tipo Eppendorf (1-1.5 ml)
4. Bilancia (range di misura 40-150 mg)
5. Vortex mixer
6. Shaker
7. Microcentrifuga (10000g)
8. Congelatore (-20°C)

Attrezzature per test ELISA

1. Pipetta multicanale, 50-200 μ l
2. Pipetta di precisione (5, 100, 1000 μ l)
3. Lavatore per piastre
4. Lettore per piastre (filtro 450 nm)
5. Acqua distillata

Precauzioni e avvertenze

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Applicare le precauzioni universali. Il kit non presenta materiali di origine umana.
3. Attendere che i reagenti, i campioni e i pozzetti della micropiastrea raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
4. Attenzione: non scambiare i componenti di lotti diversi. Una buona performance può essere garantita solo usando componenti dello stesso lotto di Calprest®NG.
5. Le strip non usate devono essere rimesse nel contenitore fornito e sigillate assieme al desiccante e conservate a 2-8°C.
6. Se il lavaggio delle piastre è insufficiente, possono generarsi errori nella rilevazione della concentrazione di calprotectina a causa della rimozione incompleta della soluzione di lavaggio. La corretta manutenzione e pulizia del lavatore è fortemente raccomandata.
7. Il substrato è fotosensibile, conservare al buio e agitare prima dell'uso.
8. La soluzione substrato TMB è irritante per la pelle e le mucose. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente gli occhi con acqua e lavare la cute con sapone e acqua abbondante. Lavare i vestiti contaminati prima di riusarli. Evitare di gettare il prodotto nella rete fognaria. Conservare al buio.
9. La soluzione di arresto contiene acido solforico. Sebbene diluito può causare bruciature va quindi maneggiato con guanti, occhiali protettivi e camice. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua. Usare le stesse precauzioni quando si maneggia la soluzione di estrazione.
10. Tutti i reagenti, eccetto il substrato, la soluzione di stop e la soluzione di lavaggio concentrata, contengono Proclin 300 come conservante. Può provocare reazione allergica.
11. In caso di danneggiamento dell'imballo esterno, accertarsi che siano presenti e integri tutti i componenti elencati nella sezione "Materiali forniti". In presenza di perdita di liquido dai flaconi il kit non deve essere utilizzato.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di estrazione

Diluire aggiungendo 1 parte (50 ml) di soluzione di estrazione concentrata a 1.5 parti (75 ml) di acqua distillata. Si ottengono così 125 ml di soluzione di lavoro. Mescolare.

Soluzione di diluizione

Diluire aggiungendo 1 parte (20 ml) di Soluzione di diluizione concentrata a 9 parti (180 ml) di acqua distillata. Si ottengono così 200 ml di soluzione di lavoro. Mescolare.

Soluzione di lavaggio

Preparare la soluzione di lavaggio diluendo l'intero contenuto del flacone (50 ml) in 950 ml di acqua distillata..

Conservazione e stabilità dei reagenti e soluzioni di lavoro

1. Tutti reagenti e le soluzioni di lavoro, tranne la soluzione di lavaggio, devono essere conservati a 2-8°C.
2. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente. Vedere la tabella sottostante per la stabilità dopo la prima apertura.
3. Evitare l'esposizione ad alte temperature, luce solare diretta o condizioni di estrema umidità.
4. Le strip non usate devono essere rimesse nel contenitore fornito e sigillate assieme al desiccante e conservate a 2-8°C

Stabilità dei reagenti (dopo la prima apertura)

Reagente	Conservazione	Tempo
Coniugato	2-8°C	30 giorni
Substrato	2-8°C	90 giorni
Calibratori	2-8°C	30 giorni
Controlli	2-8°C	30 giorni

Il reagente substrato è sensibile alla luce. Conservare al buio e mescolare prima dell'uso.

Stabilità delle soluzioni di lavoro

Reagente	Conservare a	Tempo
Soluzione di lavaggio	20-25°C	30 giorni
Soluzione di estrazione	2-8°C	90 giorni
Soluzione di diluizione	2-8°C	30 giorni

Raccolta dei campioni

Feci molli o liquide possono essere raccolte in quanto nel calcolo del risultato è prevista la loro normalizzazione rispetto al peso di feci. Evitare la raccolta di feci da pannolini a meno che il campione non possa essere raccolto da una porzione che non è in diretto contatto con il pannolino.

Caratteristiche del campione

Prelevare circa 1-5 g di feci e porle in un contenitore adatto. Non sono richiesti conservanti.

Trasporto del campione

Il campione di feci dovrebbe essere ricevuto ed estratto dal laboratorio entro 10 giorni dal prelievo. La temperatura durante il trasporto non dovrebbe mai superare i 30°C.

Conservazione del campione

Il campione di feci in laboratorio può essere conservato a 2-8°C per 4 giorni prima di essere testato. Se non testati immediatamente conservare i campioni di feci a -20°C.

Procedura

Preparazione del campione

Scongelare i campioni di feci e assicurarsi che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C).

Ci sono due diversi metodi di preparazione del campione fecale, manuale oppure mediante l'utilizzo del dispositivo di estrazione fecale EasyCal. L'utente può scegliere il metodo di preparazione del campione preferito.

A. Preparazione del campione con EasyCal

Per la procedura di raccolta/estrazione, si prega di consultare il box insert di EasyCal cat. 9062.

A seguito della procedura di estrazione, l'estratto fecale è pronto per essere testato manualmente oppure in modo automatico posizionando il tubo di EasyCal (priva di imbuto e asta sagomata) direttamente nel rack porta campioni dello strumento per metodiche ELISA.

B. Preparazione del campione manuale

1. Pesare (tara) una provetta vuota e l'ansa per inoculazione.
2. Prelevare circa 100 mg (range 80-120 mg) di feci per mezzo dell'ansa (mescolando per rendere il più omogeneo possibile il campione) e porli in una provetta con tappo a vite.
3. Pesare la provetta (contenente l'ansa ed il campione) e calcolare il peso netto delle feci (tra 80-120 mg).
4. Rompere il manico dell'ansa lasciando la parte inferiore con le feci e 4-6 cm del manico all'interno della provetta.
5. Aggiungere la soluzione di estrazione diluita (rapporto peso/volume 1:50), per esempio 100 mg feci + 4,9 ml di soluzione di estrazione diluita (vedere la tabella). Chiudere la provetta.

Feci (mg)	Soluzione di Estrazione (ml)	Feci (mg)	Soluzione di Estrazione (ml)
120	5.9	100	4.9
115	5.6	95	4.7
110	5.4	90	4.4
105	5.2	85	4.2
		80	3.9

6. Agitare/mescolare vigorosamente con vortex per 30 sec.

8. Omogeneizzare per 25 ± 5 minuti su agitatore. L'ansa all'interno della provetta funzionerà da agitatore.
9. Trasferire l'omogenato (1 ml) in una provetta tipo Eppendorf e centrifugare per 20 minuti a 10.000g a temperatura ambiente usando una centrifuga da tavolo.
10. Trasferire 0,5 ml del sopranatante chiaro in una provetta tipo Eppendorf nuova. Evitare il contatto con il fondello poiché aggregati o particolati possono generare valori errati di calprotectina.
11. L'estratto può essere analizzato immediatamente oppure congelato a -20°C e conservato per un massimo di 3 mesi.

Procedura ELISA

1. Assicurarsi che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$).
2. Scongelare i campioni e portarli a temperatura ambiente.
3. Diluire i campioni 1:400 in due passaggi consecutivi. Nel primo passaggio diluire $5 \mu\text{l}$ di campione estratto in $995 \mu\text{l}$ di Soluzione di diluizione (1:200). Quindi prelevare $500 \mu\text{l}$ della prima diluizione e diluire ulteriormente 1:2 aggiungendo $500 \mu\text{l}$ di Soluzione di diluizione.
4. Un esempio di disposizione della piastra è riportato di seguito. Inserire il numero richiesto di strip nel supporto. Usare strip con pozzetti non rivestiti per completare la piastra se il lavatore richiede una piastra intera. I calibratori ed i controlli devono essere inseriti in ogni serie.

	1	2	3	4	5	6
A	Cal 1	Cal 5	Campione	Campione	Campione	
B	Cal 1	Cal 5	Campione	Campione	Campione	
C	Cal 2	Cal 6	Campione	Campione		
D	Cal 2	Cal 6	Campione	Campione		
E	Cal 3	Ctr. 1	Campione	Campione		
F	Cal 3	Ctr. 1	Campione	Campione		
G	Cal 4	Ctr. 2	Campione	Campione		
H	Cal 4	Ctr. 2	Campione	Campione		

5. Aggiungere $100 \mu\text{l}$ di ciascun calibratore in doppio (A1-B1, C1-D1, ...).
6. Aggiungere $100 \mu\text{l}$ di ciascun controllo in doppio (E2-F2, G2-H2).
7. Mescolare bene i campioni diluiti prima di dispensarli nei pozzetti. Dispensare $100 \mu\text{l}$ di ciascun campione nei rispettivi pozzetti (A3, B3, C3, D3, ...).
8. Coprire le piastre e incubare a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) per 1 ora.
9. Alla fine del periodo di incubazione, lavare i pozzetti aggiungendo 0.3 ml di soluzione di lavaggio a ciascun pozzetto. Rimuovere tutto il liquido dai pozzetti. Ripetere la procedura altre 2 volte per un totale di 3 cicli di lavaggio. Dopo l'aspirazione finale, capovolgere la piastra e batterla con delicatezza su un pezzo di carta da filtro per rimuovere ogni traccia di liquido residuo.
10. Aggiungere $100 \mu\text{l}$ di coniugato in ciascun pozzetto.
11. Coprire le piastre ed incubare temperatura ambiente per 30 min.
12. Ripetere i lavaggi come indicato sopra (cfr.9).
13. Aggiungere $100 \mu\text{l}$ di substrato in ciascun pozzetto. **Nota:** si raccomanda di usare una pipetta multicannale per evitare variazioni del tempo di sviluppo del substrato. Evitare la formazione di bolle.
14. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti al buio o dopo aver coperto la piastra con un foglio di alluminio.
15. Aggiungere $100 \mu\text{l}$ di soluzione di arresto in ciascun pozzetto
16. Leggere i valori di Densità Ottica (DO) per mezzo di un lettore per ELISA a 450 nm. Il valore di DO del Calibratore S6 deve essere superiore a 1.4. È possibile monitorare lo sviluppo della reazione leggendo le assorbanze del calibratore utilizzando un filtro a 620 nm. Valori in densità ottica a 620nm intorno a 0.6 corrispondono, una volta aggiunta la soluzione di arresto, a circa 1.8-2.0 a 450 nm.
17. Dopo aver aggiunto la soluzione di arresto, la piastra può essere conservata a 4°C per 24 ore.

Calibrazione e controllo di qualità

1. Una nuova curva di calibrazione deve essere usata in ogni test.
2. Il valore del calibratore S1 dovrebbe essere minore di 0.2 DO.
3. Inserire il Controllo 1 ed il Controllo 2 in ogni test.

Range di determinazione

1.355 - 150 ng/ml (27.1 - 3000 mg/kg)

Calcolo dei risultati

Utilizzare una elaborazione logit-log 4-parametri per il calcolo dei risultati. Riportare su un sistema x-y i valori di concentrazione in ng/ml dei calibratori e la media delle corrispondenti assorbanze (DO). Nel caso si utilizzi un software che trasforma in scala logaritmica le ascisse (concentrazioni), il calibratore zero va indicato con un valore inferiore ad 1 (es. 0.001). La lettura dei campioni dalla curva standard viene corretta per il fattore di diluizione e convertita in mg/kg moltiplicando per 20 il valore ottenuto dalla curva standard (esempio: una lettura di 20 ng/ml diviene 400 mg/kg). Se il campione è stato ulteriormente diluito, tale fattore dovrà essere tenuto in considerazione per il calcolo della concentrazione. Le concentrazioni possono essere inoltre determinate collegando il lettore ELISA ad un computer.

Limiti

1. Pazienti con agranulocitosi possono generare segnali falsi negativi dovuti alla scarsa produzione di neutrofili da parte del midollo osseo.
2. Pazienti che assumono farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS o NSAIDs) possono avere un aumento dei livelli di calprotectina fecale⁽¹⁴⁾.
3. Pazienti con MICI (IBD) fluttuano tra stadi attivi (infiammazione) e inattivi della patologia. Queste fasi devono essere tenute in considerazione quando si usa il saggio Calprest[®]NG.
4. L'uso di inibitori di pompe protoniche (IPP), coliti microscopiche o malattie diverticolari possono portare ad un aumento dei livelli di calprotectina. Pazienti affetti da Malattia Celiaca non in cura, possono occasionalmente avere livelli di calprotectina alti⁽¹⁵⁾.
5. Altre disfunzioni intestinali, incluse infezioni gastrointestinali e tumori del colon-retto, possono aumentare i livelli di calprotectina. Campioni da questi pazienti possono risultare positivi al test Calprest[®]NG pertanto, la diagnosi di MICI (IBD) attiva, non può essere basata unicamente sulla positività al saggio Calprest[®]NG.
6. La calprotectina fecale è un indicatore della presenza di neutrofili nelle feci e non è specifica per le MICI (IBD).

Valori di riferimento

Uno studio interno ha stabilito i seguenti valori di cut-off:

Concentrazione Calprotectina	Interpretazione	Follow-Up
< 50 mg/kg	Normale	Nessuno
50-120 mg/kg	Borderline	Ritestare, 4-6 settimane
> 120 mg/kg	Positivo	Ripetere come da indicazione clinica

Ulteriori valutazioni fatte su pazienti asintomatici e pazienti con sindrome da intestino irritabile (SII o IBS), oltre a studi internazionali¹⁰⁻¹³, confermano la correttezza dei suddetti valori di cut-off.

Valutazione clinica

Lo studio clinico per il test Calprest[®]NG ha incluso 273 campioni di cui, 130 provenienti da pazienti affetti dalla malattia di Crohn, colite ulcerativa ed intermedia e 143 campioni di controllo negativo provenienti da pazienti con sindrome da intestino irritabile (SII o IBS), dolori addominali ricorrenti (DAR) e altre patologie. I pazienti sono stati diagnosticati sulla base di evidenze cliniche e/o analisi di laboratorio (es. colonscopia). Le tabelle 1 e 2 sottostanti dimostrano la performance clinica del test Calprest[®]NG.

Tabella 1 - Performance clinica del test Calprest®NG (considerando i campioni borderline come positivi con cut-off a 50 mg/kg).

Valori Borderline considerati Positivi		Diagnosi		Totale
		Positivi	Negativi	
Calprest®NG	Positivi	123	14	137
	Negativi	7	129	136
	Totali	130	143	273
Sensibilità		94.6%	95%C.I. ¹ . (89.2% - 97.8%)	
Specificità		90.2%	95%C.I. (84.1% - 94.5%)	
VPP*		89.8%	95%C.I. (83.4% - 94.3%)	
VPN**		94.9%	95%C.I. (89.7% - 97.9%)	

Tabella 2 - Performance clinica del test Calprest®NG (considerando i campioni borderline come negativi con cut-off a 120 mg/kg).

Valori Borderline considerati Negativi		Diagnosi		Totale
		Positivi	Negativi	
Calprest®NG	Positivi	108	3	111
	Negativi	22	140	162
	Totali	130	143	273
Sensibilità		83.1%	(95% C.I. 75.5% - 89.1%)	
Specificità		97.9%	(95% C.I. 94.0% - 99.6%)	
VPP*		97.3%	(95% C.I. 92.3% - 99.4%)	
VPN**		86.4%	(95% C.I. 80.2% - 91.3%)	

* VPP: Valore Predittivo Positivo

** VPN: Valore Predittivo Negativo

¹ C.I.: Intervallo di Confidenza

Confronto tra Metodi

E' stato eseguito uno studio di confronto tra metodi comparando il saggio Calprest®NG con un saggio di riferimento (predicato), testando 157 campioni clinicamente caratterizzati. Questi campioni provengono da pazienti MICI clinicamente diagnosticati (storia clinica e/o biopsia) o da pazienti con SSI o altre patologie da considerarsi come controlli negativi. Tutti i campioni sono stati testati con il saggio Calprest®NG (y) e il predicato (x) seguendo le rispettive istruzioni d'uso. I risultati sono riportati nelle Tabelle 3, 4 e 5.

Tabella 3 - Analisi con Regressione di Deming

	Pendenza (95% I.C.)	Y-intercetta (95% I.C.)
$Y = 0.9232x + 0.1285$	0.9232 (0.8410 ÷ 1.005)	0.1285 (-4.643 ÷ 4.9)

Tabella 4 - Confronto tra metodi (considerando i campioni borderline come positive con il cut-off a 50 mg/kg).

Valori Borderline considerati Positivi		Predicato		Totale
		Positivi	Negativi	
Calprest®NG	Positivi	113	0	113
	Negativi	4	40	44
	Totali	117	40	157
Concordanza Positiva		96.6%	(95% C.I. 91.5% - 98.7%)	
Concordanza Negativa		100.0%	(95% C.I. 91.2% - 100.0%)	
Concordanza Totale		97.5%	(95% C.I. 93.9% - 99.0%)	

Tabella 5 - Confronto tra metodi considerando i campioni borderline come negativi con il cut-off a 120 mg/kg).

Valori Borderline considerati Negativi		Predicato		Totale
		Positivi	Negativi	
Calprest®NG	Positivi	73	3	76
	Negativi	3	78	81
	Totali	76	81	157
Concordanza Positiva		96.1%	(95% C.I. 89.0% - 98.6%)	
Concordanza Negativa		96.3%	(95% C.I. 89.7% - 98.7%)	
Concordanza Totale		96.2%	(95% C.I. 91.9% - 98.2%)	

Caratteristiche del Test

Linearità in matrice e in acqua

Tre (3) campioni alto positivi, tre (3) campioni negativi (linearità in matrice) o della calprotectina di riferimento (linearità in acqua), sono stati usati per lo studio. I tre campioni alto positivi sono stati riuniti a formare un pool (H) e diluiti con i tre campioni negativi anch'essi riuniti (L). I risultati per la valutazione della linearità dimostrano che il saggio Calprest®NG ha una linearità accettabile ed accurata sia in matrice con un range da 25.2 a 3066 mg/kg, che in acqua con un range da 27.8 a 2889.3 mg/kg.

Linearità in matrice					
	Intervallo del test (mg/kg)	Pendenza (95% I.C.)	Y-intercetta (95% I.C.)	R ²	% Percentuale (Ottenuto/Teorico)
1	25.2 ÷ 3066	1.014 (0.9868 ÷ 1.041)	9.279 (-26.54 ÷ 45.10)	0.994	86.9 ÷ 112.8
Linearità in acqua					
	Intervallo del test (mg/kg)	Pendenza (95% I.C.)	Y-intercetta (95% I.C.)	R ²	% Percentuale (Ottenuto/Teorico)
1	27.8 ÷ 2889.3	1.0322 (1.006 ÷ 1.0574)	-5.7463 (-36.40 ÷ 24.91)	0.999	93.0 ÷ 118.7

Limite del Bianco (LoB), Limite di rilevabilità (LoD), Limite di Quantificazione (LoQ)

Gli studi per determinare il LoB, LoD e LoQ sono stati fatti in accordo con la linea guida CLSI EP-17-A. I risultati sono riportati nella tabella seguente:

	Valore (ng/ml)	Concentrazione (mg/kg)
LoB	0.87	17.50
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.10

Accuratezza/Recupero

Lo studio è stato condotto su sette (7) diversi campioni di feci estratte. Ogni campione estratto è stato inoculato con una quantità/volume costante di calprotectina o con un volume equivalente di diluente del campione. Ogni campione è stato testato in triplicato. I dati ottenuti sono riportati nella tabella seguente.

Recupero dopo inoculo								
Campione		1	2	3	4	5	6	7
Concentrazione di base	mg/kg	9.3	51.7	162.7	307.7	458.3	1204.0	1975.2
Concentrazione inoculata	mg/kg	32.3	32.3	32.3	115.0	115.0	115.0	115.0
Teorica (Base + inoculo)	mg/kg	41.7	84.0	195.0	422.7	573.3	1319.0	2090.2
Osservata (Base + inoculo)	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1397.7	2343.8
Recupero	%	101.6	94.8	102.9	100.6	103.3	106.0	112.1

Ripetibilità degli estratti

Per determinare la riproducibilità tra una estrazione e l'altra dello stesso campione, quattro (4) campioni (2 positivi, 1 vicino al cut-off, 1 negativo) sono stati estratti 10 volte ognuno ed ogni estratto è stato testato in duplicato. I dati ottenuti sono riportati nella tabella seguente.

Campione estratto	1	2	3	4
Media (mg/kg)	29.6	52.7	227.0	1973.3
DS	4.3	5.8	15.5	117.3
CV%	14.6	11.1	6.8	5.9

Precisione intra-sito

Lo studio è stato effettuato estraendo sette (7) diversi campioni di feci (sei (6) positivi e uno (1) intorno al cut-off) e testando ciascun estratto in duplicato durante due (2) serie separate al giorno per dieci (10) giorni da tre (3) diversi operatori. I valori di CV% devono essere $\leq 20\%$. I dati sono riportati nella seguente tabella:

Precisione intra-sito: Risultati												
Id#	N	Media (mg/kg)	Intra-run		Inter-run		Inter-giorno		Inter-operatore		Totale	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
1	120	170.88	3.40	2.0%	6.77	4.0%	5.51	3.2%	0.80	0.5%	9.40	5.5%
2	120	741.60	17.38	2.3%	43.12	5.8%	55.37	7.5%	0.00	0.0%	72.30	9.7%
3	120	248.74	6.44	2.6%	11.98	4.8%	12.21	4.9%	0.00	0.0%	18.28	7.3%
4	120	42.60	1.28	3.0%	4.30	10.1%	0.00	0.0%	0.55	1.3%	4.52	10.6%
5	120	1193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%
6	120	1006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%
7	120	2267.29	223.08	9.8%	83.22	3.7%	155.52	6.9%	58.33	2.6%	290.31	12.8%

Precisione inter-sito

Lo studio è stato effettuato in tre (3) centri estraendo otto (8) diversi campioni di feci (sei (6) positivi, uno (1) intorno al cut-off ed uno (1) negativo). Ciascun centro ha testando ciascun estratto in quintuplicato durante cinque (5) giorni. I valori di CV% devono essere $\leq 20\%$. I dati sono riportati nella seguente tabella:

Campione	N	Media (mg/kg)	Ripetibilità		Precisione		Riproducibilità	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%
B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%
C	75	1180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%
D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%
E	75	1629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%
F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%
G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%
H	75	2152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%

Campione	Ripetibilità		Precisione		Riproducibilità	
	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
A	11.39 \div 16.35	2.6% \div 3.8%	46.39 \div 103.09	10.7% \div 23.8%	47.26 \div 101.80	10.9% \div 23.5%
B	3.13 \div 4.49	8.6% \div 12.3%	4.17 \div 6.61	11.4% \div 18.1%	4.17 \div 6.61	11.4% \div 18.1%
C	60.33 \div 86.54	5.1% \div 7.3%	118.0 \div 230.93	10.0% \div 19.6%	119.47 \div 225.50	10.1% \div 19.1%
D	30.45 \div 43.68	4.5% \div 6.4%	40.42 \div 64.14	5.9% \div 9.4%	49.28 \div 193.64	7.2% \div 28.4%
E	81.72 \div 117.23	5.0% \div 7.2%	162.28 \div 317.59	10.0% \div 19.5%	168.95 \div 345.24	10.4% \div 21.2%
F	3.56 \div 5.10	5.7% \div 8.2%	4.63 \div 7.22	7.5% \div 11.6%	5.42 \div 21.29	8.7% \div 34.3%
G	10.19 \div 14.61	2.9% \div 4.1%	22.56 \div 45.07	6.3% \div 12.6%	31.11 \div 149.23	8.7% \div 41.8%
H	147.32 \div 211.32	6.8% \div 9.8%	240.6 \div 428.66	11.2% \div 19.9%	242.64 \div 437.93	11.3% \div 20.3%

Calprest®NG
96 test, codice 9069



Data di preparazione:
2019.11.29
Rev. 2

ETS9069

Eurospital



Prodotto da:
Eurospital SpA
Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Phone: +39 040 8997.1 Fax: +39 040 280944
info@eurospital.it www.eurospital.com

Calprest[®] NG

Usage in vitro.

Utilisation

Calprest[®]NG est un test ELISA quantitatif permettant la détection et la quantification de la calprotectine fécale. Calprest[®]NG peut être utilisé comme un outil de diagnostic in vitro des maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse), et peut aider à différencier les MII du syndrome du côlon irritable (IBS) en conjonction avec d'autres données cliniques et de laboratoire.

Résumé et explication

La calprotectine^{1,2} est une protéine de liaison de calcium et de zinc produite par des cellules polymorphonucléaires (PMN), les monocytes et l'épithélium malpighien à l'exception de ceux dans la peau normale. Après la fixation du calcium, la calprotectine peut résister à la dégradation par les enzymes leucocytaires et bactériennes^{3,5}. A cause de la compétition avec différentes enzymes pour des concentrations locales limitées en zinc, la calprotectine peut inhiber l'activité de nombreuses enzymes zinc-dépendantes et ainsi tuer les micro-organismes ou des cellules animales et humaines en culture. La calprotectine peut être détectée même dans des échantillons de selles aléatoires et de faibles volume (moins d'un gramme). De plus, les maladies organiques de l'intestin montrent un taux élevé de calprotectine fécale, de cinq à plusieurs milliers de fois la valeur supérieure des individus sains, indiquant une inflammation intestinale^{6,9}. Les patients souffrant de troubles abdominaux organiques ou fonctionnels peuvent avoir des symptômes similaires, mais l'examen clinique seul peut ne pas être suffisant pour fournir un diagnostic précis. En outre, la calprotectine a été démontrée comme étant un marqueur de maladie inflammatoire de l'intestin chez l'enfant et chez l'adulte¹⁰⁻¹³. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), à savoir la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn, peuvent apparaître dès l'enfance jusqu'à la fin de l'âge adulte, et le diagnostic est souvent retardé en raison de symptômes vagues ou de la réticence à effectuer une endoscopie et une biopsie.

Principe du test

Calprest[®]NG est un système de dosage immuno-enzymatique sur support solide avec détection colorimétrique basée sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre la calprotectine. La calprotectine présente dans l'échantillon dilué est liée par l'anticorps adsorbé à la surface du puits. L'anticorps conjugué à une enzyme se lie à l'antigène capturé, et par la suite l'enzyme catalyse la conversion du substrat en un produit coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de conjugué lié, et donc à la quantité de calprotectine capturée. La concentration de la calprotectine dans les échantillons est calculée en utilisant les étalons fournis.

Matériel fourni

(q.s.p 96 tests)

Microplaque sensibilisée	12 x 8 puits
Conjugué (IgG de souris)	1 x 15 ml
Substrat	1 x 15 ml
Solution d'arrêt	1x15 ml
Solution de lavage (20X)	1 x 50 ml
Diluant (10X)	1 x 20 ml
Solution d'extraction (2,5X)	2 x 50 ml
Standards	6 x 1.5 ml
Contrôle 1 (titre faible)	1 x 1.5 ml
Contrôle 2 (titre élevé)	1 x 1.5 ml

Composition du matériel fourni

1. Phase solide

12 x 8 puits sensibilisés avec les anticorps anti-calprotectine. Pochette plastique hermétique contenant un sachet déshydratant.

2. Conjugué (IgG)

Un flacon contenant 15 ml de peroxydase de raifort conjuguée aux anticorps IgG de souris anti-calprotectine humaine dans une solution tampon additionnée de Proclin 300 (comme agent conservateur). Solution prête à l'emploi.

3. Substrat

Un flacon contenant 15 ml de substrat (TMB). Prêt à l'emploi.

4. Solution d'arrêt

1 flacon contenant 15 ml de H₂SO₄ (0.5M). Prêt à l'emploi.

5. Solution de lavage (20X)

Un flacon contenant 50 ml de solution de lavage concentrée à diluer dans de l'eau distillée.

6. Diluant (10X)

Un flacon contenant 20 ml de diluant concentré (10X) à diluer avec de l'eau distillée.

7. Solution d'extraction (2,5X)

2 flacons contenant 50 ml de solution d'extraction concentrée (2,5X) à diluer avec de l'eau distillée. La solution concentrée est irritante pour les yeux et la peau.

8. Standards

Six flacons contenant 1.5 ml d'une solution de calprotectine de six concentrations connues différentes (0, 2.5, 12.5, 25, 50, et 150 ng/ml). Le titre de chaque standard est imprimé sur l'étiquette du flacon. Solution prête à l'emploi.

9. Contrôle 1

Un flacon contenant 1,5 ml de contrôle, prêt à l'emploi. Ne pas diluer. La valeur du titre est imprimée sur l'étiquette du flacon.

10. Contrôle 2

Un flacon contenant 1,5 ml de contrôle, prêt à l'emploi. Ne pas diluer. La valeur du titre est imprimée sur l'étiquette du flacon.

Matériel nécessaire non fourni

Transport des échantillons de selles

1. Flacons de prélèvement de selles.
2. Containers de transport.

Préparation de selles

1. Anse stérile cassable ou bâton de bois à usage unique.
2. Tubes en polystyrène à bouchon à vis (14 ml).
3. Tubes Eppendorf (1 ÷ 1,5 ml).
4. Balance de précision (40-150 mg).
5. Vortex.
6. Agitateur.
7. Microcentrifugeuse (10000g).
8. Congélateur (-20°C).

Technique ELISA

1. Pipette multicanaux de 50 à 200 µl.
2. Pipettes de précision 5, 100 et 1000 µl
3. Lecteur de microplaques ELISA avec filtre à 450 nm.
4. Laveur de plaques ELISA
5. Eau distillée

Précautions d'emploi

1. Pour usage in vitro seulement.
2. Suivre les précautions universelles d'usage. Le produit ne contient pas de matériaux d'origine humaine.
3. Les réactifs, les échantillons et les barrettes doivent être à température ambiante (20-25°C) avant le début du test.
4. Attention: ne pas échanger les composants de différents lots. La bonne performance du test n'est garantie que pour les composants d'un même coffret.
5. Les barrettes ELISA non utilisées doivent être conservées à 2-8°C dans leur sachet d'origine scellé avec son déshydratant.
6. Un lavage insuffisant de la microplaque ELISA peut engendrer des valeurs de calprotectine erronées : vérifier régulièrement l'efficacité du système de lavage (dispositif de dépôt et d'aspiration). Une maintenance quotidienne du système de lavage est fortement conseillée.
7. Le substrat est sensible à la lumière. Le stocker à l'obscurité et agiter avant utilisation.
8. La solution de substrat TMB est irritante pour la peau et les muqueuses. En cas de contact, rincer abondamment les yeux avec de l'eau et laver la peau abondamment avec de l'eau et du savon. Laver les vêtements contaminés avant de les réutiliser. Ne pas jeter le produit dans les égouts. Stocker dans l'obscurité.
9. La solution stop contient de l'acide sulfurique. Bien que diluée elle peut causer des brûlures et doit être manipulée avec des gants, des lunettes et une blouse de laboratoire. En cas de contact, rincer abondamment avec de l'eau. Utiliser les mêmes précautions lors de la manipulation de la solution d'extraction.
10. Tous les réactifs à l'exception du substrat et de la solution de lavage concentrée contiennent du ProClin 300, un agent de conservation. Peut produire une réaction allergique.
11. En cas de dommage externe à l'emballage, assurez-vous que tous les éléments énumérés dans la section "Matériel fourni" sont présents et en bon état. En présence d'une fuite de liquide provenant des flacons, le kit ne doit pas être utilisé.

Préparation des solutions

Solution d'extraction

Préparer 125 ml de solution d'extraction en ajoutant 1 part (50 ml) de solution d'extraction concentrée à 1.5 parts (75 ml) d'eau distillée pour obtenir 125 ml de solution finale. Bien mélanger.

Diluant d'échantillon

Préparer 200 ml de diluant d'échantillon en ajoutant 20 ml de diluant (1 part) concentré à 180 ml (9 parts) d'eau distillée. Mélanger vigoureusement.

Solution de lavage

Préparer 1000 ml de solution de lavage en ajoutant le contenu du flacon (50 ml) à 950 ml d'eau distillée.

Conservation et stabilité des réactifs et des solutions de travail

1. Tous les réactifs et solutions de travail, à l'exception de la solution de lavage, doivent être conservés à 2-8°C.
2. La date de péremption est imprimée sur l'étiquette de chaque réactif. Voir le tableau ci-dessous pour la stabilité des réactifs après ouverture des flacons.
3. Éviter une exposition à des températures élevées, à la lumière directe ou à une forte humidité.
4. Les barrettes de la microplaque non utilisées doivent être conservées dans le sachet plastique, hermétiquement fermé avec le déshydratant, à 2-8°C.

Stabilité des réactifs après ouverture

Réactif	Conserver à	Durée de conservation
Conjugué	2-8°C	30 jours
Solution de Substrat	2-8°C	90 jours
Calibrateurs	2-8°C	30 jours
Contrôles	2-8°C	30 jours

Le substrat est sensible à la lumière. Le stocker à l'obscurité et agiter avant utilisation.

Stabilité des solutions reconstituées:

Réactif	Conserver à	Durée de conservation
Solution de lavage	20-25°C	30 jours
Solution d'extraction	2-8°C	90 jours
Diluant d'échantillon	2-8°C	30 jours

Prélèvement des échantillons de selles

Collection de selles aléatoire. Les échantillons de selles molles ou liquides sont acceptables car la normalisation au poids des selles fait partie du calcul du résultat. L'utilisation des échantillons de selles provenant de couches doit être évitée à moins de prélever un échantillon de selles qui n'ait pas été en contact avec la couche elle-même.

Exigences des échantillons

1-5 g de selles dans un flacon à bouchon à vis approprié. Aucun agent de conservation n'est nécessaire.

Stabilité pendant le transport

Les échantillons de selles doivent être reçus par le laboratoire et extraits dans les 10 jours suivant la collecte. Lors du transport la température ne doit pas dépasser 30°C.

Stockage de l'échantillon

Les échantillons de selles au laboratoire doivent être conservés à 2-8°C jusqu'à 4 jours avant le test. Au-delà, les conserver à -20°C.

Procédure

Préparation des échantillons de selles

Décongeler les échantillons de selles à tester à température ambiante et attendre que tous les réactifs aient atteint la température ambiante (20-25°C).

Il existe deux méthodes alternatives de préparation des échantillons de selles: manuelle ou en utilisant le dispositif d'extraction de selles EasyCal. Les utilisateurs peuvent choisir leur méthode de préparation d'échantillons préférée.

A. Préparation des échantillons EasyCal

1. Pour la procédure de collecte/ extraction, veuillez vous reporter à la notice du kit EasyCal cat. 9062.
2. Après la procédure d'extraction, l'extrait fécal est prêt à être testé manuellement ou automatiquement en plaçant le tube EasyCal (sans entonnoir ni bâtonnet) directement dans l'instrument ELISA.

B. Préparation manuelle des échantillons

1. Peser (tarer) le tube vide avec le bouchon à vis et l'anse ou bâton de bois.
2. Mélanger la selle et prélever environ 100 mg (80 à 120 mg) de selles à l'aide de l'anse ou du bâton de bois et placer l'échantillon dans le tube à bouchon à vis.
3. Peser le tube avec les selles et l'anse et calculer le poids net de selles (80 à 120 mg).
4. Couper la tige de l'anse ou bâton de bois pour ne conserver dans le tube qu'une tige de 4 à 6 cm de long avec les selles sur l'anse.
5. Ajouter la solution d'extraction pré-diluée (poids/volume = 1:50), ex: 100 mg de selles + 4,9 ml de solution d'extraction diluée comme décrit dans le tableau ci-dessous. Fermer le tube.

Selles (mg)	Solution d'Extraction (ml)	Selles (mg)	Solution d'Extraction (ml)
120	5.9	100	4.9
115	5.6	95	4.7
110	5.4	90	4.4
105	5.2	85	4.2
		80	3.9

6. Mélanger au vortex pendant 30 secondes.
7. Homogénéiser pendant 25 ± 5 minutes sur un agitateur ou un rouleau. L'anse ou le bâton de bois à l'intérieur du tube agitera comme un agitateur.
8. Transférer 1 ml de l'homogénat obtenu dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 20 minutes à 10000g à température ambiante à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse.
9. Transférer 0,5 ml de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf. Éviter le contact avec le culot car les particules peuvent causer des valeurs de calprotectine erronées.
10. Cet extrait peut être testé immédiatement ou bien conservé à -20°C (pendant trois mois maximum).

Procédure

1. Vérifier que tous les réactifs soient à température ambiante ($20-25^{\circ}\text{C}$) avant de commencer le test.
2. Décongeler les échantillons de selles à température ambiante.
3. Diluer les échantillons 1 : 400 en deux étapes consécutives. Dans la première étape, diluer $5 \mu\text{l}$ de l'échantillon extrait dans $995 \mu\text{l}$ de solution de dilution (1 : 200). Ensuite, diluer $500 \mu\text{l}$ de la première dilution au 1/2 par addition de $500 \mu\text{l}$ de solution de dilution.
4. Une suggestion de plan de microplaque est présentée ci-dessous. Fixer sur la microplaque le nombre de barrettes nécessaires pour la série d'échantillons à tester. Utiliser des barrettes vierges non sensibilisées pour compléter la microplaque si le laveur nécessite d'utiliser des microplaques entières. Les calibrateurs et les contrôles doivent être inclus dans chaque série de tests.

	1	2	3	4	5	6
A	Cal 1	Cal 5	Ech	Ech	Ech	
B	Cal 1	Cal 5	Ech	Ech	Ech	
C	Cal 2	Cal 6	Ech	Ech		
D	Cal 2	Cal 6	Ech	Ech		
E	Cal 3	Ct 1	Ech	Ech		
F	Cal 3	Ct 1	Ech	Ech		
G	Cal 4	Ct 2	Ech	Ech		
H	Cal 4	Ct 2	Ech	Ech		

5. Déposer $100 \mu\text{l}$ de chaque standard en duplicat (puits A1-B1, C1-D1,).
6. Déposer $100 \mu\text{l}$ des contrôles appropriés en duplicat dans les puits E2-F2, G2 - H2.
7. Déposer $100 \mu\text{l}$ de chaque échantillon bien mélangé dans les puits suivants: A3, B3, C3, D3,...
8. Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incubé à température ambiante pendant 60 minutes.
9. Après incubation, laver les puits avec $0,3 \text{ ml}$ de solution de lavage. Éliminer autant de liquide que possible. Répéter cette étape deux fois. Après aspiration finale retourner la microplaque et la sécher en la tapotant sur un papier absorbant afin d'éliminer tout liquide résiduel.
10. Déposer $100 \mu\text{l}$ de conjugué dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incubé à température ambiante pendant 30 minutes.
12. Répéter le lavage comme indiqué ci-dessus (étape 9)
13. Déposer $100 \mu\text{l}$ de substrat dans chaque puits.
Remarque: il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux pour éviter toute variation due au temps de développement du substrat. Éviter la formation de bulles lors du pipetage du substrat.
14. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 15 minutes à l'obscurité.
15. Déposer $100 \mu\text{l}$ de solution stop dans chaque puits.
16. Mesurer les densités optiques (D.O.) à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA à 450 nm. La DO du standard 6 doit être supérieure à 1,4. Il est possible de suivre le développement de la couleur par une lecture à 620nm.
17. Après la déposition de la solution stop, les microplaques peuvent être conservées à $+ 4^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures.

Courbe étalon et contrôle de qualité

1. Une nouvelle courbe étalon est utilisée pour chaque série de tests.
2. La DO du Calibrateur S1 doit être inférieure à 0,2.
3. Les Contrôles 1 et 2 doivent être inclus dans chaque série de tests.

Gamme de valeurs

1.355 - 150 ng/ml (27.1 - 3000 mg/kg).

Calcul et interprétation des résultats

Le calcul des résultats se fait en utilisant le logit-log 4 paramètres. Tracer la courbe étalon en utilisant les concentrations en calprotectine en ng/ml et les valeurs de DO moyennes correspondantes sur un système x-y. Si le système de traitement utilise une échelle logarithmique pour l'axe X (concentration), la valeur du Calibreur 0 doit être saisie comme > 0 (par exemple 0,001). La concentration en calprotectine des échantillons obtenue sur la courbe est corrigée en fonction du facteur de dilution et convertie en mg/kg en multipliant par 20 (ex: une concentration de 20 ng/ml devient 400 mg/kg). Si les échantillons sont plus dilués, le facteur de dilution correspondant doit être utilisé pour les calculs. Les concentrations peuvent aussi être déterminées en utilisant un ordinateur relié au lecteur ELISA.

Limites

1. Des résultats faussement négatifs peuvent survenir chez les patients qui ont une granulocytopenie due à une aplasie médullaire.
2. Certains patients qui prennent des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) auront une élévation de leur niveau de calprotectine fécale.⁽¹⁴⁾
3. Les patients atteints de MICI oscillent entre phases actives (inflammatoires) et inactives de la maladie. Ces étapes doivent être considérées lors de l'utilisation du dosage Calprest[®]NG.
4. L'utilisation d'inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), la colite microscopique et la maladie diverticulaire peuvent aussi conduire à un niveau de calprotectine élevée. Les patients atteints de la maladie coeliaque non traitée peuvent parfois montrer une valeur de la calprotectine élevée.⁽¹⁵⁾
5. D'autres troubles intestinaux, y compris de nombreuses infections gastro-intestinales et le cancer colorectal, peuvent se traduire par des niveaux élevés de calprotectine. Ces échantillons seront testés positifs avec le test Calprest[®]NG. Par conséquent, un diagnostic de MICI actif ne peut être établi que sur la base d'un résultat positif avec le test Calprest[®]NG.
6. La calprotectine fécale est un indicateur de la présence de neutrophiles dans les selles et n'est pas spécifique des MICI.

Valeurs attendues

Une étude interne de valeur seuil a été effectuée et les valeurs sont indiquées dans le tableau ci-dessous:

Concentration de calprotectine	Interprétation	Suivi
<50 mg/kg	Normal	Aucun
50-120 mg/kg	Limite	Réévaluer à 4-6 semaines
> 120 mg/kg	Anormal	Répéter selon le tableau clinique

D'autres évaluations incluant des patients asymptomatiques, ainsi que les patients atteints du syndrome du côlon irritable (à différencier de MICI) ainsi que des études internationales⁽¹⁰⁻¹³⁾ ont confirmé le bien-fondé de ces valeurs.

Évaluation clinique

Pour le dosage Calprest[®]NG, l'étude clinique a inclus 273 échantillons, dont 130 patients touchés par la maladie de Crohn, colite ulcéreuse et intermédiaire et 143 échantillons négatifs pour le syndrome du côlon irritable (IBS), la douleur abdominale récurrente (RAP) et des patients atteints d'autres maladies. Les patients positifs ont été diagnostiqués au moyen d'observations cliniques et/ou confirmés par coloscopie. Les tableaux 1 et 2 ci-dessous montrent la performance clinique du test Calprest[®]NG.

Tableau 1 - Performance clinique du test Calprest®NG (avec des valeurs seuil Calprest®NG considérées positives à 50 mg/kg).

Valeurs seuil considérées positives		Diagnostic clinique		Total
		Positif	Négatif	
Calprest®NG	Positif	123	14	137
	Négatif	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensibilité		94.6%	95%C.I. [§] . (89.2% - 97.8%)	
Spécificité		90.2%	95%C.I. (84.1% - 94.5%)	
VPP*		89.8%	95%C.I. (83.4% - 94.3%)	
VPN**		94.9%	95%C.I. (89.7% - 97.9%)	

Tableau 2 - Performance clinique du test Calprest®NG (avec des valeurs seuil Calprest®NG considérées négatives à 120 mg/kg).

Valeurs seuil considérées négatives		Diagnostic clinique		Total
		Positive	Négative	
Calprest®NG	Positif	108	3	111
	Négatif	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensibilité		83.1%	(95% C.I. 75.5% - 89.1%)	
Spécificité		97.9%	(95% C.I. 94.0% - 99.6%)	
VPP*		97.3%	(95% C.I. 92.3% - 99.4%)	
VPN**		86.4%	(95% C.I. 80.2% - 91.3%)	

* VPP: Valeur Prédictive Positive

** VPN: Valeur Prédictive Négative

§ C.I.: Intervalle de confiance

Comparaison de méthode

Une étude comparative a été réalisée avec le test Calprest®NG et un autre test comparatif, en utilisant 157 échantillons cliniques. Ces échantillons provenaient de patients diagnostiqués MICI (histoire clinique et / ou une biopsie), tandis que les échantillons négatifs ont été obtenus à partir de patients souffrant du syndrome du côlon irritable ou d'autres maladies. Tous les échantillons ont été testés avec le Calprest®NG (y) et le test de référence (x) en fonction de leurs notices correspondantes. Les résultats sont résumés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Tableau 3 - Analyse de régression de Deming

	Pente (95% CI)	Intersection avec l'axe Y (95% CI)
$Y = 0.9232x + 0.1285$	0.9232 (0.8410 ÷ 1.005)	0.1285 (-4.643 ÷ 4.9)

Tableau 4 - Comparaison de méthodes (avec des valeurs d'échantillons de calprotectine considérées comme positives avec une valeur de seuil de 50 mg / kg).

Valeurs limites d'échantillons considérés comme positifs		Test de référence		Total
		Pos	Neg	
Calprest®NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
	Total	117	40	157
Concordance Positif		96.6%	(95% C.I. 91.5% - 98.7%)	
Concordance Négatif		100.0%	(95% C.I. 91.2% - 100.0%)	
Concordance Total		97.5%	(95% C.I. 93.9% - 99.0%)	

Tableau 5 - Comparaison de méthodes (avec des valeurs d'échantillons de calprotectine considérées comme négatives avec une valeur de seuil de 120 mg / kg).

Valeurs limites d'échantillons considérés comme négatifs		Test de référence		Total
		Pos	Neg	
Calprest®NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
	Total	76	81	157
Concordance Positif		96.1%	(95% C.I. 89.0% - 98.6%)	
Concordance Négatif		96.3%	(95% C.I. 89.7% - 98.7%)	
Concordance Total		96.2%	(95% C.I. 91.9% - 98.2%)	

Caractéristiques de performance

Linéarité en matrice et aqueuse

Trois (3) extraits d'échantillons de selles hautement positives, trois (3) extraits d'échantillons faiblement positifs (matrice de linéarité) ou un matériau de référence pour kit calprotectine (linéarité aqueuse) ont été utilisés dans l'étude. Les trois (3) extraits d'échantillons de selles hautement positives ont été mélangés (H) et dilués avec un mélange des trois extraits d'échantillons de selles faiblement positives (L). Les résultats de l'évaluation des gammes de linéarité montrent que le test Calprest®NG a à la fois la linéarité et une précision acceptable de 25,2 à 3066 mg / kg pour la matrice et de 27,8 à 2889,3 mg / kg pour la linéarité aqueuse.

Linéarité en matrice					
	Gamme de valeurs (mg/kg)	Pente (95% CI)	Intersection avec l'axe Y (95% CI)	R ²	Taux de récupération % (Obtenu / théorique)
1	25.2 ÷ 3066	1.014 (0.9868 ÷ 1.041)	9.279 (-26.54 ÷ 45.10)	0.994	86.9 ÷ 112.8
Linéarité aqueuse					
	Gamme de valeurs (mg/kg)	Pente (95% CI)	Intersection avec l'axe Y (95% CI)	R ²	Taux de récupération % (Obtenu / théorique)
1	27.8 ÷ 2889.3	1.0322 (1.006 ÷ 1.0574)	-5.7463 (-36.40 ÷ 24.91)	0.999	93.0 ÷ 118.7

Limites de Blanc, de détection et quantification

Les études de LoB, LoD et LoQ ont été réalisées selon la procédure EP17-A. Les résultats sont rapportés dans le tableau

Critère	Valeur (ng/ml)	Concentration (mg/kg)
LoB	0.87	17.50
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.10

Précision / Récupération

L'étude a été réalisée en testant sept (7) échantillons de selles différents. Chaque échantillon de selles a été enrichi avec une quantité / volume constant de calprotectine ou avec un volume égal de diluant d'échantillon pour compenser les écarts de volume. Chaque échantillon a été testé en triplicat. Les données sont montrées dans le tableau ci-dessous.

Recupero dopo inoculo								
Echantillon		1	2	3	4	5	6	7
Valeur base (mg/kg)	mg/kg	9.3	51.7	162.7	307.7	458.3	1204.0	1975.2
Valeur enrichissement	mg/kg	32.3	32.3	32.3	115.0	115.0	115.0	115.0
Théorique (Base + enrich.) mg/kg	mg/kg	41.7	84.0	195.0	422.7	573.3	1319.0	2090.2
Obtenu (Base + enrich.) mg/kg	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1397.7	2343.8
Récupération %	%	101.6	94.8	102.9	100.6	103.3	106.0	112.1

Reproductibilité de l'extraction:

Afin de déterminer la reproductibilité d'une extraction à une autre, quatre (4) échantillons (deux (2) positifs, un (1) proche du seuil de positivité et 1 négatif) ont été extraits 10 fois chacun, et chaque extrait a été testé en duplicat. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

Extraits d'échantillons de selles	1	2	3	4
Moyenne (mg/kg)	29.6	52.7	227.0	1973.3
DS	4.3	5.8	15.5	117.3
CV%	14.6	11.1	6.8	5.9

Evaluation unicentrique de la précision

L'étude a été réalisée sur sept (7) échantillons de selles différentes (six (6) positifs et un (1) proche du seuil de positivité). Chaque extrait a été testé en duplicat sur deux (2) séries par jour pendant dix (10) jours, par trois (3) différents opérateurs. Le coefficient de variation CV (%) devrait être inférieur ou égal à 20%. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Evaluation unicentrique de la précision: Résultats												
ID#	N	moyenne (mg/kg)	Intra-série		Inter-série		Sur différents jours		Entre Opérateurs		Total	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
1	120	170.88	3.40	2.0%	6.77	4.0%	5.51	3.2%	0.80	0.5%	9.40	5.5%
2	120	741.60	17.38	2.3%	43.12	5.8%	55.37	7.5%	0.00	0.0%	72.30	9.7%
3	120	248.74	6.44	2.6%	11.98	4.8%	12.21	4.9%	0.00	0.0%	18.28	7.3%
4	120	42.60	1.28	3.0%	4.30	10.1%	0.00	0.0%	0.55	1.3%	4.52	10.6%
5	120	1193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%
6	120	1006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%
7	120	2267.29	223.08	9.8%	83.22	3.7%	155.52	6.9%	58.33	2.6%	290.31	12.8%

Evaluation multicentrique de la précision

L'étude a été réalisée dans trois (3) centres, sur huit (8) extraits de selles différentes (six (6) positifs, un (1) proche du seuil de positivité et un (1) négatif). Chaque centre a testé chaque extrait en cinq (5) réplicats sur cinq (5) jours. Le coefficient de variation CV (%) devrait être inférieur ou égal à 20%.

Échantillon	N	Moyenne (mg/kg)	Répétabilité		Précision		Reproductibilité	
			DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%
B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%
C	75	1180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%
D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%
E	75	1629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%
F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%
G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%
H	75	2152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%

Échantillon	Répétabilité - 95% CIs		Précision 95% CIs		Reproductibilité - 95% CIs	
	DS	CV%	DS	CV%	DS	CV%
A	11.39 ÷ 16.35	2.6% ÷ 3.8%	46.39 ÷ 103.09	10.7% ÷ 23.8%	47.26 ÷ 101.80	10.9% ÷ 23.5%
B	3.13 ÷ 4.49	8.6% ÷ 12.3%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%
C	60.33 ÷ 86.54	5.1% ÷ 7.3%	118.0 ÷ 230.93	10.0% ÷ 19.6%	119.47 ÷ 225.50	10.1% ÷ 19.1%
D	30.45 ÷ 43.68	4.5% ÷ 6.4%	40.42 ÷ 64.14	5.9% ÷ 9.4%	49.28 ÷ 193.64	7.2% ÷ 28.4%
E	81.72 ÷ 117.23	5.0% ÷ 7.2%	162.28 ÷ 317.59	10.0% ÷ 19.5%	168.95 ÷ 345.24	10.4% ÷ 21.2%
F	3.56 ÷ 5.10	5.7% ÷ 8.2%	4.63 ÷ 7.22	7.5% ÷ 11.6%	5.42 ÷ 21.29	8.7% ÷ 34.3%
G	10.19 ÷ 14.61	2.9% ÷ 4.1%	22.56 ÷ 45.07	6.3% ÷ 12.6%	31.11 ÷ 149.23	8.7% ÷ 41.8%
H	147.32 ÷ 211.32	6.8% ÷ 9.8%	240.6 ÷ 428.66	11.2% ÷ 19.9%	242.64 ÷ 437.93	11.3% ÷ 20.3%

Calprest®NG
96 test, code: 9069



Date de preparation:

2019.11.29

Rev. 2

ETS9069

Eurospital 



Produit par:
Eurospital SpA
Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Phone: +39 040 8997.1 Fax: +39 040 280944
info@eurospital.it www.eurospital.com

Calprest[®] NG

Nur für In-vitro Diagnostik

Verwendung

Calprest[®] NG ist ein quantitativer ELISA-Assay um die Konzentration von fäkalem Calprotectin zu detektieren. Calprest[®] NG kann als In Vitro Diagnostikum bei der Diagnose von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen CED (engl.: Inflammatory Bowel Diseases (IBD)); Häufigster Vertreter: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) unterstützen und kann helfen CED von Reizdarmsyndrom RDS (engl.: Irritable Bowel Syndrom (IBS)) zu unterscheiden, natürlich nur in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laboregebnissen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Calprotectin^{1,2} ist ein Kalzium und Zink-bindendes Protein, welches von polymorphkernigen Zellen (engl.: PolyMorphoNuclear: PMN), Monozyten und Plattenepithelzellen (außer denen in der normalen Haut) produziert wird. Nach der Kalziumbindung kann es sich gegen den Abbau von Leukozyten- und Bakterienenzymen wehren.^{3,5} Bei der Konkurrenzsituation mit verschiedenen Enzymen um den lokal begrenzten Mengen an Zink, kann Calprotectin viele Zink abhängige Enzyme hemmen und dadurch Mikroorganismen oder tierische und menschliche Zellen in Kultur, töten. Calprotectin kann auch in kleinen (weniger als ein Gramm) stichprobenartigen Stuhlproben nachgewiesen werden. Außerdem, organische Erkrankungen des Darms ergeben ein starkes fäkales Calprotectin Signal, das heißt die Höhe des Signals ist oft fünf bis mehrere tausend Mal stärker als die obere Referenz in gesunden Individuen wo Darmentzündungen erkennbar sind.^{6,9} Patienten mit organischen oder funktionellen Bauchkrankungen können ähnliche Symptome haben, daher reichen klinische Untersuchungen alleine nicht aus, um eine genaue Diagnose zu erhalten. Zusätzlich hat der Calprotectin Assay dargelegt, bei Kindern und Erwachsenen Patienten, ein Marker der entzündlichen Darmkrankheit zu sein.¹⁰⁻¹³ Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), das heißt Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, kann von der frühen Kindheit bis zum späten Erwachsenenalter auftauchen, und die Diagnose ist oft verspätet durch vage Symptome oder die Zurückhaltung Endoskopie und Biopsie durchzuführen.

Testprinzip

Calprest[®] NG ist ein Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) System mit farbmetrischen Nachweis, basierend auf der Verwendung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Calprotectin. Calprotectin in der verdünnten Probe, wird durch den gut an der Oberfläche des Kunststoff adsorbierten Antikörpers, gebunden. Der Enzym-Konjugat-Antikörper bindet sich an das eingefangene Antigen und anschließend katalysiert das Enzym die Umwandlung des Substrats in ein gefärbtes Produkt. Die Intensität der Farbentwicklung ist direkt proportional zur Menge an gebundenen Konjugats und damit zu der Menge des erfassten Calprotectin. Die Konzentration von Calprotectin in den Proben, wird durch die zur Verfügung gestellten Kalibratoren, berechnet.

Kit-inhalt

(ausreichend für 96 Bestimmungen)

Mikrotiterplatte, beschichtet	12x8
Deckel für Mikrotiterplatte	1 Stück
Enzym Konjugat Antikörper (IgG, Maus)	1x15 ml
Substratlösung	1x15 ml
StoppLösung	1x15 ml
Waschlösung (20x)	1x50 ml
Verdünnungslösung (10x)	1x20 ml
Extraktionslösung (2.5x)	2x50 ml
Kalibratoren	6x1.5 ml
Kontrolle 1	1x1.5 ml
Kontrolle 2	1x1.5 ml

Zusammensetzung der mitgelieferten Materialien/Reagenzien

1. Mit Antikörpern beschichtete Platte

12x8 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-Calprotectin-Antikörpern, versiegelt in einem Plastikbeutel, der ein Trockenmittel enthält.

2. Enzym Konjugat Antikörper (IgG)

1 Flasche, 15 ml, mit Meerrettich-Peroxidase markiertem Anti-human Calprotectin IgG Antikörper (Maus) in Pufferlösung mit Proclin 300 als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig.

3. Substratlösung

1 Flasche, 15 ml, TMB, gebrauchsfertig

4. Stopplösung

1 Flasche, 15 ml, mit, H_2SO_4 (0.5 M) gebrauchsfertig.

5. Waschlösung (20x)

1 Flasche, 50 ml konzentrierte Waschlösung. Mit destilliertem Wasser verdünnen.

6. Verdünnungslösung (10x)

1 Flasche, 20 ml konzentrierte blaue Lösung. Mit destilliertem Wasser verdünnen.

7. Extraktionslösung (2.5x)

2 Flaschen, à 50 ml konzentrierte Lösung. Mit destilliertem Wasser verdünnen.

8. Standards

6 Fläschchen, mit je 1.5 ml Standardlösung (0, 2.5, 12.5, 25, 50 und 150, ng/ml) rot eingefärbt, gebrauchsfertig.

9. Kontrolle 1

1 Fläschchen, 1.5 ml, gebrauchsfertig.

10. Kontrolle 2

1 Fläschchen, 1.5 ml, gebrauchsfertig.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

1. Stuhlprobensammelgefäß

2. Transportbehälter

Zur Probenvorbereitung

1. Sterile Einweg-Impfösen

2. Einweg Polystyrol Röhrcchen mit Schraubverschluss, 14 ml

3. Reaktionsgefäße (1 - 1,5 ml), z.B. der Eppendorf AG

4. Waage (Messbereich 40-150 mg)

5. Vortex-Mischer

6. Schüttler

7. Mikrozentrifuge (10000 U.)

8. Gefriergerät (-20°C)

Zur Testdurchführung

1. Mehrkanalpipette, 50-200 μ l

2. Präzisions Pipetten 5, 100 und 1000 μ l

3. Plattenwascher

4. Mikrotiterplatten-Lesegerät (Filter 450 nm)

5. Destilliertes Wasser

Vorsichtsmaßnahmen und Hinweise

1. Nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.

2. Beachten Sie die geltenden Vorsichtsmaßnahmen. Das Produkt verwendet nicht Materialien menschlichen Ursprungs.

3. Alle Reagenzien, Proben sowie die benötigte Anzahl von Vertiefungen sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20°-25° C) gebracht werden.
4. Achtung: Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Zufriedenstellende Leistungskriterien können nur gewährleistet werden, wenn die Komponenten der gleichen Calprest-Lot benutzt werden.
5. Unbenutzte Mikrotiterwells sollten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel wieder verschlossen und bei 2-8°C gelagert werden.
6. Ein Verbleib von Resten der Waschlösung in den Vertiefungen kann fehlerhafte Calprotectin-Messergebnisse verursachen. Bei Verwendung eines Waschautomaten sollte dieser regelmäßig gewartet und überprüft werden.
7. Das Substrat sollte eine blassgelbe Färbung aufweisen. Da es sehr lichtempfindlich ist, bitte an einem dunklen Ort aufbewahren. Vor Gebrauch schütteln.
8. TMB Substratlösung reizt die Haut und die Schleimhäute. Bei Berührung, spülen Sie die Augen mit viel Wasser aus und waschen Sie die Haut mit Seife und viel Wasser. Waschen Sie verunreinigte Kleidung bevor man sie auszieht. Das Produkt nicht in die Kanalisation entsorgen. Substratlösung in der Dunkelheit aufbewahren.
9. Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Obwohl verdünnt, kann es zu Verätzungen führen und es muss deshalb mit Handschuhen, Schutzbrille und Kittel gearbeitet werden. Bei Berührung, gründlich mit Wasser abspülen. Beachten Sie die gleichen Vorsichtsmaßnahmen auch bei der Extraktionslösung.
10. Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Substrats und der Waschlösung, enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
11. Im Falle einer externen Beschädigung der Verpackung, stellen Sie sicher, dass alle Komponenten der Packung ("Kit-inhalt") vorhanden und unbeschädigt sind. Wenn Flüssigkeiten bei den Fläschchen ausgetreten ist, sollte der Kit nicht mehr verwendet werden.

Vorbereitung der Arbeitslösungen

Extraktionspuffer

Ein Teil der konzentrierten Extraktionslösung mit 1.5 Teilen frischem destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 50 ml Extraktionslösung mit 75 ml destilliertes Wasser ergibt 125 ml Arbeitslösung. Gut mischen!

Verdünnungspuffer

Ein Teil der konzentrierten Verdünnungslösung mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen, z.B. 20 ml Verdünnungslösung mit 180 ml destilliertes Wasser ergibt 200 ml Arbeitslösung. Gründlich mischen!

Waschpuffer

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 950 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung und Haltbarkeit des Reagenzien und Arbeitslösungen.

1. Die Reagenzien und Arbeitslösungen, außer der Waschlösung, müssen bei 2-8°C gelagert werden.
2. Das Verfalldatum ist auf dem Etikett jeder Komponente aufgedruckt. Siehe unten die Tabelle Lagerung und Haltbarkeit geöffneter Komponenten.
3. Der Kontakt mit hohen Temperaturen, direkte Sonneneinstrahlung und hohe Feuchtigkeit ist zu vermeiden.
4. Die unbenutzten Mikrotiter Streifen sollten luftdicht in dem Plastikbeutel zusammen mit dem Trockenmittel wiederverschlossen und bei 2-8°C gelagert werden.

Lagerung und Haltbarkeit geöffneter Komponenten

Komponente	Lagerung bei	Haltbarkeit
Enzym Konjugat	2-8°C	30 Tage
Substratlösung	2-8°C	90 Tage
Standards	2-8°C	30 Tage
Kontrollen	2-8°C	30 Tage

Das Substrat ist lichtempfindlich. Bitte an einem dunklen Ort aufbewahren und vor Gebrauch schütteln.

Haltbarkeit der Arbeitslösungen

Komponente	Lagerung bei	Haltbarkeit
Waschpuffer	20-25°C	30 Tage
Extraktionspuffer	2-8°C	90 Tage
Verdünnungspuffer	2-8°C	30 Tage

Probensammlung

Zufällige Stuhl Sammlung. Nicht fester Stuhl oder flüssige Stuhlproben sind zulässig, da die Normalisierung des Stuhlgewichts Teil der Berechnung des Ergebnisses ist. Die Sammlung von Stuhlproben von Windeln sollte vermieden werden, außer wenn die vorliegende Probe von einem Teil des Stuhls genommen werden kann, die nicht in Kontakt mit dem Windelmaterial gekommen ist.

Probenanforderungen

1-5 g Stuhl in einem verschraubbaren, sauberen Fläschchen. Keine Konservierungsmittel erforderlich oder angezeigt.

Probentransport

Stuhlprobe sollte durch das Labor innerhalb von 10 Tagen empfangen und extrahiert werden. Die Temperatur während des Transportes sollte 30°C nicht überschreiten.

Probenlagerung

Stuhlproben im Labor sollten bei 2-8°C gelagert werden (bis zu 4 Tagen vor der Testung). Wenn es nicht sofort getestet werden kann, die gesammelten Proben bei -20°C einfrieren.

Testdurchführung

Probenvorbereitung

Stuhlproben auftauen und auf Raumtemperatur bringen. Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien Raumtemperatur (20-25°C) haben.

Die Stuhlpräparation kann entweder manuell oder mit dem EasyCal Probenentnahmeröhrchen erfolgen.

A. EasyCal Probenaufarbeitung:

1. Für die Probenentnahme/Aufarbeitung lesen Sie bitte die Arbeitsanleitung EasyCal cat. 9062.
2. Nach der Probenextraktion kann der Stuhlextrakt entweder manuell pipettiert werden oder das Röhrchen kann ohne Deckel direkt in einen ELISA Automaten gestellt werden.

B. Manuelle Probenaufarbeitung:

1. Ein leeres Schraubverschlussröhrchen zusammen mit einer Einweg-Impföse wiegen (Tara).
2. Mit der Impföse etwa 100 mg (Bereich 80 - 120 mg) gut durchmischten Stuhl entnehmen und in das zuvor gewogene Schraubverschlussröhrchen geben.
3. Das Schraubverschlussröhrchen (einschließlich Impföse und Stuhlprobe) erneut wiegen und das Nettogewicht der Stuhlprobe (zwischen 80 und 120 mg) berechnen.
4. Den Stiel der Impföse abbrechen und den unteren Teil mit der Stuhlprobe und 4-6 cm des Stiels im Röhrchen belassen.
5. Den vorverdünnten Extraktionspuffer (Verhältnis Gewicht/Menge 1:50) hinzufügen z.B.: 100 mg Stuhl + 4,9 ml verdünnte Extraktionslösung, wie in der Tabelle unten beschrieben. Das Röhrchen verschließen.

Stuhl (mg)	Extraktionslösung (ml)	Stuhl (mg)	Extraktionslösung (ml)
120	5.9	100	4.9
115	5.6	95	4.7
110	5.4	90	4.4
105	5.2	85	4.2
		80	3.9

6. Für 30 Sek. kräftig im Vortex-Mischer schütteln/mischen.
7. Auf einem Schüttler oder Roller für 25 ± 5 Minuten homogenisieren. Die Impföse oder der Holzstab dient im Inneren des Röhrchens als Rührer/Quirler.

- Das Homogenat (1 ml) in ein Eppendorf-Röhrchen übertragen und 20 Minuten bei 10000 g bei Raumtemperatur (RT) mit einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- 0.5 ml des hellen Überstandes in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführen. Vermeiden Sie den Kontakt mit dem Pellet, da Aggregate und Partikel fehlerhafte Calprotectin Werte verursachen können.
- Der Überstand soll sofort analysiert werden oder bei -20°C eingefroren und für maximal 3 Monate gelagert werden.

ELISA Testdurchführung

- Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien Raumtemperatur (20-25°C) haben.
- Die eingefrorenen Proben auftauen und auf Raumtemperatur bringen.
- Verdünnung der Proben 1: 400 in zwei zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Im ersten Schritt, 5 µl der extrahierten Probe in 995 µl Verdünnungspuffer (1: 200) verdünnen. Dann 500 µl der ersten Verdünnung durch Zugabe von 500 µl Verdünnungspuffer (1: 2) weiterverdünnen.
- Nachfolgend ist ein Beispiel der Plattenbelegung. Die erforderliche Anzahl an Streifen in den Träger einsetzen. Wenn der Plattenwascher eine vollständige Platte verlangt, zum Ergänzen der Platte Streifen mit nicht beschichteten Vertiefungen verwenden. Die Standards und Kontrollen müssen in jedem Ansatz pipettiert werden.

	1	2	3	4	5	6
A	Cal 1	Cal 5	Probe	Probe	Probe	
B	Cal 1	Cal 5	Probe	Probe	Probe	
C	Cal 2	Cal 6	Probe	Probe		
D	Cal 2	Cal 6	Probe	Probe		
E	Cal 3	Ctr. 1	Probe	Probe		
F	Cal 3	Ctr. 1	Probe	Probe		
G	Cal 4	Ctr. 2	Probe	Probe		
H	Cal 4	Ctr. 2	Probe	Probe		

- Je 100 µl Standards in Doppelbestimmung (A1-B1, C1-D1, ...) in die entsprechende Vertiefung geben.
- Je 100 µl Kontrollen in Doppelbestimmung (E2-F2, G2-H2) in die entsprechende Vertiefung geben.
- Die verdünnten Proben gründlich mischen, anschließend 100 µl (A3, B3, C3, D3, ...) in die entsprechende Vertiefung geben.
- Die Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
- Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütteln. Vertiefungen 3mal mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklappen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
- 100 µl Enzym Konjugat in jede Vertiefung geben.
- Die Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Den Waschschrift wie unter Punkt 9 beschrieben wiederholen.
- 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung geben.
- Achtung:** Die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen um Schwankungen in der Einwirkzeit der Substratlösung zu vermeiden. Schaumbildung während des Pipettieren ist zu vermeiden.
- Die Platte für etwa 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung geben.
- O.D. Werte mit Hilfe eines ELISA-Lesegerät bei 450 nm ablesen. Der OD-Wert von Kalibrator 6 muss höher sein als 1,4 OD. Es ist möglich, die Entwicklung der Farbe zu überwachen, indem die OD-Werte bei 620 nm abgelesen werden. Werte um 0,6 OD bei 620 nm entsprechen 1,8-2,0 bei 450 nm.
- Nach Zugabe der Stopplösung, kann die Platte bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt werden.

Kalibrierung und Qualitätskontrolle

- In jedem Testansatz muss eine neue Standardkurve benutzt werden.
- Die O.D.-Wert von Kalibrator S1 sollte < 0.20 OD sein.
- In jedem Testansatz sollten die Kontrollen mitgeführt werden.

Angegebener Bereich

1.355 - 150 ng/ml (27.1 - 3000 mg/kg).

Ergebnisermittlung

Berechnung der Ergebnisse wird mittels Logit-log 4 Parameter durchgeführt. Zeichnen Sie die Kalibrationkurve mit der tatsächlichen Calprotectin Konzentration der Kalibratoren in ng / ml und die entsprechenden mittleren OD-Werte auf einem x-y-System. Wenn das Datenverarbeitungssystem eine logarithmischen Skala in der X-Achse (Konzentration) verwendet, sollte der Kalibrator 0 Wert > 0 (z.B. 0,001) eingegeben werden. Die Messwerte der Proben aus der Kalibrator-Kurve werden für die Verdünnung korrigiert und umgewandelt in mg / kg durch Multiplikation mit 20 (z.B.: ein Ergebnis von 20 ng/ml wird 400 mg/kg). Wenn Proben weiter verdünnt werden, muss dies bei der Berechnung kompensiert werden. Konzentrationen können auch mittels eines mit dem ELISA-Lesegerät verknüpften Computers bestimmt werden.

Einschränkungen

1. Falsch-negative Ergebnisse können bei Patienten auftreten, die Granulozytopenie aufgrund von Knochenmarksschwäche haben.
2. Einige Patienten, die Non-Steroid-Anti-Inflammator-Medikamente einnehmen (NSAIDs) werden Erhöhungen in ihren fäkalen Calprotectin-Werten haben.⁽¹⁴⁾
3. Patienten mit IBD schwanken zwischen aktiven (entzündlichen) und inaktiven Phasen der Krankheit. Diese Phasen müssen berücksichtigt werden, wenn der Calprest[®]NG Assay verwendet wird.
4. Die Verwendung von Protonen-Pumpen-Inhibitoren (PPIs), mikroskopische Kolitis und Divertikulitis können auch zu erhöhten Calprotectin- Werten führen. Patienten mit unbehandelter Zöliakie können gelegentlich erhöhten Calprotectin Wert zeigen.⁽¹⁵⁾
5. Sonstige Darmstörungen, darunter auch viele Magen-Darm-Infektionen und Darmkrebs kann zu erhöhten Konzentrationen von Calprotectin führen. Diese Proben werden positiv getestet mit dem Calprest[®]NG Assay. Daher kann eine Diagnose aktiver IBD nicht allein auf der Grundlage eines positiven Ergebnisses mit dem Calprest[®]NG Assay festgestellt werden.
6. Fecal Calprotectin ist ein Indikator von neutrophilen Anwesenheit im Stuhl und ist für IBD nicht spezifisch.

Erwartete Werte

Eine interne Cut-off-Studie wurde durchgeführt, und die Werte sind in der Tabelle unten angegeben:

Calprotectin Konzentration	Interpretation	Follow Up
<50 mg/kg	Normal	Keine
50-120 mg/kg	Grenzwertig	Neuerlicher Test nach 4-6 Wochen
> 120 mg/kg	Abnormal	Wiederholen falls klinisch indiziert

Weitere Auswertungen, einschließlich asymptomatischen Patienten, sowie Patienten mit IBS (um von IBD zu differenzieren) und internationale Studien¹⁰⁻¹³ bestätigen die Angemessenheit solcher Werte.

Klinische Bewertung

Für den Calprest[®]NG Assay umfasste die klinische Studie 273 Proben, davon 130 Patienten mit Morbus Crohn, ulcerierende und intermediäre Colitis und 143 negativen Proben von Reizdarmsyndrom (IBS), wiederkehrende Bauchschmerzen (RAP) und andere Patienten. Die positiven Patientenproben wurden mittels klinischer Befund diagnostiziert und / oder mit der Koloskopie bestätigt. Tabellen 1 und 2 unten zeigen die klinische Leistung des Calprest[®]NG Assay.

Tabelle 1 - Klinische Leistung von Calprest[®]NG Test (mit Calprest[®]NG gemessene grenzwertige Proben wurden als positiv mit einem Cut-off von 50 mg / kg betrachtet).

Grenzwertig gilt als positiv		klinische Diagnose		Total
		Positiv	Negativ	
Calprest [®] NG	Positiv	123	14	137
	Negativ	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensitivität		94.6%	95%C.I. [†] (89.2%- 97.8%)	
Spezifität		90.2%	95%C.I. (84.1%- 94.5%)	
PV*		89.8%	95%C.I. (83.4%- 94.3%)	
NV**		94.9%	95%C.I. (89.7%- 97.9%)	

Tabelle 2 - Klinische Leistung von Calprest®NG Test (mit Calprest®NG gemessene grenzwertige Proben wurden als negativ mit einem Cut-off von 120 mg/kg betrachtet).

Grenzwertig gilt als negativ		klinische Diagnose		Total
		Positiv	Negativ	
Calprest®NG	Positiv	108	3	111
	Negativ	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensitivität		83.1%	(95% C.I. 75.5% - 89.1%)	
Spezifität		97.9%	(95% C.I. 94.0% - 99.6%)	
PV*		97.3%	(95% C.I. 92.3% - 99.4%)	
NV**		86.4%	(95% C.I. 80.2% - 91.3%)	

* PV: positiven Vorhersagewert

** NV: negativen Vorhersagewert

[§] C.I.: Konfidenzintervall

Methodenvergleich

Eine Methoden-Vergleichsstudie wurde durchgeführt, indem Calprest®NG mit einem Vergleichstest, mit 157 klinischen Proben, verglichen wurde. Diese Proben bestehen aus klinisch diagnostizierten Patienten IBD (Krankengeschichte und / oder Biopsie), während die negativen Proben von Patienten mit IBS oder anderen Krankheiten verwendet wurden. Alle Proben wurden mit dem Calprest®NG (y) und dem Referenztest(x) gemäß den entsprechenden Packungsbeilagen getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3, 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 3 - Deming-Regressionsanalyse

	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)
$Y = 0.9232x + 0.1285$	0.9232 (0.8410 ÷ 1.005)	0.1285 (-4.643 ÷ 4.9)

Tabelle 4-Methodenvergleich (Calprotectin grenzwertige Proben wurden als positiv betrachtet mit einem Cut-off von 50 mg/kg).

Grenzwertig gilt als positiv		Vergleichstest		Total
		Positiv	Negativ	
Calprest®NG	Positiv	113	0	113
	Negativ	4	40	44
	Total	117	40	157
Positive Übereinstimmung		96.6%	(95% C.I. 91.5% - 98.7%)	
Negative Übereinstimmung		100.0%	(95% C.I. 91.2% - 100.0%)	
Gesamtübereinstimmung		97.5%	(95% C.I. 93.9% - 99.0%)	

Tabelle 5-Methodenvergleich (Calprotectin grenzwertige Proben wurden als negativ betrachtet mit einem Cut-off von 120 mg/kg).

Grenzwertig gilt als negativ		Vergleichstest		Total
		Positiv	Negativ	
Calprest®NG	Positiv	73	3	76
	Negativ	3	78	81
	Total	76	81	157
Positive Übereinstimmung		96.1%	(95% C.I. 89.0% - 98.6%)	
Negative Übereinstimmung		96.3%	(95% C.I. 89.7% - 98.7%)	
Gesamtübereinstimmung		96.2%	(95% C.I. 91.9% - 98.2%)	

Leistungsmerkmale

Matrix und wässrige Linearität

Drei (3) hoch positive extrahierte Stuhlproben, drei (3) mit geringer Konzentration extrahierte Stuhlproben (Matrix Linearität) oder ein Calprotectin Referenzmaterial für Calprotectin Kit (wässrige Linearität) wurden in der Studie verwendet. Die drei (3) hoch positiven extrahierten Stuhlproben wurden gesammelt (H) und verdünnt mit einem Pool der drei niedrig konzentriert extrahierten Stuhlproben (L). Die Ergebnisse der Beurteilung der Linearitätsbereiche zeigen, dass Calprest®NG sowohl akzeptable Linearität als auch Genauigkeit 25,2-3066 mg/kg für Matrix und 27,8-2889,3 mg/kg für wässrige Linearität.

Matrix Linearität					
	Messbereich (mg/kg)	Slope (95% K.I.)	Y-intercept (95% K.I.)	R ²	Wiederfindungsrate % (Erhalten/Theoretische)
1	25.2 ÷ 3066	1.014 (0.9868 ÷ 1.041)	9.279 (-26.54 ÷ 45.10)	0.994	86.9 ÷ 112.8
Wässrige Linearität					
	Messbereich (mg/kg)	Slope (95% K.I.)	Y-intercept (95% K.I.)	R ²	Wiederfindungsrate % (Erhalten/Theoretische)
1	27.8 ÷ 2889.3	1.0322 (1.006 ÷ 1.0574)	-5.7463 (-36.40 ÷ 24.91)	0.999	93.0 ÷ 118.7

Grenzen des Blanks, Messung und Quantifizierung

LoB, LoD und LoQ Studien wurden nach EP17-A durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Kriterien	Wert (ng/ml)	Konzentration (mg/kg)
LoB	0.87	17.50
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.10

Genauigkeit/Wiederfindung

Die Studie wurde durch Testen von sieben (7) verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Jede extrahierte Stuhlprobe wurde mit einer konstanten Menge / Volumen von Calprotectin gespiked oder mit einem gleichen Volumen an Probenverdünnungsmittel für Volumen Anpassungen verdünnt. Jede Probe wurde dreifach getestet. Die Daten werden in der Tabelle unten gezeigt.

Calprotectin Wiederfindungs Daten								
Probe		1	2	3	4	5	6	7
Grundlinie	mg/kg	9.3	51.7	162.7	307.7	458.3	1204.0	1975.2
Spike Wert	mg/kg	32.3	32.3	32.3	115.0	115.0	115.0	115.0
Theoretische (Base + Spike)	mg/kg	41.7	84.0	195.0	422.7	573.3	1319.0	2090.2
Erhalten (Base + Spike)	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1397.7	2343.8
Wiederfindung	%	101.6	94.8	102.9	100.6	103.3	106.0	112.1

Reproduzierbarkeit der Stuhlentnahme

Um die Entnahme zu Entnahme Reproduzierbarkeit zu bestimmen, wurden vier (4) Proben (2 Positive, 1 um den Cut-off und 1 Negative Probe) jedesmal 10 mal entnommen, und jede entnommene Probe wurde in Doppelbestimmung getestet. Die Resultate sind darunter dargestellt.

Entnommene Stuhlproben	1	2	3	4
Mittelwert (mg/kg)	29.6	52.7	227.0	1973.3
SD	4.3	5.8	15.5	117.3
CV%	14.6	11.1	6.8	5.9

Single-Site Präzision Evaluierungsstudie

Die Studie wurde durchgeführt durch die Entnahme von sieben (7) unterschiedlichen Stuhlproben (sechs (6) waren positiv und einer (1) war im Cut-off Bereich) und jede Entnahme wurde in zwei (2) Wiederholungen, während zwei separaten (2) Läufen pro Tag, für zehn (10) Tage, durch drei unterschiedliche (3) ausführende Personen, gemessen. Die CV% Werte sollten gleich oder weniger als 20% sein. Die Daten werden in der folgenden Tabelle dargestellt:

Single-Site Präzision Evaluierungsstudie: Resultate													
ID#	N	Mittelwert (mg/kg)		Innerhalb des Testlaufs		Zwischen den Testläufen		Zwischen den Tagen		Zwischen den ausführenden Personen		Total	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
1	120	170.88	3.40	2.0%	6.77	4.0%	5.51	3.2%	0.80	0.5%	9.40	5.5%	
2	120	741.60	17.38	2.3%	43.12	5.8%	55.37	7.5%	0.00	0.0%	72.30	9.7%	
3	120	248.74	6.44	2.6%	11.98	4.8%	12.21	4.9%	0.00	0.0%	18.28	7.3%	
4	120	42.60	1.28	3.0%	4.30	10.1%	0.00	0.0%	0.55	1.3%	4.52	10.6%	
5	120	1193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%	
6	120	1006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%	
7	120	2267.29	223.08	9.8%	83.22	3.7%	155.52	6.9%	58.33	2.6%	290.31	12.8%	

Multizentrische Präzision Evaluierungsstudie

Die Studie wurde durchgeführt in drei (3) Zentren durch das Testen von acht (8) unterschiedlichen entnommenen Stuhlproben (sechs (6) waren positiv, einer (1) im Cut-off Bereich off und einer (1) war negativ). Jedes Zentrum hat jede Stuhlprobe in fünf (5) Wiederholungen über fünf (5) Tagen gemessen. Die CV% Werte sollten gleich oder weniger als 20% sein.

Probe	N	Mittelwert (mg/kg)		Wiederholgenauigkeit		Präzision innerhalb eines Zentrums		Reproduzierbarkeit	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%	
B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%	
C	75	1180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%	
D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%	
E	75	1629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%	
F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%	
G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%	
H	75	2152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%	

Probe	Wiederholgenauigkeit 95% CIs		Präzision 95% CIs		Reproduzierbarkeit 95% CIs	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	11.39 ÷ 16.35	2.6% ÷ 3.8%	46.39 ÷ 103.09	10.7% ÷ 23.8%	47.26 ÷ 101.80	10.9% ÷ 23.5%
B	3.13 ÷ 4.49	8.6% ÷ 12.3%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%
C	60.33 ÷ 86.54	5.1% ÷ 7.3%	118.0 ÷ 230.93	10.0% ÷ 19.6%	119.47 ÷ 225.50	10.1% ÷ 19.1%
D	30.45 ÷ 43.68	4.5% ÷ 6.4%	40.42 ÷ 64.14	5.9% ÷ 9.4%	49.28 ÷ 193.64	7.2% ÷ 28.4%
E	81.72 ÷ 117.23	5.0% ÷ 7.2%	162.28 ÷ 317.59	10.0% ÷ 19.5%	168.95 ÷ 345.24	10.4% ÷ 21.2%
F	3.56 ÷ 5.10	5.7% ÷ 8.2%	4.63 ÷ 7.22	7.5% ÷ 11.6%	5.42 ÷ 21.29	8.7% ÷ 34.3%
G	10.19 ÷ 14.61	2.9% ÷ 4.1%	22.56 ÷ 45.07	6.3% ÷ 12.6%	31.11 ÷ 149.23	8.7% ÷ 41.8%
H	147.32 ÷ 211.32	6.8% ÷ 9.8%	240.6 ÷ 428.66	11.2% ÷ 19.9%	242.64 ÷ 437.93	11.3% ÷ 20.3%

Calprest®NG
96 test, Artikel Nr: 9069



Herstellungsdatum:
2019.11.29
Rev. 2

ETS9069

Eurospital 

The Eurospital logo features the company name in a bold, blue, sans-serif font. To the right of the text is a graphic consisting of several curved, overlapping lines in shades of blue and green, suggesting a stylized wave or a modern architectural element.

Hersteller:
Eurospital SpA
Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Phone: +39 040 8997.1 Fax: +39 040 280944
info@eurospital.it www.eurospital.com

Calprest® NG

Para diagnóstico *in vitro*.

Indicaciones

Calprest® NG es un ensayo ELISA cuantitativo para la detección de la concentración de calprotectina fecal. Calprest® NG se puede utilizar como un diagnóstico *in vitro* para ayudar en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, y para diferenciar la EII del Síndrome del Intestino Irritable (SII) en conjunción con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Resumen y explicación

La calprotectina^{1,2} es una proteína de unión a calcio y zinc producida por las células polimorfonucleares (PMNs), monocitos y células epiteliales escamosas, excepto los de la piel normal. Después de la unión del calcio que puede resistir a la degradación por enzimas y acción bacteriana Al competir con diferentes enzimas para cantidades locales limitadas de zinc, la calprotectina puede inhibir muchas enzimas dependientes de zinc y por lo tanto eliminar microorganismos o células animales y humanas en cultivo. La calprotectina se puede detectar incluso en pequeñas cantidades de muestra (menos de un gramo) al azar. Además, las enfermedades orgánicas del intestino dan una señal de calprotectina fecal fuerte, es decir, las elevaciones son a menudo cinco a varios miles de veces la de referencia superior en individuos sanos que indican la inflamación intestinal.^{6,9} Los pacientes con trastornos abdominales orgánicas o funcionales pueden tener síntomas similares, y el examen clínico por sí solo puede no ser suficiente para dar un diagnóstico específico. Además, el análisis de calprotectina ha demostrado ser un marcador de la enfermedad inflamatoria intestinal en niños y pacientes adultos.¹⁰⁻¹³

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), es decir, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, puede aparecer desde la infancia hasta la edad adulta tardía, y el diagnóstico a menudo se retrasa debido a los síntomas vagos o renuencia a realizar endoscopia y biopsia.

Principio

Calprest® NG es un ensayo inmunoenzimático con detección colorimétrica basada en el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales contra la calprotectina. La calprotectina presente en la muestra diluida se une al anticuerpo adsorbido a la superficie del plástico también. El anticuerpo enzima-conjugado se une al antígeno capturado y, posteriormente, la enzima cataliza la conversión del sustrato en un producto coloreado. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de conjugado unido, y por lo tanto a la cantidad de calprotectina capturado. La concentración de calprotectina en las muestras se calcula según los calibradores proporcionados.

Material suministrado

(cantidad suficiente para 96 ensayos)

Pocillos con anticuerpos	12x8
Tapa para microplaca	1
Conjugado (IgG, conejo)	1x15 ml
Substrato	1x15 ml
Solución de parada	1x15 ml
Solución de lavado 20x	1x50 ml
Diluyente (10x)	1x20 ml
Solución de extracción (2.5x)	2x50 ml
Calibradores	6x1.5 ml
Control 1	1x1.5 ml
Control 2	1x1.5 ml

Composición de los materiales/reactivos suministrados

1. Pocillos con anticuerpos

12 tiras de 8 pocillos cada una, recubiertos con anticuerpos anti-calprotectina. Vienen selladas en una bolsa de plástico que contiene un desecante.

2. Conjugado (IgG)

1 frasco con 15 ml de anticuerpos IgG anti-calprotectina humana (ratón), marcados con peroxidasa de rábano, y coloreado de violeta. El conjugado está listo para usar.

3. Substrato

1 frasco con 15 ml de reactivo substrato, con azida sódica como conservante. El substrato está listo para usar.

4. Solución de parada

1 frasco con 15 ml de H_2SO_4 (0.5M). Listo para usar

5. Solución de lavado (20x)

1 frasco con 50 ml de solución de lavado concentrada (20x) con detergentes. Dilúyase con agua destilada.

6. Diluyente (10x)

Un frasco con 20 ml de solución concentrada (10x) y coloreada de azul. Dilúyase con agua destilada.

7. Solución de extracción (2.5x)

2 frascos con 50 ml de solución tampón concentrada (2.5x). Dilúyase con agua destilada.

8. Calibradores

6 viales con 1.5 ml de Calprotectina, en 6 concentraciones conocidas (0, 2.5, 12.5, 25, 50 y 150 ng/ml). El valor de cada calibrador viene impreso en su etiqueta. Los calibradores están listos para usar.

9. Control 1

1 vial con 1.5 ml de control listo para usar. No diluir. El rango de los valores viene impreso en la etiqueta correspondiente.

10. Control 2

1 vial con 1.5 ml de control listo para usar. No diluir. El rango de los valores viene impreso en la etiqueta correspondiente.

Materiales necesarios pero no suministrados

Para la toma de muestras de heces

1. Probetas de recoger muestras
2. Recipiente de transporte

Para la preparación de las heces

1. Disposable, breakable sterile inoculation loops or wooden stick
2. Probetas con tapón de rosca de 14 ml aproximadamente
3. Tubos Eppendorf (1 ÷ 1.5 ml)
4. Balanza de laboratorio (rango de medición 40 ÷ 150 mg)
5. Mezclador Vórtex
6. Agitador
7. Microcentrífuga (10000g)
8. Congelador (-20°C)

Instrumentación para la prueba ELISA

1. Pipeta multicanal, 50-200 μ l
2. Precision pipettes 5, 100 and 1000 μ l
3. Lavador para placas
4. Lector de placas (filtro de 450 nm)
5. Agua destilada

Medidas de precaución

1. Para diagnóstico in vitro.
2. Siga las precauciones generales de laboratorio. Este producto no incluye materiales de origen humano
3. Antes de empezar el ensayo, aguarde hasta que los reactivos, las muestras y los pocillos lleguen a temperatura ambiente (20-25° C).
4. **iCuidado!**: es sumamente importante no mezclar componentes de lotes diferentes. Eurospital garantiza resultados satisfactorios exclusivamente si se usan componentes del mismo lote de Calprest.
5. Vuelva a guardar las tiras sin usar en el recipiente y séllelas junto al desecante. Consérvelas a una temperatura de 2-8°C.
6. El lavado insuficiente de las placas puede generar errores, en la detección de la concentración de Calprotectina, si la solución de lavado no se ha eliminado por completo. Por consiguiente, asegúrese que el lavador que usa sea completamente eficiente o bien golpee la placa al revés contra un papel absorbente.
7. El sustrato tiene que ser de color amarillo pálido y es sensible a la luz. Consérvese en la oscuridad y agítese antes de usar.
8. La solución de sustrato TMB es irritante a la piel y las mucosas. En caso de contacto, limpie los ojos con gran cantidad de agua y lave la piel con jabón y mucha agua. Limpie la ropa contaminada antes de su uso. No descarte el producto en la pica. Almacénelo en la oscuridad.
9. La solución de Stop contiene ácido sulfúrico. Aunque está muy diluido, puede causar quemaduras y han que manejarlo con guantes, gafas y bata de laboratorio. En caso de contacto, limpie abundantemente con agua. Use las mismas precauciones al manipular la solución de extracción.
10. Todos los reactivos, excepto el sustrato y la solución de lavado concentrada, contienen Proclin 300 como conservante..Se puede producir una reacción alérgica.
11. En caso de daño externo del kit, asegúrese que todos los componentes listados en "Material suministrado" están intactos. En presencia de pérdida de líquido en los viales, el kit no debe ser usado.

Preparación de las soluciones de trabajo

Tampón de extracción

Diluya 50 ml de solución de extracción concentrada en 75 ml de agua destilada. De esta manera, obtendrá 125 ml de solución de trabajo. Mezclar bien.

Tampón diluyente

Diluya 20 ml de solución diluyente concentrado en 180 ml de agua destilada. De esta manera, obtendrá 200 ml de solución de trabajo.

Solución de lavado

Prepare la solución de lavado, diluyendo todo el contenido del frasco (50 ml) en 950 ml de agua destilada, hasta obtener un volumen final de 1000 ml.

Conservación y estabilidad de reactivos y soluciones de trabajo

1. Todos los reactivos y soluciones de trabajo, con la excepción de la solución de lavado, se conservarán a 2-8°C.
2. La fecha de caducidad de cada componente se encuentra impresa en la etiqueta del frasco. Observe la figura para conocer la estabilidad tras apertura.
3. No exponga los componentes a las altas temperaturas, a la luz solar directa, ni a condiciones de humedad extremadamente elevada.
4. Conserve las tiras no utilizadas a 2-8°C en su recipiente de aluminio, bien cerrado, con el desecante

Estabilidad de los reactivos tras la apertura

Reactivo	Consérvese a	Tiempo
Conjugado	2-8°C	30 días
Sustrato	2-8°C	90 días
Estandar	2-8°C	30 días
Controles	2-8°C	30 días

El sustrato es sensible a la luz. Consérvese en la oscuridad y agítese antes de usar.

Estabilidad de las soluciones de trabajo

Reactivo	Consérvase a	Tiempo
Solución de lavado	20-25°C	30 días
Solución de extracción	2-8°C	90 días
Solución diluyente	2-8°C	30 días

Recogida de las muestras de heces

Las muestras de heces líquidas o pastosas se aceptan como válidas para la recogida de muestra y cálculo de resultados. Las muestras recogidas en pañal deberían evitarse o como mínimo recoger la muestra en la zona sin contacto con el pañal.

Requisitos de las muestras

1 ÷ 5 g de heces en una probeta nueva. No preservative is necessary or indicated.

Estabilidad durante el transporte

Las muestras de heces se enviarán y serán extraídas en el laboratorio en un plazo de 10 días. La temperatura durante el transporte nunca ha de superar los 30°C

Conservación de las muestras

Las muestras de heces deben conservarse en el laboratorio a 2-8°C para un máximo de 4 días antes del ensayo. Si no se analizan inmediatamente, conserve las muestras de material fecal a -20°C.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Descongele las muestras de heces a temperatura ambiente y espere hasta que todos los reactivos lleguen a temperatura ambiente.

Existen dos métodos alternativos de preparación de muestras de heces, el manual y el uso del dispositivo de extracción de heces EasyCal. Los usuarios pueden elegir su método de preparación de muestra preferido.

A. Preparación de muestras EasyCal

1. Para el procedimiento de recolección / extracción, consulte las instrucciones de EasyCal cat. 9062
2. Después del procedimiento de extracción, el extracto fecal está listo para analizarse de forma manual o automática colocando el tubo EasyCal (sin separado y stick) directamente en la instrumentación de ELISA.

B. Preparación manual de muestras

1. Pese (tare) una probeta vacía y la aguja de inoculación o un aplicador de madera.
2. Mezcle bien las heces y recoja alrededor de 100 mg (rango 80 ÷ 120 mg) de materia fecal mediante la aguja o aplicador de madera e introdúzcala en una probeta con tapón de rosca.
3. Pese la probeta (con la aguja o el aplicador de madera y la muestra) y calcule el peso neto de las heces (entre 80 ÷ 120 mg).
4. Rompa el mango de la aguja. Deje la parte inferior con las heces y 4-6 cm del mango, en el interior de la probeta.
5. Añada la solución de extracción diluida (relación peso/ volumen 1:50). Por ejemplo: 100 mg de heces + 4.9 ml de solución de extracción diluida (para más información, véase la tabla siguiente. Cierre la probeta.

Heces (mg)	Solución de Extracción (ml)	Heces (mg)	Solución de Extracción (ml)
120	5.9	100	4.9
115	5.6	95	4.7
110	5.4	90	4.4
105	5.2	85	4.2
		80	3.9

6. Agite/mezcle vigorosamente con el Vórtex durante 30 segundos.
7. Proceda a homogeneizar, durante 25 ± 5 minutos con un agitador. La aguja o el aplicador de madera que se encuentra en el

interior de la probeta hará de agitador.

- Transfiera el material homogeneizado (1 ml) a un tubo Eppendorf y centrifugue, durante 20 minutos a 10.000 g, a temperatura ambiente, por medio de una centrifuga de sobremesa.
- Transfiera 0.5 ml del sobrenadante de color claro a un tubo Eppendorf nuevo. Evite el contacto con el pellet ya que puede resultar en valores de calprotectina erróneos.
- El extracto se puede analizar inmediatamente, o bien, se puede congelar a -20°C . En este caso, se puede conservar 3 meses, como máximo.

Realización de la prueba ELISA

- Asegúrese que todos los reactivos estén a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$).
- Descongele las muestras congeladas y espere hasta que lleguen a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$).
- Diluya las muestras 1:400 usando dos pasos consecutivos. En el primer paso, diluya $5\ \mu\text{l}$ de la muestra extraída en $995\ \mu\text{l}$ del diluyente (1:200). A continuación, aspire $500\ \mu\text{l}$ de la primera dilución y vuelva a diluir añadiendo $500\ \mu\text{l}$ del diluyente.
- A continuación, se aprecia un ejemplo de placa. Coloque el número indicado de tiras en el soporte. Utilice tiras con pocillos no tapizados, a efectos de completar la placa, si el lavador requiere una placa entera. El Blanco, los Estándares y los Controles se han de introducir en cada serie.

	1	2	3	4	5	6
A	Cal 1	Cal 5	Mue	Mue	Mue	
B	Cal 1	Cal 5	Mue	Mue	Mue	
C	Cal 2	Cal 6	Mue	Mue		
D	Cal 2	Cal 6	Mue	Mue		
E	Cal 3	Ctr. 1	Mue	Mue		
F	Cal 3	Ctr. 1	Mue	Mue		
G	Cal 4	Ctr. 2	Mue	Mue		
H	Cal 4	Ctr. 2	Mue	Mue		

- Coloque $100\ \mu\text{l}$ de cada estándar por duplicado (A1-B1, C1-D1,).
- Coloque $100\ \mu\text{l}$ de cada control por duplicado (E2-F2, G2-H2).
- Mezcle bien las muestras diluidas, antes de colocarlas en los pocillos. Coloque $100\ \mu\text{l}$ de cada muestra en los pocillos siguientes (A3, B3, C3, D3,).
- Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Al final de la incubación lave los pocillos colocando 0.3 ml de solución de lavado diluida en cada pocillo. Elimine todo el líquido de los pocillos. Repita el procedimiento otras 2 veces, para realizar 3 ciclos de lavado en total. Efectúe la aspiración final. A continuación, ponga la placa boca abajo colóquela sobre un trozo de papel de filtro. Dé un golpecito en la placa, con delicadeza, para eliminar todos los restos de líquido.
- Coloque $100\ \mu\text{l}$ de conjugado en cada pocillo.
- Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Repita los lavados tal como se ha descrito en el punto 9.
- Coloque $100\ \mu\text{l}$ de sustrato en cada pocillo.
Nota: a fin de evitar que el desarrollo del sustrato varíe a lo largo del tiempo, se recomienda el uso de una pipeta multicanal. Evite la formación de burbujas durante el pipeteo del sustrato
- Incube a temperatura ambiente durante unos 15 minutos en la oscuridad, o bien tapando la placa con una hoja de aluminio.
- Coloque $100\ \mu\text{l}$ de solución de parada en cada pocillo.
- Lea el valor de Densidad Óptica (D.O.) por medio del lector de ELISA a 450 nm. El valor de D.O. del Calibrador 6 debe ser más alto que 1.4. Es posible monitorizar el desarrollo de color mediante la lectura de absorbancia a valores de 620nm. Los valores de 0.6 OD a 620nm corresponden a 1.8 - 2.0 a 450 nm.

17. Tras la adición de la solución de parada, las placas se pueden mantener a 4°C durante 24 horas.

Calibración y control de calidad

1. En cada ensayo se necesita utilizar una nueva curva estándar.
2. El valor de D.O. del calibrador S1 debería ser inferior a 0.20 D.O.
3. Introduzca el Control 1 y el Control 2 en cada ensayo.

Rango de determinación

1.355 - 150 ng/ml (27.1 - 3000 mg/kg).

Cálculo de los resultados

El cálculo de los resultados se hace para una curva de calibración logit-log 4 parámetros, poniendo los valores medios de la concentración de calprotectina contenida en cada estándar en ng/ml y el valor promedio correspondiente de D.O. en un sistema X-Y. La lectura de las muestras de la curva estándar se corrige tomando en consideración el factor de dilución y se convierte en mg/kg multiplicando el valor que se obtuvo en la curva estándar por 20 (por ejemplo: una lectura de 20 ng/ml se transforma en 400 mg/kg). Si la muestra se diluyó más de una vez, dicho factor se tomará en consideración, para calcular la concentración. Además, las concentraciones se pueden determinar conectando el lector ELISA con un PC.

Limitaciones

1. Es posible la obtención de resultados falsos negativos en pacientes con granulocitopenia debido a inmunosupresión
2. Algunos pacientes que tomen AINEs tendrán niveles elevados de calprotectina fecal⁽¹⁴⁾
3. Los pacientes con IBD pueden fluctuar entre un estado activo (inflamatorio) e inactivo de la enfermedad. Hay que tener en consideración estos estados al utilizar Calprest[®]NG.
4. El uso de inhibidores de la bomba de protones (PPIs), colitis microscópica y divertículos puede llevar a niveles de calprotectina elevados. Pacientes celíacos podrían mostrar también valores elevados de calprotectina⁽¹⁵⁾
5. Otras afectaciones intestinales, incluyendo infecciones gastrointestinales y cáncer colorectal, pueden resultar en niveles elevados de calprotectina. Serán positivos con el ensayo Calprest[®]NG. Por lo tanto, un diagnóstico de IBD activo no sólo puede estar basado en la determinación de la técnica Calprest[®]NG.
6. La calprotectina fecal es un indicador de la presencia de neutrófilos en las heces y no es específico para IBD.

Valores esperados

Un estudio interno para calcular el valor de corte dio a los valores indicados en la tabla siguiente:

Concentración de Calprotectina	Interpretación	Seguimiento
<50 mg/kg	Normal	Ninguno
50-120 mg/kg	Dudoso	Nuevo determinación después de 4-6 semanas
> 120 mg/kg	Anormal	Repetir según se indique clínicamente

Más estudios en pacientes asintomáticos, así como en pacientes con IBS (para diferenciar de IBD) y estudios internacionales¹⁰⁻¹³ confirman que esos valores son los correctos a utilizar.

Evaluación clínica

Un estudio clínico para el Calprest[®]NG incluyó 273 muestras, de las cuales 130 pacientes afectados por la enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa y 143 muestras negativas de pacientes con Síndrome del Intestino Irritable (SII), dolor abdominal recurrente (DAR) y pacientes con otras enfermedades. Las muestras positivas de pacientes fueron diagnosticadas por medio de hallazgos clínicos y / o confirmados con la colonoscopia. Las Tablas 1 y 2 a continuación demuestran el rendimiento clínico del ensayo Calprest[®]NG.

Tabla 1 - rendimiento clínico de ensayo Calprest®NG (valores de muestra dudosos considerados positivos con un valor de corte de 50 mg/kg).

Valores borderline se consideran Positivos		Diagnostico Clinico		Total
		Positivo	Negativo	
Calprest®NG	Positivo	123	14	137
	Negativo	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensibilidad		94.6%	95%C.I. [§] . (89.2% - 97.8%)	
Specificidad		90.2%	95%C.I. (84.1% - 94.5%)	
VPP*		89.8%	95%C.I. (83.4% - 94.3%)	
VPN**		94.9%	95%C.I. (89.7% - 97.9%)	

Tabla 2 - rendimiento clínico de ensayo Calprest®NG (valores de muestra dudosos considerados negativos con un valor de corte de 120 mg/kg).

Valores borderline se consideran Negativos		Diagnostico Clinico		Total
		Positivo	Negativo	
Calprest®NG	Positivo	108	3	111
	Negativo	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensibilidad		83.1%	(95% C.I. 75.5% - 89.1%)	
Specificidad		97.9%	(95% C.I. 94.0% - 99.6%)	
VPP*		97.3%	(95% C.I. 92.3% - 99.4%)	
VPN**		86.4%	(95% C.I. 80.2% - 91.3%)	

* VPP: Valor Predictivo Positivo

** VPN: Valor Predictivo Negativo

[§] C.I.: Intervalo de confianza

Comparativa de los métodos

Un estudio de comparación de métodos que se realizó para comparar el Calprest®NG a una prueba de referencia usando 157 muestras clínicas. Estas muestras consisten en pacientes con EI diagnosticados clínicamente (historia clínica y / o biopsia) y muestras negativas de pacientes con IBS o otras enfermedades. Todas las muestras se ensayaron con el Calprest®NG (y) y el dispositivo de predicado (x) de acuerdo con sus prospectos correspondientes. Los resultados se resumen en las Tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3 - Deming Regression Analysis

	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)
$Y = 0.9232x + 0.1285$	0.9232 (0.8410 ÷ 1.005)	0.1285 (-4.643 ÷ 4.9)

Tabla 4 - Comparación de los métodos (valores de muestra borderline considerados positivos con un valor de corte de 50 mg/kg).

Valores borderline se consideran Positivos		Test comparativo		Total
		Pos	Neg	
Calprest®NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
	Total	117	40	157
Acuerdo Positivo		96.6%	(95% C.I. 91.5% - 98.7%)	
Acuerdo Negativo		100.0%	(95% C.I. 91.2% - 100.0%)	
Acuerdo Total		97.5%	(95% C.I. 93.9% - 99.0%)	

Tabla 5 - Comparación de los métodos (valores de muestra dudosos considerados negativos con un valor de corte de 120 mg / kg).

Valores dudosos se consideran Negativos		Test comparativo		Total
		Pos	Neg	
Calprest®NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
	Total	76	81	157
Acuerdo Positivo		96.1%	(95% C.I. 89.0% - 98.6%)	
Acuerdo Negativo		96.3%	(95% C.I. 89.7% - 98.7%)	
Acuerdo Total		96.2%	(95% C.I. 91.9% - 98.2%)	

Indicaciones del procedimiento

Linealidad en matriz y acuosas

Tres (3) muestras de heces extraídas con valores altos positivos, tres (3) muestras de heces extraídas de heces con valores bajos (matriz de linealidad) o un material de referencia para el kit de la calprotectina (linealidad acuosa) se analizaron en el estudio. Las tres (3) muestras de heces extraídas con valores altos positivos se agruparon (H) y se diluyeron con el pool de las tres muestras extraídas con concentración baja (L). Los resultados de la evaluación de la linealidad muestran que Calprest®NG tiene linealidad y precisión aceptables en el rango 25.2-3066 mg/kg para la linealidad en matriz y en el rango 27.8-2889.3 mg/kg para la linealidad acuosa.

Linealidad en Matriz					
	Rango del test (mg/kg)	Pendiente (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	Índice de recuperación% (Obtenido / Teórico)
1	25.2 ÷ 3066	1.014 (0.9868 ÷ 1.041)	9.279 (-26.54 ÷ 45.10)	0.994	86.9 ÷ 112.8
Linealidad acuosa					
	Rango del test (mg/kg)	Pendiente (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	Índice de recuperación% (Obtenido / Teórico)
1	27.8 ÷ 2889.3	1.0322 (1.006 ÷ 1.0574)	-5.7463 (-36.40 ÷ 24.91)	0.999	93.0 ÷ 118.7

Limite del blanco, de detección y cuantitación

Los estudios Lob, LoD and LoQ se realizaron en acuerdo a la procedure EP17-A.. Los resultados se resumen en la Tabla siguiente.

Criterio	Valor (ng/ml)	Concentración (mg/kg)
LoB	0.87	17.50
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.10

Precisión/ Recuperación

El estudio se realizó mediante el ensayo de 7 muestras de heces diferentes. Cada muestra de heces extraída fue mezclada con una cantidad/volumen constante de calprotectina con un volumen igual de diluyente de la muestra para compensar los ajustes de volumen. Cada muestra se ensayó por triplicado. Los datos se se resumen en la Tabla siguiente.

Recuperación de la Calprotectina								
Muestra		1	2	3	4	5	6	7
Base	mg/kg	9.3	51.7	162.7	307.7	458.3	1204.0	1975.2
Valores alternos	mg/kg	32.3	32.3	32.3	115.0	115.0	115.0	115.0
Teórico (Base + alterno)	mg/kg	41.7	84.0	195.0	422.7	573.3	1319.0	2090.2
Obtenido (Base + alterno)	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1397.7	2343.8
Recuperación	%	101.6	94.8	102.9	100.6	103.3	106.0	112.1

Reproducibilidad de la extracción:

Con el fin de determinar la reproducibilidad de la extracción, cuatro (4) muestras (2 positivas, 1 dudosa y 1 negativa) fueron extraídas 10 veces y cada muestra fue analizada en duplicado. Los datos se se resumen en la Tabla siguiente:

Muestra de heces extraídas	1	2	3	4
Media (mg/kg)	29.6	52.7	227.0	1973.3
SD	4.3	5.8	15.5	117.3
%CV	14.6	11.1	6.8	5.9

Estudio de evaluación de la precisión en un único laboratorio

El estudio se ha llevado a cabo mediante la extracción de siete (7) diferentes muestras de heces (de seis (6) positivos y uno (1) alrededor del punto de corte) y ensayando cada extracto en dos (2) replicados durante dos ensayos por separado (2) veces por día durante diez (10) días por tres (3) operadores diferentes. Los valores de CV% deben ser iguales e inferiores al 20%. Los datos se presentan en la siguiente tabla:

Estudio de evaluación de la precisión en un único centro de análisis. Resultados:												
Id.	N	Media (mg/kg)	Intra proceso		Inter proceso		Entre días		Entre operadores		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
1	120	170.88	3.40	2.0%	6.77	4.0%	5.51	3.2%	0.80	0.5%	9.40	5.5%
2	120	741.60	17.38	2.3%	43.12	5.8%	55.37	7.5%	0.00	0.0%	72.30	9.7%
3	120	248.74	6.44	2.6%	11.98	4.8%	12.21	4.9%	0.00	0.0%	18.28	7.3%
4	120	42.60	1.28	3.0%	4.30	10.1%	0.00	0.0%	0.55	1.3%	4.52	10.6%
5	120	1193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%
6	120	1006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%
7	120	2267.29	223.08	9.8%	83.22	3.7%	155.52	6.9%	58.33	2.6%	290.31	12.8%

Estudio de evaluación de la precisión en múltiples laboratorios

El estudio se ha llevado a cabo en tres (3) centros ensayando ocho (8) extractos diferentes de muestras de heces (de seis (6) positivos, un (1) valor cercano al punto de corte y un (1) negativo). Cada centro ha probado cada extracto de en (5) replicados durante cinco (5) días. Los valores de CV% deben ser iguales e inferiores al 20%.

Id.	N	Media (mg/kg)	Repetibilidad		Precisión dentro del centro		Riproducibilidad	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%
B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%
C	75	1180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%
D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%
E	75	1629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%
F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%
G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%
H	75	2152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%

Id.	Repetibilidad 95% C.I.		Precisión 95% C.I.		Reproducibilidad 95% C.I.	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	11.39 ÷ 16.35	2.6% ÷ 3.8%	46.39 ÷ 103.09	10.7% ÷ 23.8%	47.26 ÷ 101.80	10.9% ÷ 23.5%
B	3.13 ÷ 4.49	8.6% ÷ 12.3%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%	4.17 ÷ 6.61	11.4% ÷ 18.1%
C	60.33 ÷ 86.54	5.1% ÷ 7.3%	118.0 ÷ 230.93	10.0% ÷ 19.6%	119.47 ÷ 225.50	10.1% ÷ 19.1%
D	30.45 ÷ 43.68	4.5% ÷ 6.4%	40.42 ÷ 64.14	5.9% ÷ 9.4%	49.28 ÷ 193.64	7.2% ÷ 28.4%
E	81.72 ÷ 117.23	5.0% ÷ 7.2%	162.28 ÷ 317.59	10.0% ÷ 19.5%	168.95 ÷ 345.24	10.4% ÷ 21.2%
F	3.56 ÷ 5.10	5.7% ÷ 8.2%	4.63 ÷ 7.22	7.5% ÷ 11.6%	5.42 ÷ 21.29	8.7% ÷ 34.3%
G	10.19 ÷ 14.61	2.9% ÷ 4.1%	22.56 ÷ 45.07	6.3% ÷ 12.6%	31.11 ÷ 149.23	8.7% ÷ 41.8%
H	147.32 ÷ 211.32	6.8% ÷ 9.8%	240.6 ÷ 428.66	11.2% ÷ 19.9%	242.64 ÷ 437.93	11.3% ÷ 20.3%

Calprest®NG
96 test, código: 9069



Date de preparación:

2019.11.29

Rev. 2

ETS9069

Eurospital





















Producto de:
Eurospital SpA
Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Phone: +39 040 8997.1 Fax: +39 040 280944
info@eurospital.it www.eurospital.com

References / Bibliografia / Bibliographie / Literatur / Bibliografia

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Johne, B., et al., Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*, 1997. 50(3): p. 113-23.
3. Roseth, A.G., et al., Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol*, 1992. 27(9): p. 793-8.
4. Roseth, A.G., et al., Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion*, 1997. 58(2): p. 176-80.
5. Røseth A.G. et al.: Correlation between fecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34:50-54.
6. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000;292:41-54.
7. Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2831-2837
8. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000;47:506-513.
9. Beglinger, Fecal calprotectin -- a useful tool in the Beglinger, Fecal calprotectin -- a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly*, 2012. 142: p. w13557.
10. Carroccio A, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from Irritable Bowel Syndrome: A prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003;49:861-867.
11. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:364-8.
12. van Rheenen et al: Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3369
13. Whitehead Ws et al.: Between-assay variability of fecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Ann Clin Biochem* 2012: 1-9
14. Tibble JA et al. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 1999;45:362-366.
15. Montalto M. et al: Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. *Scand J. Gastr.*, 2007; 42: 957-961

Legend / Legenda / Légende / Legende / Leyenda

	Consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consultense las instrucciones de uso		Biological Risks / Biogefährdung / Risques biologiques / Rischio biologico / Riesgos biológicos
	Use by / Verwendbar bis / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Date de péremption		Manufacturer / Hersteller / Fabricant / Fabricante / Fabricante
	European Conformity / Europäische Konformität / Conformité aux normes européennes / Conformità agli standard europei / Conformidad europea		In vitro diagnostic medical device / In-vitro-Diagnostikum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Temperature limitation / Temperaturbegrenzung / Limites de température / Limiti di temperatura / Limitación de temperatura		Sufficient for / Ausreichend für / Suffisant pour / Sufficiente per / Válido para
	Catalogue number / Bestellnummer / Référence du catalogue / Numero di Catalogo / Número de catálogo		Solid phase/ Mikrotiterplatte/ Fase sólida/ Fase solida/ Phase solide/
	Diluent/ Probenverdünnungspuffer/ Diluyente/ Diluente/ Diluant/		Calibrator/ Kalibrator/ Calibrador/ Calibratore/ Calibrateur/
	Controll/ Kontrolle/ Control/ Controllo/ Contrôle/		Substrate/ Substrat/ Substrat/ Sustrato/ Substrat/
	Stop solution/ Stopplösung/ Solución de parada/Soluzione di arresto/ Solution d'arrêt/		Washing solution/ Waschlösung/ Solución de lavado/ Soluzione di lavaggio/ Solution de lavage/
	Conjugate Konjugat/ Conjugado/ Coniugato/ Conjugué/		Extraction solution/ Extraktionpuffer/ Solución de extracción/ Soluzione di estrazione/ Solution d'extraction/