

INTENDED USE

Calprest NG is a quantitative ELISA for detecting concentration of fecal 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 is a 36 kDa heterodimeric complex belonging to the S100 family of proteins that derives from polymorphonuclear cells, monocytes and epithelial cells. It has direct antimicrobial effects and it plays a role within the innate immune response¹⁻². Calprotectin is found in several biological samples including plasma, serum, synovial fluid and stool in proportion to the existing level of inflammation³. The use of calprotectin as a biological marker has been studied in inflammatory gastrointestinal disorders (IBD), as well as in other pathologies like rheumatoid arthritis and colorectal cancer⁴⁻¹².

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	12 x 8 wells
Enzyme-conjugate antibody (IgG, mouse)	1 x 15 ml
Substrate	1 x 15 ml
Stop solution	1 x 15 ml
Washing solution (20x)	1 x 50 ml
Diluent (10x)	1 x 20 ml
Extraction solution (2.5x)	2 x 50 ml
Calibrators	6 x 1.5 ml
Control 1 (low)	1 x 1.5 ml
Control 2 (high)	1 x 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

Feces sample collection

- Sample collection device (optional alternative use, i.e. **EasyCal** ref. 9062).
- Transport container.

Feces preparation

- Disposable, breakable sterile inoculation loops or wooden stick.
- Disposable polystyrene screw cap tubes, 14 ml.
- Eppendorf tubes (1-1.5 ml).
- Sensitive digital scale (40-150 mg).
- Vortex mixer.
- Shaker.
- Microcentrifuge (10,000 x g).
- Freezer (-20°C).

EQUIPMENT FOR ELISA MEASUREMENTS

1. Multi-channel pipette, 50, 200 µl.
2. Precision pipettes 5, 100 and 1,000 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. All patient samples must be treated as potential biohazard, and shall be handled and disposed of according to local laboratory legislation.
4. Reagents, samples and microtiter strips should be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the test.
5. **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.
6. Unused microtiter strips should be re-sealed airtight in the foil bag with the enclosed drying pad and stored at 2-8°C.
7. 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.
8. Substrate is light sensitive, store in the dark and shake before use.
9. 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.
10. 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.
11. All reagents, except to the substrate and the concentrated washing solution, contain Proclin 300. It may cause an allergic reaction.
12. 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

1. All reagents and working solutions, except washing solution, must be stored at 2-8 °C.
2. The expiration date is printed on all component labels. See table below for open-vial stability.
3. Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity.
4. 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)

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

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

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

- For the collection/extraction procedure, please refer to *EasyCal* ref. 9062 box insert.
- After the extraction procedure the fecal 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

- Weigh (tare) the empty screw cap tube together with the inoculation loop or the wooden applicator stick.
- 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.
- Weigh tube and loop with feces and calculate net feces weight (between 80-120 mg).
- 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.
- 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.

Feces (mg)	Extraction solution (ml)	Feces (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

- Shake/mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex.
- Homogenize 25 ± 5 minutes on a shaker or roller. The inoculation loop or the wooden stick inside the tube will act as an agitator.
- Transfer the homogenate (1 ml) to an Eppendorf tube and centrifuge for 20 minutes at 10,000 x g at Room Temperature (RT) using a bench-top centrifuge.
- 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.
- 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 µl of extracted sample into 995 µl of diluent solution (1:200). Then take 500 µl of the first dilution and further dilute it 1:2 by adding 500 µl 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
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 µl of each Calibrator in duplicate wells (A1-B1, C1-D1, ...).
6. Add 100 µl of each control in duplicate wells (E2-F2, G2-H2, ...).
7. Mix diluted sample well before application to the plate and add 100 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 ÷ -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 - 3,000 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 fecal calprotectin levels.
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.
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 **Calprest NG** assay.
6. Fecal 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 weeks
> 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 studies¹³⁻¹⁴ 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 sample values considered Positive				
Clinical Diagnosis		Pos	Neg	Total
	Positive	123	14	137
Calprest NG	Negative	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensitivity		94.6%	95% CI (89.2% - 97.8%)	
Specificity		90.2%	95% CI (84.1% - 94.5%)	
PPV*		89.8%	95% CI (83.4% - 94.3%)	
NPV**		94.9%	95% CI (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 sample values considered Negative				
Clinical Diagnosis		Pos	Neg	Total
	Positive	108	3	111
Calprest NG	Negative	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensitivity		83.1%	95% CI (75.5% - 89.1%)	
Specificity		97.9%	95% CI (94.0% - 99.6%)	
PPV*		97.3%	95% CI (92.3% - 99.4%)	
NPV**		86.4%	95% CI (80.2% - 91.3%)	

* **PPV** - Positive Predictive Value | ** **NPV** - Negative Predictive Value | **CI** - 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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
		117	40	157
Positive Agreement	96.6%	95% CI (91.5% - 98.7%)		
Negative Agreement	100.0%	95% CI (91.2% - 100.0%)		
Overall agreement	97.5%	95% CI (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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
		76	81	157
Positive Agreement	96.1%	95% CI (89.0% - 98.6%)		
Negative Agreement	96.3%	95% CI (89.7% - 98.7%)		
Overall agreement	96.2%	95% CI (91.9% - 98.2%)		

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Matrix and aqueous linearity

3 high positive extracted stool samples, 3 low concentration extracted stool samples (matrix linearity) or a calprotectin reference material for calprotectin kit (aqueous linearity) were used in the study. The 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 - 3,066 mg/kg for matrix and from 27.8 - 2,889.3 mg/kg for aqueous linearity.

Matrix Linearity					
Test Range (mg/kg)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% Recovery Rate (Obtained/Theoretical)	
25.2 ÷ 3,066	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)	
27.8 ÷ 2,889.3	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:

	Value	Concentration
	(ng/ml)	(mg/kg)
LoB	0.87	17.5
LoD	1.17	23.41
LoQ	1.35	27.1

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	1,204.0	1,975.2
Spike 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	1,319.0	2,090.2
Observed (Base + Spike)	mg/kg	42.3	79.7	200.7	425.3	592.3	1,397.7	2,343.8
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, 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	1,973.3
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 7 different stool samples (6 positive and 1 around cut-off) and assaying each extract in 2 replicates during 2 separate runs per day for 10 days by 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	1,193.10	52.91	4.4%	73.33	6.1%	118.78	10.0%	60.32	5.1%	161.01	13.5%
6	120	1,006.17	41.69	4.1%	39.67	3.9%	55.80	5.5%	28.24	2.8%	84.98	8.4%
7	120	2,267.29	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 3 centers by testing 8 different stool sample extracts (6 positive, 1 around cut-off and 1 negative). Each center has tested each extract in 5 replicates over 5 days. The CV% values should be equal and lower than 20%.

ID Sample	N	Mean (mg/kg)	Repeatability		Precision		Reproducibility	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Sample A	75	433.80	13.43	3.1%	63.99	14.8%	64.55	14.9%
Sample B	75	36.54	3.69	10.1%	5.11	14.0%	5.11	14.0%
Sample C	75	1,180.64	71.08	6.0%	156.16	13.2%	156.16	13.2%
Sample D	75	682.76	35.88	5.3%	49.57	7.3%	78.95	11.6%
Sample E	75	1,629.44	96.29	5.9%	214.76	13.2%	226.84	13.9%
Sample F	75	62.08	4.19	6.8%	5.64	9.1%	8.68	14.0%
Sample G	75	356.84	12.00	3.4%	30.07	8.4%	51.93	14.6%
Sample H	75	2,152.20	173.58	8.1%	308.13	14.3%	312.19	14.5%

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

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 è un eterodimero di 36 kDa appartenente alla famiglia di proteine S100. Essa è prodotta dalle cellule polimorfonucleate, dai monociti e dalle cellule epiteliali, avendo effetto antimicrobico e giocando un ruolo nella risposta immunitaria innata¹⁻². La calprotectina può essere rilevata in diversi campioni biologici quali plasma, siero, fluido sinoviale e feci, in proporzione al livello esistente di infiammazione³. L'utilizzo della calprotectina come marcatore biologico è stato studiato nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), nonché in altre patologie come l'artrite reumatoide e il cancro del colon-retto⁴⁻¹².

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	12 x 8 pozzetti
Coniugato (IgG, topo)	1 x 15 ml
Substrato	1 x 15 ml
Soluzione di arresto	1 x 15 ml
Soluzione di lavaggio (20x)	1 x 50 ml
Diluente (10x)	1 x 20 ml
Soluzione di estrazione (2,5x)	2 x 50 ml
Calibratori	6 x 1,5 ml
Controllo 1 (basso)	1 x 1,5 ml
Controllo 2 (alto)	1 x 1,5 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 flacone 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 flacone contenente 15 ml di reagente substrato (TMB). Pronto per l'uso.
4. **Soluzione di arresto:** 1 flacone contenente 15 ml di soluzione di H_2SO_4 (0,5M). Pronto per l'uso.
5. **Soluzione di lavaggio (20x):** 1 flacone contenente 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata. Diluire con acqua distillata.
6. **Diluente (10x):** 1 flacone contenente 20 ml di soluzione di diluizione concentrata. Diluire con acqua distillata.
7. **Soluzione di estrazione (2,5x):** 2 flaconi 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

- Provette per raccolta campioni (**EasyCal** ref. 9062).
- Contenitore per trasporto.

Per la preparazione delle feci

- Anse per inoculazione monouso, sterili.
- Provette con tappo a vite da circa 14 ml.
- Provette tipo Eppendorf (1-1,5 ml).
- Bilancia (range di misura 40-150 mg).
- Vortex mixer.
- Shaker.
- Microcentrifuga (10.000 x g).
- Congelatore (-20°C).

ATTREZZATURE PER TEST ELISA

1. Pipetta multicanale, 50-200 µl.
2. Pipetta di precisione (5, 100, 1000 µl).
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. Trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi ed eliminare i rifiuti secondo la legislazione vigente.
4. Attendere che i reagenti, i campioni e i pozzetti della micropietra raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
5. **Attenzione:** non scambiare i componenti di lotti diversi. Una buona performance può essere garantita solo usando componenti dello stesso lotto di **Calprest NG**.
6. Le strip non usate devono essere rimesse nel contenitore fornito e sigillate assieme al desiccante e conservate a 2-8°C.
7. 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.
8. Il substrato è fotosensibile, conservare al buio e agitare prima dell'uso.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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 concentrato 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)

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

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

Stabilità delle soluzioni di lavoro

Reagente	Conservazione	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

1. Per la procedura di raccolta/estrazione, si prega di consultare il box insert di **EasyCal** ref. 9062.
2. A seguito della procedura di estrazione, l'estratto fecale è pronto per essere testato manualmente oppure in modo automatico posizionando il tubo di **EasyCal** (privo 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.
7. Omogeneizzare per 25 ± 5 minuti su agitatore. L'ansa all'interno della provetta funzionerà da agitatore.
8. Trasferire l'omogenato (1 ml) in una provetta tipo Eppendorf e centrifugare per 20 minuti a 10.000 x g a temperatura ambiente usando una centrifuga da tavolo.
9. 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.
10. 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°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 µl di campione estratto in 995 µl di Soluzione di diluizione (1:200). Quindi prelevare 500 µl della prima diluizione e diluire ulteriormente 1:2 aggiungendo 500 µl 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
A	Calibratore 1	Calibratore 5	Campione	Campione	Campione
B	Calibratore 1	Calibratore 5	Campione	Campione	Campione
C	Calibratore 2	Calibratore 6	Campione	Campione	
D	Calibratore 2	Calibratore 6	Campione	Campione	
E	Calibratore 3	Controllo 1	Campione	Campione	
F	Calibratore 3	Controllo 1	Campione	Campione	
G	Calibratore 4	Controllo 2	Campione	Campione	
H	Calibratore 4	Controllo 2	Campione	Campione	

5. Aggiungere 100 µl di ciascun calibratore in doppio (A1-B1, C1-D1, ...).
6. Aggiungere 100 µl di ciascun controllo in doppio (E2-F2, G2-H2, ...).
7. Mescolare bene i campioni diluiti prima di dispensarli nei pozzetti. Dispensare 100 µl di ciascun campione nei rispettivi pozzetti (A3, B3, C3, D3, ...).
8. Coprire le piastre e incubare a temperatura ambiente (20-25°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 µl di coniugato in ciascun pozzetto.
11. Coprire la piastra ed incubare temperatura ambiente per 30 min.
12. Ripetere i lavaggi come indicato sopra (cfr. 9).
13. Aggiungere 100 µl di substrato in ciascun pozzetto. **Nota:** si raccomanda di usare una pipetta multicanale 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 µl 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 620 nm 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 - 3.000 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.
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.
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 internazionali¹³⁻¹⁴, 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		Pos	Neg	Totale
	Positivi	123	14	137
Calprest NG	Negativi	7	129	136
	Totali	130	143	273
Sensibilità		94,6%	95% CI (89,2% - 97,8%)	
Specificità		90,2%	95% CI (84,1% - 94,5%)	
VPP*		89,8%	95% CI (83,4% - 94,3%)	
VPN**		94,9%	95% CI (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		Pos	Neg	Totale
	Positivi	108	3	111
Calprest NG	Negativi	22	140	162
	Totali	130	143	273
Sensibilità		83,1%	95% CI (75,5% - 89,1%)	
Specificità		97,9%	95% CI (94,0% - 99,6%)	
VPP*		97,3%	95% CI (92,3% - 99,4%)	
VPN**		86,4%	95% CI (80,2% - 91,3%)	

* VPP - Valore Predittivo Positivo | ** VPN - Valore Predittivo Negativo | CI - Intervallo di Confidenza

Confronto tra Metodi

È 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% IC)	Y-intercetta (95% IC)
$Y = 0,9232x + 0,1285$	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		
		Pos	Neg	Totale
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
		117	40	157
Concordanza Positiva	96,6%	95% CI (91,5% - 98,7%)		
Concordanza Negativa	100,0%	95% CI (91,2% - 100,0%)		
Concordanza Totale	97,5%	95% CI (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		
		Pos	Neg	Totale
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
		76	81	157
Concordanza Positiva	96,1%	95% CI (89,0% - 98,6%)		
Concordanza Negativa	96,3%	95% CI (89,7% - 98,7%)		
Concordanza Totale	96,2%	95% CI (91,9% - 98,2%)		

CARATTERISTICHE DEL TEST

Linearità in matrice e in acqua

3 campioni alto positivi, 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 3.066 mg/kg, che in acqua con un range da 27,8 a 2.889,3 mg/kg.

Linearità in matrice				
Intervallo del test (mg/kg)	Pendenza (95% CI)	Y-intercetta (95% CI)	R ²	% Percentuale (Ottenuto/Teorico)
25,2 ÷ 3.066	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% CI)	Y-intercetta (95% CI)	R ²	% Percentuale (Ottenuto/Teorico)
27,8 ÷ 2.889,3	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	Concentrazione
	(ng/ml)	(mg/kg)
LoB	0,87	17,5
LoD	1,17	23,41
LoQ	1,35	27,1

Accuratezza / Recupero

Lo studio è stato condotto su 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	1.204,0	1.975,2
Concentrazione inocolata	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	1.319,0	2.090,2
Osservata (Base + Inoculo)	mg/kg	42,3	79,7	200,7	425,3	592,3	1.397,7	2.343,8
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, 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	1.973,3
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 7 diversi campioni di feci (6 positivi e 1 intorno al cut-off) e testando ciascun estratto in duplicato durante 2 serie separate al giorno per 10 giorni da 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	1.193,10	52,91	4,4%	73,33	6,1%	118,78	10,0%	60,32	5,1%	161,01	13,5%
6	120	1.006,17	41,69	4,1%	39,67	3,9%	55,80	5,5%	28,24	2,8%	84,98	8,4%
7	120	2.267,29	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 3 centri estraendo 8 diversi campioni di feci (6 positivi, 1 intorno al cut-off ed 1 negativo). Ciascun centro ha testando ciascun estratto in quintuplicato durante 5 giorni. I valori di CV% devono essere $\leq 20\%$. I dati sono riportati nella seguente tabella:

ID Campione	N	Media (mg/kg)	Ripetibilità		Precisione		Riproducibilità	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Campione A	75	433,80	13,43	3,1%	63,99	14,8%	64,55	14,9%
Campione B	75	36,54	3,69	10,1%	5,11	14,0%	5,11	14,0%
Campione C	75	1.180,64	71,08	6,0%	156,16	13,2%	156,16	13,2%
Campione D	75	682,76	35,88	5,3%	49,57	7,3%	78,95	11,6%
Campione E	75	1.629,44	96,29	5,9%	214,76	13,2%	226,84	13,9%
Campione F	75	62,08	4,19	6,8%	5,64	9,1%	8,68	14,0%
Campione G	75	356,84	12,00	3,4%	30,07	8,4%	51,93	14,6%
Campione H	75	2.152,20	173,58	8,1%	308,13	14,3%	312,19	14,5%

ID #	Ripetibilità 95% CI				Precisione 95% CI				Riproducibilità 95% CI			
	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%

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 est un hétérodimère de 36 kDa appartenant à la famille des protéines S100. Elle est produite par des granulocytes, des monocytes et des cellules épithéliales. Son activité antimicrobienne joue un rôle dans la réponse immunitaire innée¹⁻². La calprotectine se trouve dans de nombreux échantillons biologiques, y compris le plasma, le sérum, le liquide synovial et les selles, proportionnellement au niveau actuel d'inflammation³. L'utilisation de la calprotectine comme marqueur biologique a été étudiée dans les troubles inflammatoires gastro-intestinaux (MII ou IBD), ainsi que dans d'autres pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde et le cancer colorectal⁴⁻¹².

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	1 x 15 ml
Solution de lavage (20x)	1 x 50 ml
Diluant (10x)	1 x 20 ml
Solution d'extraction (2,5x)	2 x 50 ml
Calibrateurs	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

- Phase solide: 12x8 puits sensibilisés avec les anticorps anti-calprotectine. Pochette plastique hermétique contenant un sachet déshydratant.
- 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.
- Substrat: Un flacon contenant 15 ml de substrat (TMB). Prêt à l'emploi.
- Solution d'arrêt: 1 flacon contenant 15 ml de H₂SO₄ (0,5M). Prêt à l'emploi.
- Solution de lavage (20x): Un flacon contenant 50 ml de solution de lavage concentrée à diluer dans de l'eau distillée.
- Diluant (10x): Un flacon contenant 20 ml de diluant concentré (10x) à diluer avec de l'eau distillée.
- 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.
- Calibrateurs: 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 calibrateur est imprimé sur l'étiquette du flacon. Solution prête à l'emploi.
- 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.
- 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

- Flacons de prélèvement de selles (**EasyCal** ref. 9062).
- Containers de transport.

Préparation de selles

- Anse stérile cassable ou bâton de bois à usage unique.
- Tubes en polystyrène à bouchon à vis (14 ml).
- Tubes Eppendorf (1 ÷ 1,5 ml).
- Balance de précision (40-150 mg).
- Vortex.
- Agitateur.
- Microcentrifugeuse (10.000 x g).
- Congélateur (-20°C).

TECHNIQUE ELISA

1. Pipette multicanaux de 50 à 200 µl.
2. Pipettes de précision 5, 100 et 1.000 µl.
3. Lecteur de microplaque 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. Tous les échantillons de patients doivent être traités comme des risques biologiques potentiels, et doivent être manipulés et éliminés conformément à la législation locale en vigueur.
4. Les réactifs, les échantillons et les barrettes doivent être à température ambiante (20-25°C) avant le début du test.
5. **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.
6. Les barrettes ELISA non utilisées doivent être conservées à 2-8°C dans leur sachet d'origine scellé avec son déshydratant.
7. 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.
8. Le substrat est sensible à la lumière. Le stocker à l'obscurité et agiter avant utilisation.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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. 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 1.000 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

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

Réactif	Conserver à	Durée de conservation
Conjugate	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

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

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

- Pour la procédure de collecte/extraction, veuillez vous reporter à la notice du kit **EasyCal** ref. 9062.
- 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

- Peser (tarer) le tube vide avec le bouchon à vis et l'anse ou bâton de bois.
- 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.
- Peser le tube avec les selles et l'anse et calculer le poids net de selles (80 à 120 mg).
- 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.
- 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

- Mélanger au vortex pendant 30 secondes.
- Homogénéiser pendant 25 ± 5 minutes sur un agitateur ou un rouleau. L'anse ou le bâton de bois à l'intérieur du tube agiront comme un agitateur.
- Transférer 1 ml de l'homogénat obtenu dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 20 minutes à 10.000 x g à température ambiante à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse.
- 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.
- Cet extrait peut être testé immédiatement ou bien conservé à -20°C (pendant trois mois maximum).

Procédure ELISA

- Vérifier que tous les réactifs soient à température ambiante (20-25°C) avant de commencer le test.
- Décongeler les échantillons de selles à température ambiante.
- Diluer les échantillons 1:400 en deux étapes consécutives. Dans la première étape, diluer 5 µl de l'échantillon extrait dans 995 µl de solution de dilution (1:200). Ensuite, diluer 500 µl de la première dilution au 1/2 par addition de 500 µl de solution de dilution.
- 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
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	

- Déposer 100 µl de chaque calibrateur en duplicat (puits A1-B1, C1-D1, ...).
- Déposer 100 µl des contrôles appropriés en duplicat dans les puits (E2-F2, G2-H2, ...).
- Bien mélanger l'échantillon dilué avant application sur la plaque et ajouter 100 µl de chaque échantillon aux puits suivants:(A3, B3, C3, D3, ...).
- Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incuber à température ambiante pendant 60 minutes.
- Après incubation, laver les puits avec 0,3 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.
- Déposer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
- Recouvrir la microplaque avec le couvercle fourni et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
- Répéter le lavage comme indiqué ci-dessus (étape 9).
- Déposer 100 µl 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.
- Incuber la microplaque à température ambiante pendant 15 minutes à l'obscurité.
- Déposer 100 µl de solution stop dans chaque puits.
- Mesurer les densités optiques (DO) à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA à 450 nm. La DO du calibrateur 6 doit être supérieure à 1,4. Il est possible de suivre le développement de la couleur par une lecture à 620 nm.
- Après la déposition de la solution stop, les microplaques peuvent être conservées à +4°C pendant 24 heures.

Courbe étalon et contrôle de qualité

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

Gamme de valeurs

1,355 - 150 ng/ml (27,1 - 3.000 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 Calibre 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

- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir chez les patients qui ont une granulocytopénie due à une aplasie médullaire.
- Certains patients qui prennent des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) auront une élévation de leur niveau de calprotectine fécale.
- 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**.
- 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.
- 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**.
- 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 internationales¹³⁻¹⁴ 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	Pos	Neg	Total
Positif	123	14	137
Calprest NG Négatif	7	129	136
Total	130	143	273
Sensibilité	94,6%	95% CI (89,2% - 97,8%)	
Spécificité	90,2%	95% CI (84,1% - 94,5%)	
VPP*	89,8%	95% CI (83,4% - 94,3%)	
VPN**	94,9%	95% CI (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	Pos	Neg	Total
Positif	108	3	111
Calprest NG Négatif	22	140	162
Total	130	143	273
Sensibilité	83,1%	95% CI (75,5% - 89,1%)	
Spécificité	97,9%	95% CI (94,0% - 99,6%)	
VPP*	97,3%	95% CI (92,3% - 99,4%)	
VPN**	86,4%	95% CI (80,2% - 91,3%)	

* VPP - Valeur Prédictive Positive | ** VPN - Valeur Prédictive Négative | CI - 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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
		117	40	157
Concordance Positif	96,6%	95% CI (91,5% - 98,7%)		
Concordance Négatif	100,0%	95% CI (91,2% - 100,0%)		
Concordance Total	97,5%	95% CI (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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
		76	81	157
Concordance Positif	96,1%	95% CI (89,0% - 98,6%)		
Concordance Négatif	96,3%	95% CI (89,7% - 98,7%)		
Concordance Total	96,2%	95% CI (91,9% - 98,2%)		

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Linéarité en matrice et aqueuse

3 extraits d'échantillons de selles hautement positives, 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 3 extraits d'échantillons de selles hautement positives ont été mélangées (H) et diluées 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 3.066 mg/kg pour la matrice et de 27,8 à 2.889,3 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)
25,2 ÷ 3.066	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)
27,8 ÷ 2.889,3	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 suivant:

	Valeur	Concentration
	(ng/ml)	(mg/kg)
LoB	0,87	17,5
LoD	1,17	23,41
LoQ	1,35	27,1

Précision / Récupération

L'étude a été réalisée en testant 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 triplif. Les données sont montrées dans le tableau ci-dessous:

Recupero dopo inoculo								
Échantillon		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Valeur base	mg/kg	9,3	51,7	162,7	307,7	458,3	1.204,0	1.975,2
Valeur enrichissement	mg/kg	32,3	32,3	32,3	115,0	115,0	115,0	115,0
Théorique (Base + enrich.)	mg/kg	41,7	84,0	195,0	422,7	573,3	1.319,0	2.090,2
Obtenu (Base + enrich.)	mg/kg	42,3	79,7	200,7	425,3	592,3	1.397,7	2.343,8
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, 4 échantillons (2 positifs, 1 proche du seuil de positivité et 1 négatif) ont été extraits 10 fois chacun, et chaque extrait a été testé en duplirif. 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	1.973,3
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 7 échantillons de selles différentes (6 positifs et 1 proche du seuil de positivité). Chaque extrait a été testé en duplicat sur 2 séries par jour pendant 10 jours, par 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	1.193,10	52,91	4,4%	73,33	6,1%	118,78	10,0%	60,32	5,1%	161,01	13,5%
6	120	1.006,17	41,69	4,1%	39,67	3,9%	55,80	5,5%	28,24	2,8%	84,98	8,4%
7	120	2.267,29	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 3 centres, sur 8 extraits de selles différentes (6 positifs, 1 proche du seuil de positivité et 1 négatif). Chaque centre a testé chaque extrait en 5 réplicats sur 5 jours. Le coefficient de variation CV (%) devrait être inférieur ou égal à 20%.

ID Échantillon	N	Moyenne (mg/kg)	Répétabilité		Précision		Reproductibilité	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Échantillon A	75	433,80	13,43	3,1%	63,99	14,8%	64,55	14,9%
Échantillon B	75	36,54	3,69	10,1%	5,11	14,0%	5,11	14,0%
Échantillon C	75	1.180,64	71,08	6,0%	156,16	13,2%	156,16	13,2%
Échantillon D	75	682,76	35,88	5,3%	49,57	7,3%	78,95	11,6%
Échantillon E	75	1.629,44	96,29	5,9%	214,76	13,2%	226,84	13,9%
Échantillon F	75	62,08	4,19	6,8%	5,64	9,1%	8,68	14,0%
Échantillon G	75	356,84	12,00	3,4%	30,07	8,4%	51,93	14,6%
Échantillon H	75	2.152,20	173,58	8,1%	308,13	14,3%	312,19	14,5%

ID #	Répétabilité 95% CIs				Précision 95% CIs				Reproductibilité 95% CIs			
	SD		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%

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 es un complejo heterodimérico de 36 kDa perteneciente a la familia de proteínas S100 y sintetizado por células polimorfonucleares, monocitos y células epiteliales. Tiene efectos antimicrobianos directos y desempeña un papel en la respuesta inmune innata¹⁻². La calprotectina se encuentra en numerosas muestras biológicas que incluyen plasma, suero, líquido sinovial y heces en proporción al nivel existente de inflamación³. El uso de calprotectina como marcador biológico se ha estudiado en trastornos inflamatorios gastrointestinales (EII), así como en otras patologías, como la artritis reumatoide y el cáncer colorrectal⁴⁻¹².

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	12 x 8 pocillos
Conjugado (IgG, ratón)	1 x 15 ml
Substrato	1 x 15 ml
Solución de parada	1 x 15 ml
Solución de lavado (20x)	1 x 50 ml
Diluyente (10x)	1 x 20 ml
Solución de extracción (2,5x)	2 x 50 ml
Calibradores	6 x 1,5 ml
Control 1 (bajo)	1 x 1,5 ml
Control 2 (alto)	1 x 1,5 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 H₂SO₄ (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

- Probetas de recoger muestras (**EasyCal** ref. 9062).
- Recipiente de transporte.

Para la preparación de las heces

- Anillos de inoculación estériles, desechables y rompibles o palo de madera.
- Probetas con tapón de rosca de 14 ml aproximadamente.
- Tubos Eppendorf (1 ÷ 1,5 ml).
- Balanza de laboratorio (rango de medición 40 ÷ 150 mg).
- Mezclador Vórtex.
- Agitador.
- Microcentrifuga (10.000 x g).
- Congelador (-20°C).

INSTRUMENTACIÓN PARA LA PRUEBA ELISA

1. Pipeta multicanal, 50-200 µl.
2. Precision pipettes 5, 100 and 1.000 µl.
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. Todas las muestras de pacientes han de tratarse como potencialmente contaminadas y deberán ser eliminadas de acuerdo con la legislación local vigente.
4. Antes de empezar el ensayo, aguarde hasta que los reactivos, las muestras y los pocillos lleguen a temperatura ambiente (20-25° C).
5. ¡Cuidado!: es sumamente importante no mezclar componentes de lotes diferentes. Eurospital garantiza resultados satisfactorios exclusivamente si se usan componentes del mismo lote de **Calprest NG**.
6. Vuelva a guardar las tiras sin usar en el recipiente y séllelas junto al desecante. Consérvelas a una temperatura de 2-8°C.
7. 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.
8. El sustrato tiene que ser de color amarillo pálido y es sensible a la luz. Consérvese en la oscuridad y agítese antes de usar.
9. 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.
10. 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.
11. Todos los reactivos, excepto el sustrato y la solución de lavado concentrada, contienen Proclin 300 como conservante. Se puede producir una reacción alérgica.
12. 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 1.000 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

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

Reactivo	Condiciones de conservación	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

Estabilidad de las soluciones de trabajo

Reactivo	Condiciones de conservación	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 la 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

Descongele las muestras de heces congeladas a temperatura ambiente y asegúrese de que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C). 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** ref. 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.
8. Transfiera el material homogeneizado (1 ml) a un tubo Eppendorf y centrifugue, durante 20 minutos a 10.000 x g, a temperatura ambiente, por medio de una centrifuga de sobremesa.
9. 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.
10. El extracto se puede analizar inmediatamente, o bien, se puede congelar a -20°C. En este caso, se puede conservar 3 meses, como máximo.

Procedimiento de ELISA

1. Asegúrese que todos los reactivos estén a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Descongele las muestras congeladas y espere hasta que lleguen a temperatura ambiente (20-25°C).
3. Diluya las muestras 1:400 usando dos pasos consecutivos. En el primer paso, diluya 5 µl de la muestra extraída en 995 µl del diluyente (1:200). A continuación, aspire 500 µl de la primera dilución y vuelva a diluir añadiendo 500 µl del diluyente.
4. 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
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	

5. Coloque 100 µl de cada estándar por duplicado (A1-B1, C1-D1, ...).
6. Coloque 100 µl de cada control por duplicado (E2-F2, G2-H2, ...).
7. Mezcle bien las muestras diluidas, antes de colocarlas en los pocillos. Coloque 100 µl de cada muestra en los pocillos siguientes (A3, B3, C3, D3, ...).
8. Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 60 minutos.
9. 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.
10. Coloque 100 µl de conjugado en cada pocillo.
11. Tape las placas e incube a temperatura ambiente durante 30 minutos.
12. Repita los lavados tal como se ha descrito en el punto 9.
13. Coloque 100 µl 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.
14. Incube a temperatura ambiente durante unos 15 minutos en la oscuridad, o bien tapando la placa con una hoja de aluminio.
15. Coloque 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
16. Lea el valor de Densidad Óptica (DO) por medio del lector de ELISA a 450 nm. El valor de DO 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 620 nm. Los valores de 0,6 OD a 620 nm 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 DO del calibrador S1 debería ser inferior a 0,20 DO
3. Introduzca el Control 1 y el Control 2 en cada ensayo.

Rango de determinación

1,355 - 150 ng/ml (27,1 - 3.000 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 DO en un sistema X-Y. Si utiliza un software que transforma las abscisas (concentraciones) en una escala logarítmica, el calibrador cero debe indicarse con un valor inferior a 1 (por ejemplo, 0,001). 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.
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 (IBP), colitis microscópica y divertículos puede llevar a niveles de calprotectina elevados. Pacientes celíacos podrían mostrar también valores elevados de calprotectina.
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	Nueva 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 internacionales¹³⁻¹⁴ 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		Pos	Neg	Total
	Positivo	123	14	137
Calprest NG	Negativo	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensibilidad		94,6%	95% CI (89,2% - 97,8%)	
Specificidad		90,2%	95% CI (84,1% - 94,5%)	
VPP*		89,8%	95% CI (83,4% - 94,3%)	
VPN**		94,9%	95% CI (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		Pos	Neg	Total
	Positivo	108	3	111
Calprest NG	Negativo	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensibilidad		83,1%	95% CI (75,5% - 89,1%)	
Specificidad		97,9%	95% CI (94,0% - 99,6%)	
VPP*		97,3%	95% CI (92,3% - 99,4%)	
VPN**		86,4%	95% CI (80,2% - 91,3%)	

* VPP - Valor Predictivo Positivo | ** VPN - Valor Predictivo Negativo | CI - 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 EII 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 predicción (x) de acuerdo con sus prospectos correspondientes. Los resultados se resumen en las Tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3 - Deming Regression Analysis.

	Pendiente (95% CI)	Intersección en Y (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				
		Prueba comparativa		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
		117	40	157
Acuerdo Positivo	96,6%	95% CI (91,5% - 98,7%)		
Acuerdo Negativo	100,0%	95% CI (91,2% - 100,0%)		
Acuerdo Total	97,5%	95% CI (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				
		Prueba comparativa		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
		76	81	157
Acuerdo Positivo	96,1%	95% CI (89,0% - 98,6%)		
Acuerdo Negativo	96,3%	95% CI (89,7% - 98,7%)		
Acuerdo Total	96,2%	95% CI (91,9% - 98,2%)		

INDICACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Linealidad en matriz y acuosas

3 muestras de heces extraídas con valores altos positivos, 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 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 25,2-3.066 mg/kg para la linealidad en matriz y en el rango 27,8-2.889,3 mg/kg para la linealidad acuosa.

Linealidad en Matriz				
Rango del test (mg/kg)	Pendiente (95% CI)	Intersección en Y (95% CI)	R ²	% Índice de recuperación (Obtenido/Teórico)
25,2 ÷ 3.066	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)	Intersección en Y (95% CI)	R ²	% Índice de recuperación (Obtenido/Teórico)
27,8 ÷ 2.889,3	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:

	Valor	Concentración
Criterio	(ng/ml)	(mg/kg)
LoB	0,87	17,5
LoD	1,17	23,41
LoQ	1,35	27,1

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 o 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	1.204,0	1.975,2
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	1.319,0	2.090,2
Obtenido (Base + alterno)	mg/kg	42,3	79,7	200,7	425,3	592,3	1.397,7	2.343,8
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, 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	1.973,3
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 7 diferentes muestras de heces (de 6 positivos y 1 alrededor del punto de corte) y ensayando cada extracto en 2 replicados durante 2 ensayos por separado veces por día durante 10 días por 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	1.193,10	52,91	4,4%	73,33	6,1%	118,78	10,0%	60,32	5,1%	161,01	13,5%
6	120	1.006,17	41,69	4,1%	39,67	3,9%	55,80	5,5%	28,24	2,8%	84,98	8,4%
7	120	2.267,29	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 3 centros ensayando 8 extractos diferentes de muestras de heces (de 6 positivos, 1 valor cercano al punto de corte y 1 negativo). Cada centro ha probado cada extracto de en (5) replicados durante 5 días. Los valores de CV% deben ser iguales e inferiores al 20%.

ID Muestra	N	Media (mg/kg)	Repetibilidad		Precisión dentro del centro		Reproducibilidad	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Muestra A	75	433,80	13,43	3,1%	63,99	14,8%	64,55	14,9%
Muestra B	75	36,54	3,69	10,1%	5,11	14,0%	5,11	14,0%
Muestra C	75	1.180,64	71,08	6,0%	156,16	13,2%	156,16	13,2%
Muestra D	75	682,76	35,88	5,3%	49,57	7,3%	78,95	11,6%
Muestra E	75	1.629,44	96,29	5,9%	214,76	13,2%	226,84	13,9%
Muestra F	75	62,08	4,19	6,8%	5,64	9,1%	8,68	14,0%
Muestra G	75	356,84	12,00	3,4%	30,07	8,4%	51,93	14,6%
Muestra H	75	2.152,20	173,58	8,1%	308,13	14,3%	312,19	14,5%

ID #	Repetibilidad 95% CIs				Precisión 95% CIs				Reproducibilidad 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%

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 Laborergebnissen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Calprotectin ist ein heterodimerer Komplex mit 36 kDa, der zur S100-Proteinfamilie gehört und aus polymorphkernigen Zellen, Monozyten und Epithelzellen stammt. Es hat direkte antimikrobielle Wirkungen und spielt eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort¹⁻². Calprotectin kommt in zahlreichen biologischen Proben vor, darunter Plasma, Serum, Synovialflüssigkeit und Stuhl, proportional zum vorhandenen Entzündungsgrad³. Die Verwendung von Calprotectin als biologischer Marker wurde bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), sowie bei anderen Pathologien, wie rheumatoider Arthritis und Darmkrebs untersucht⁴⁻¹².

TEST PRINZIP

Calprest NG ist ein Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) System mit farbmessigen 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 Kunststoffes 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	12 x 8 Brunnen
Enzym Konjugat Antikörper (IgG, Maus)	1 x 15 ml
Substratlösung	1 x 15 ml
Stopplösung	1 x 15 ml
Waschlösung (20x)	1 x 50 ml
Verdünnungslösung (10x)	1 x 20 ml
Extraktionslösung (2,5x)	2 x 50 ml
Kalibratoren	6 x 1,5 ml
Kontrolle 1 (niedrig)	1 x 1,5 ml
Kontrolle 2 (hoch)	1 x 1,5 ml

ZUSAMMENSETZUNG DER MITGELIEFERTEN MATERIALIEN/REAGENZIEN

1. Mit Antikörpern beschichtete Platte: 12x8 Brunnen, 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, H₂SO₄ (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. Kalibratoren: 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 MITGELIEFERTER MATERIALIEN

- Stuhlprobensammelgefäß (**EasyCal** ref. 9062).
- Transportbehälter.

Zur Probenvorbereitung

- Sterile Einweg-Impfösen.
- Einweg Polystyrol Röhrchen mit Schraubverschluss, 14 ml.
- Reaktionsgefäße (1-1,5 ml), z.B. der Eppendorf AG.
- Waage (Messbereich 40-150 mg).
- Vortex-Mischer.
- Schüttler.
- Mikrozentrifuge (10.000 x g).
- Gefriergerät (-20°C).

ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Mehrkanalpipette, 50-200 µl.
2. Präzisions Pipetten 5, 100 und 1.000 µl.
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 Patientenproben müssen als potentiell infektiös behandelt werden. Umgang und Entsorgung müssen nach der örtlichen Rechtslage erfolgen.
4. Alle Reagenzien, Proben sowie die benötigte Anzahl von Vertiefungen sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25° C) gebracht werden.
5. **Achtung:** Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Zufriedenstellende Leistungskriterien können nur gewährleistet werden, wenn die Komponenten der gleichen **Calprest NG**-Lot benutzt werden.
6. Unbenutzte Mikrotiterwells sollten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel wieder verschlossen und bei 2-8°C gelagert werden.
7. 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.
8. Das Substrat sollte eine blassgelbe Färbung aufweisen. Da es sehr lichtempfindlich ist, bitte an einem dunklen Ort aufbewahren. Vor Gebrauch schütteln.
9. 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.
10. 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.
11. Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Substrats und der Waschlösung, enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
12. 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

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

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

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

Tauen Sie gefrorene Stuhlproben bei Raumtemperatur auf und stellen Sie sicher, dass alle Reagenzien Raumtemperatur (20-25 °C) erreichen. Es gibt zwei alternative Stuhlproben Zubereitungsmethoden, manuell und unter Verwendung des EasyCal-Stuhl-Extraktionsgeräts. Benutzer können ihre bevorzugte Probenvorbereitungsmethode auswählen.

A. EasyCal-Probenvorbereitung

1. Informationen zum Sammeln / Extrahieren finden Sie in der EasyCal-Referenz. 9062 Boxeinsatz.
2. Nach dem Extraktionsvorgang kann der Fäkalextrakt entweder manuell oder automatisch getestet werden, indem das EasyCal-Röhrchen (ohne Trichter) platziert wird und stecken) direkt in die ELISA-Instrumentierung.

B. Manuelle Probenvorbereitung

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.
8. Das Homogenat (1 ml) in ein Eppendorf-Röhrchen übertragen und 20 Minuten bei 10.000 x g bei Raumtemperatur (RT) mit einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
9. 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.
10. Der Überstand soll sofort analysiert werden oder bei -20°C eingefroren und für maximal 3 Monate gelagert werden.

ELISA Testdurchführung

1. Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien Raumtemperatur (20-25°C) haben.
2. Die eingefrorenen Proben auftauen und auf Raumtemperatur bringen.
3. 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.
4. 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
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	

5. Je 100 µl Standards in Doppelbestimmung (A1-B1, C1-D1, ...) in die entsprechende Vertiefung geben.
6. Je 100 µl Kontrollen in Doppelbestimmung (E2-F2, G2-H2...) in die entsprechende Vertiefung geben.
7. Die verdünnten Proben gründlich mischen, anschließend 100 µl (A3, B3, C3, D3, ...) in die entsprechende Vertiefung geben.
8. Die Platte abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
9. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütteln. Vertiefungen 3mal mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
10. 100 µl Enzym Konjugat in jede Vertiefung geben.
11. Die Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Den Waschschrift wie unter Punkt 9 beschrieben wiederholen.
13. 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.
14. Die Platte für etwa 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
15. 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung geben.
16. 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.
17. Nach Zugabe der Stopplösung, kann die Platte bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt werden.

Kalibrierung und Qualitätskontrolle

1. In jedem Testansatz muss eine neue Standardkurve benutzt werden.
2. Die O.D.- Wert von Kalibrator S1 sollte < 0,20 OD sein.
3. In jedem Testansatz sollten die Kontrollen mitgeführt werden.

Angegebener Bereich

1,355 - 150 ng/ml (27,1 - 3.000 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.
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.
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	Deutung	Nachverfolgen
< 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 Studien¹³⁻¹⁴ 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				
		Pos	Neg	Total
	Positiv	123	14	137
Calprest NG	Negativ	7	129	136
	Total	130	143	273
Sensitivität		94,6%	95% CI (89,2% - 97,8%)	
Spezifität		90,2%	95% CI (84,1% - 94,5%)	
PV*		89,8%	95% CI (83,4% - 94,3%)	
NV**		94,9%	95% CI (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		Pos	Neg	Total
	Positiv	108	3	111
Calprest NG	Negativ	22	140	162
	Total	130	143	273
Sensitivität		83,1%	95% CI (75,5% - 89,1%)	
Spezifität		97,9%	95% CI (94,0% - 99,6%)	
PV*		97,3%	95% CI (92,3% - 99,4%)	
NV**		86,4%	95% CI (80,2% - 91,3%)	

* PV - positiven Vorhersagewert | ** NV - negativen Vorhersagewert | CI - 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.

	Steigung (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	113	0	113
	Neg	4	40	44
		117	40	157
Positive Übereinstimmung	96,6%	95% CI (91,5% - 98,7%)		
Negative Übereinstimmung	100,0%	95% CI (91,2% - 100,0%)		
Gesamtübereinstimmung	97,5%	95% CI (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		
		Pos	Neg	Total
Calprest NG	Pos	73	3	76
	Neg	3	78	81
		76	81	157
Positive Übereinstimmung	96,1%	95% CI (89,0% - 98,6%)		
Negative Übereinstimmung	96,3%	95% CI (89,7% - 98,7%)		
Gesamtübereinstimmung	96,2%	95% CI (91,9% - 98,2%)		

LEISTUNGSMERKMALE

Matrix und wässrige Linearität

3 hoch positive extrahierte Stuhlproben, 3 mit geringer Konzentration extrahierte Stuhlproben (Matrix Linearität) oder ein Calprotectin Referenzmaterial für Calprotectin Kit (wässrige Linearität) wurden in der Studie verwendet. Die 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 25,2-3.066 mg/kg für Matrix und 27,8-2.889,3 mg / kg für wässrige Linearität.

Matrix Linearität				
Messbereich (mg/kg)	Steigung (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (95% CI)	R ²	% Wiederfindungsrate (Erhalten/Theoretische)
25,2 ÷ 3.066	1,014 (0,9868 ÷ 1,041)	9,279 (-26,54 ÷ 45,10)	0,994	86,9 ÷ 112,8

Aqueous Linearity				
Messbereich (mg/kg)	Steigung (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (95% CI)	R ²	% Wiederfindungsrate (Erhalten/Theoretische)
27,8 ÷ 2.889,3	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:

	Wert	Konzentration
Kriterien	(ng/ml)	(mg/kg)
LoB	0,87	17,5
LoD	1,17	23,41
LoQ	1,35	27,1

Genauigkeit / Wiederfindung

Die Studie wurde durch Testen von 7 verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Jede extrahierte Stuhlprobe wurde mit einer konstanten Menge / Volumen von Calprotectin gespiked oder mit einem gleichen Volumen an Probenverdünnungsmittel für Volumenadjustierungen 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	1.204,0	1.975,2
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	1.319,0	2.090,2
Erhalten (Base + Spike)	mg/kg	42,3	79,7	200,7	425,3	592,3	1.397,7	2.343,8
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 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	1.973,3
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 7 unterschiedlichen Stuhlproben (6 waren positiv und 1 war im Cut-off Bereich) und jede Entnahme wurde in 2 Wiederholungen, während 2 separaten Läufen pro Tag, für 10 Tage, durch 3 unterschiedliche 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 (%)
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	1.193,10	52,91	4,4%	73,33	6,1%	118,78	10,0%	60,32	5,1%	161,01	13,5%
6	120	1.006,17	41,69	4,1%	39,67	3,9%	55,80	5,5%	28,24	2,8%	84,98	8,4%
7	120	2.267,29	223,08	9,8%	83,22	3,7%	155,52	6,9%	58,33	2,6%	290,31	12,8%

Multizentrische Präzision Evaluierungsstudie














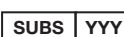





Die Studie wurde durchgeführt in 3 Zentren durch das Testen von 8 unterschiedlichen entnommenen Stuhlproben (6 waren positiv, 1 im Cut-off Bereich off und 1 war negativ). Jedes Zentrum hat jede Stuhlprobe in 5 Wiederholungen über 5 Tagen gemessen. Die CV% Werte sollten gleich oder weniger als 20% sein.

ID Probe	N	Mittelwert (mg/kg)	Wiederholgenauigkeit		Präzision innerhalb eines Zentrums		Reproduzierbarkeit	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Probe A	75	433,80	13,43	3,1%	63,99	14,8%	64,55	14,9%
Probe B	75	36,54	3,69	10,1%	5,11	14,0%	5,11	14,0%
Probe C	75	1.180,64	71,08	6,0%	156,16	13,2%	156,16	13,2%
Probe D	75	682,76	35,88	5,3%	49,57	7,3%	78,95	11,6%
Probe E	75	1.629,44	96,29	5,9%	214,76	13,2%	226,84	13,9%
Probe F	75	62,08	4,19	6,8%	5,64	9,1%	8,68	14,0%
Probe G	75	356,84	12,00	3,4%	30,07	8,4%	51,93	14,6%
Probe H	75	2.152,20	173,58	8,1%	308,13	14,3%	312,19	14,5%

ID #	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%

REFERENCES / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFÍA / LITERATUR

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. Roseth 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. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin -- a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. Swiss Med Wkly. 2012;142:w13557. Published 2012 Apr 5
10. Tibble J. A. et al: High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. Gut 1999; 45:362-366.
11. Montalto M. et al: Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. Scand J. Gastr., 2007; 42: 957-961.
12. Calcaterra V. et al: Ann Nutr Metab 2018; 73:177–183 “Serum Calprotectin Level in Children: Marker of Obesity and its Metabolic Complications”.
13. 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.
14. Whitehead Ws et al.: Between-assay variability of fecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. Ann Clin Biochem 2012; 1-9.

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

Calprest NG

Code 9069, 96 test.

Codice 9069, 96 test.

Code 9069, 96 test.

Código 9069, 96 test.

Artikel 9069, 96 test.



Eurospital SpA

Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Tel. +39 040 8997.1 - Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.it

