

Immunoturbidimetric assay for quantitative detection of calprotectin from fecal specimens

REF 9300

INTENDED PURPOSE

Calprest® Turbo is a quantitative latex turbidimetric assay for detecting concentration of fecal calprotectin that is intended to aid in the diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases (IBD), (e.g. Crohn's disease and ulcerative colitis), and to differentiate IBD from Irritable Bowel Syndrome (IBS) in conjunction with other clinical and laboratory findings.

TEST PRINCIPLE

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.

Calprest Turbo is a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the quantitative detection of calprotectin in human stool samples. The test was designed to be used on several automated analyzers. It is easy to use, widely applicable and the results are obtained in a very short period of time.

Calprest Turbo is based on the in vitro agglutination of antibodies anti-calprotectin coated polystyrene latex particles with the calprotectin antigen present in the analyzed solution. If there is no calprotectin present in the sample, the mixture will keep its smooth appearance. With the presence of calprotectin, the turbidity of the medium will increase after the aggregation of the antigen with the antibodies on the latex particles. Such turbidity is measured as an increase in absorbance at the determinate wavelength and is proportional to the quantity of calprotectin present in the sample.

MATERIALS PROVIDED (QUANTITY SUFFICIENT FOR AT LEAST 200 TESTS)

Component	Quantity	Cap color	Composition
Calprest Turbo Reagent 1	2 bottles x 27 ml		Enhancer reagent, ready to use
Calprest Turbo Reagent 2	1 bottle x 8 ml		Solution with latex particles coated with antibodies against human calprotectin, ready to use
Calprest Turbo Calibrator 0	1 vial x 1 ml	Yellow	Calprotectin solution (0 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 1	1 vial x 1 ml	Pink	Calprotectin solution (50 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 2	1 vial x 1 ml	Red	Calprotectin solution (100 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 3	1 vial x 1 ml	Violet	Calprotectin solution (250 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 4	1 vial x 1 ml	Green	Calprotectin solution (750 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 5	1 vial x 1 ml	Blue	Calprotectin solution (1,500 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Control 1	2 vials x 1 ml	White	Human recombinant calprotectin in buffer solution ready to use, do not diluite The range of values is printed on the label
Calprest Turbo Control 2	2 vials x 1 ml	Brown	Human recombinant calprotectin in buffer solution ready to use, do not diluite The range of values is printed on the label

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Specimen container.
- Transport container.
- Disposable gloves and laboratory equipment.
- Stool sample collection device (i.e. **EasyCal Turbo** ref. 9302).
- Disposable, breakable sterile inoculation loops or wooden stick (if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Disposable screw cap tubes, 14 ml (if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Extraction solution 1x (**Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Microcentrifuge tubes (1-1.5 ml).
- Sensitive digital scale (40-150 mg) (if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Vortex mixer.
- Shaker or roller (if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Microcentrifuge (10,000 x g) (if using fecal manual extraction method described on page 2).
- Precision pipettes.

Equipment for turbidimetric measurements

Any turbidimetric automated analyzer; for the instrument-specific protocol, see additional Application note.

STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS AND WORKING SOLUTIONS

- All reagents and working solutions must be stored at 2-8°C.
- The expiration date is printed on all component labels.
- Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Patient specimens and samples should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions and anyway as if capable of transmitting infections.
- For *in vitro* diagnostic use.
- The kit does not contain materials of human origin.
- A trained person in turbidimetric technique and autoanalyzer use is required.
- Do not exchange components from different lots. Good performance can only be guaranteed by using components from the same lot of **Calprest Turbo**.
- Do not mix screw caps from different reagent vials.
- The analyzer should be ready before performing any assay.
- If the result exceeds the measurement range, use the ready to use Extraction solution 1x (ref. 9299) to dilute the sample and repeat the assay again.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- If the outer packaging is damaged, ensure that all components listed in the “Materials Provided” section are present and intact. In case of leakage of liquid from the bottles, the kit must not be used.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent.
- The solutions should be discarded in a proper container after testing following local regulations.

SPECIMEN COLLECTION

Random stool collection. Collect sufficient quantity of human stool samples. These specimens should be collected in clean and dry single-use containers (no preservatives or transport media). Loose or liquid stool specimens are acceptable as normalization to stool weight is part of the calculation of the result. Collection of stool specimen from diapers should be avoided unless the specimen can be taken from a portion which is not in contact with the diaper material.

Specimen requirements

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

Specimen transport

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

Specimen Storage

Stool samples at the laboratory should be stored at 2-8°C for up to 7 days before testing, if not tested, freeze the stool samples at -20°C.

PROCEDURE

Sample Preparation

Thaw frozen stool specimen and ensure that all reagents for extraction procedure reach room temperature (20-25°C). There are two alternative stool sample preparation methods, manual or by using **EasyCal Turbo** stool extraction device. Users can choose their preferred sample preparation method.

A. **EasyCal Turbo** Sample Preparation

1. For the collection/extraction procedure, please refer to **EasyCal Turbo** ref. 9302 instruction for use.
2. After the extraction procedure the fecal extract is ready to be tested. Insert the **EasyCal Turbo** tube (devoid of funnel and stick) directly into the turbidimetric analyzer or transfer the supernatant to an adaptor cup (not provided) for the analytical procedure.
3. If the extract is not analyzed immediately, it can be stored according to the instructions for use of **EasyCal Turbo** (Ref. 9302).

B. **Manual Sample Preparation**

Use a screw cap centrifugation tube for each sample to be tested. Label centrifugation tube with patient name or number.

1. Weigh (tare) the empty screw cap tube together with the inoculation loop or the wooden applicator stick.
2. Mix well the stool by means of the inoculation loop or wooden applicator stick in order to make the sample as homogenous as possible. Using the inoculation loop (or wooden applicator stick) take out approximately 50 mg (between 40-60 mg) of stool and place into the screw-cap-tube (weighted in point 1).
3. Weigh the tube with loop and feces inside and calculate net feces weight (between 40-60 mg).
4. Break off the loop handle or the wooden applicator stick, leaving the loop or wooden stick with feces and a 4-6 cm handle inside the screw cap tube.
5. Add ready to use extraction solution (**Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, with final weight/volume ratio 1:100), *i.e.* 50 mg feces + 4.95 ml extraction solution as described in the table below. Fecal sample concentration in the extraction solution will be 10 mg/ml. Close the tube.

Feces (mg)	Extraction solution (ml)	Feces (mg)	Extraction solution (ml)
60	5.94	45	4.45
55	5.45	40	3.96
50	4.95		

- 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 a microcentrifuge tube and centrifuge for 20 minutes at $10,000 \times g$ at room temperature.
- Transfer 0.5 ml of the clear extract supernatant to a new microcentrifuge tube. Avoid contact with the pellet as aggregates or particles may lead to erroneous calprotectin values.
- The extracts can be tested immediately or stored at the following conditions:
 - Up to 72 hours at room temperature
 - Up to 14 days at $2-8^{\circ}\text{C}$
 - Up to 90 days at -20°C . Frozen samples can be subjected to up to 4 freeze/thaw cycles

ANALYTICAL PROCEDURE

- Ensure that all reagents reach room temperature ($20-25^{\circ}\text{C}$).
- Thaw frozen sample at room temperature.
- Calprest Turbo** Reagent 1 and **Calprest Turbo** Reagent 2 are ready to use solutions filled in bottles that can be loaded directly into the Euro-Turbo Analyzer (ref. 9194). Shall the test be used on a different turbidimetric analyzer, the content of the bottles has to be transferred into bottles proprietary of the used system.
- Calprest Turbo** Calibrator vials (Calibrator 0 to 5) and **Calprest Turbo** Control vials (Control 1 and Control 2) are ready to use.
- Setting up the calibration curve:
 - For the calibration of the curve use only **Calprest Turbo** Calibrator vials. The concentration is indicated on the label of each vial.
 - Once set up, calibration curve is stable up to 30 days on board, although it is highly recommended to calibrate the system every week.
 - Recalibrate the system when reagent lot is changed or when the controls are out of the assigned range given on the control label or certificate of analysis provided with the kit.
- Quality control:
 - For quality control use **Calprest Turbo** Control 1 and **Calprest Turbo** Control 2 vials. The concentration is indicated on the label of each vial.
 - Calprest Turbo** Controls should be assayed every day before running patient fecal samples extract to validate the calibration curve.
 - If the obtained results are out of the control lot-specific indicated range, the equipment, the reagents or the technique must be reviewed.
- Running the test:
 - The methodology can be applied to the most common turbidimetric analyzer. For the list of validated turbidimetric analyzers and the relative application notes, please contact Eurospital at the following email address:

marketing.diagnostics@eurospital.it

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

- Negative results, calprotectin values lower than $50 \mu\text{g/g}$, indicate a normal presence of calprotectin in the analyzed stool samples.
- Positive results, calprotectin values higher than $120 \mu\text{g/g}$, indicate an abnormal presence of calprotectin in the analyzed stool samples. Adult patients with such results are identified with gastrointestinal inflammatory pathology that will require further investigation to diagnose the exact pathology.
- Borderline results, calprotectin values falling in the grey zone ($50-120 \mu\text{g/g}$), should be re-evaluated after 4-6 weeks.

The following chart summarizes the interpretation of results:

Calprotectin Concentration	Interpretation	Follow-Up
$< 50 \mu\text{g/g}$	Normal	None
$50 - 120 \mu\text{g/g}$	Borderline	Re-evaluate after 4-6 weeks
$> 120 \mu\text{g/g}$	Abnormal	Repeat as clinically indicated

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calprest Turbo cutoff value

- Calprotectin concentration values lower than $50 \mu\text{g/g}$ determined from stool samples are to be considered normal values, therefore not indicative of an inflammation of the gastrointestinal tract.
- Calprotectin concentration values higher than $120 \mu\text{g/g}$ determined from stool samples are indicative of an inflammation of the gastrointestinal tract.

PROZONE

Studies have been made up to a fecal calprotectin concentration of 8,000 µg/g and no false negative results have been observed. Studies using higher concentrations have not been carried out yet.

LIMITATIONS

- False negative results could occur in patients who have granulocytopenia due to bone marrow depression.
- Some patients who are taking Non-Steroid-Anti-Inflammatory-Drugs (NSAIDs) will have elevations in their fecal calprotectin levels.
- Patients with IBD fluctuate between active (inflammatory) and inactive stages of the disease. These stages must be considered when using the **Calprest Turbo** assay.
- 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.
- 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 Turbo** assay. Therefore, a diagnosis of active IBD cannot be established solely on the basis of a positive result with the **Calprest Turbo** assay.
- **Calprest Turbo** should be used for the determination of fecal calprotectin only from human stool samples. The kit is not intended to be used for different matrixes such as blood, serum, plasma, urine, cerebrospinal fluid, oral fluid, synovial fluid or empyema fluid. The use of the test on samples different than human stool has not been validated yet. The quality of the test depends also on the quality of the analyzed sample; proper fecal specimens must be obtained.
- Positive results indicate an abnormal presence of calprotectin in fecal samples. A positive result should be followed up by additional clinical investigations, such as colonoscopies and biopsies, in order to properly identify the nature of the inflammation and establish its extent.
- Fecal calprotectin is an indicator of neutrophilic presence in the stool and is not specific for IBD.
- If symptoms or situation still persist, pathology evaluation should be carried out with other alternative methods. Negative results do not exclude IBD with inflammation, some diseases such as coeliac sprue and/or microscopic colitis polyps that mainly involve mononuclear inflammation.
- Neonatal fecal calprotectin levels have been reported higher than those in normal children with a mean of 167 µg/g (range 22-860 µg/g).

INTERFERENCES AND CROSS REACTIVITY

In an evaluation to determine cross reactivity, no cross reactivity was found against other fecal markers occasionally present in feces, such as bovine serum albumin, ascorbic acid and hemin.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A method comparison study was performed between Eurospital **Calprest Turbo** and the predicate Eurospital **Calprest NG** with 97.9% diagnostic specificity and 83.1% diagnostic sensibility (when borderlines are considered as positive).

Method Comparison

One hundred and three (103) human stool samples were extracted in parallel with both **EasyCal Turbo** and **EasyCal**. The extracted stool samples were tested in duplicate for calprotectin concentration determination using the **EasyCal Turbo** with **Calprest Turbo** and **EasyCal** with **Calprest® NG** assays, according to their respective package inserts. Obtained results are summarized in Table 1 and Table 2, as well as represented in figure 1.

Method comparison EasyCal Turbo with Calprest Turbo (y) versus EasyCal with Calprest NG (x)	
Passing-Bablok regression	EasyCal Turbo with Calprest Turbo = -7.407 + 1.138 EasyCal with Calprest NG
Slope (95% CI)	1.138 (1.021 to 1.246)
Y-intercept (95% CI)	-7.407 (-14.37 to -1.100)
Correlation - r	0.924
Bias at 120 µg/g (95% CI)	7.7% (-1.2% to 14.2%)

Table 1. Quantitative comparison between the results obtained using **EasyCal Turbo** with **Calprest Turbo** and **EasyCal** with **Calprest NG** assays. Passing-Bablok regression analysis was used.

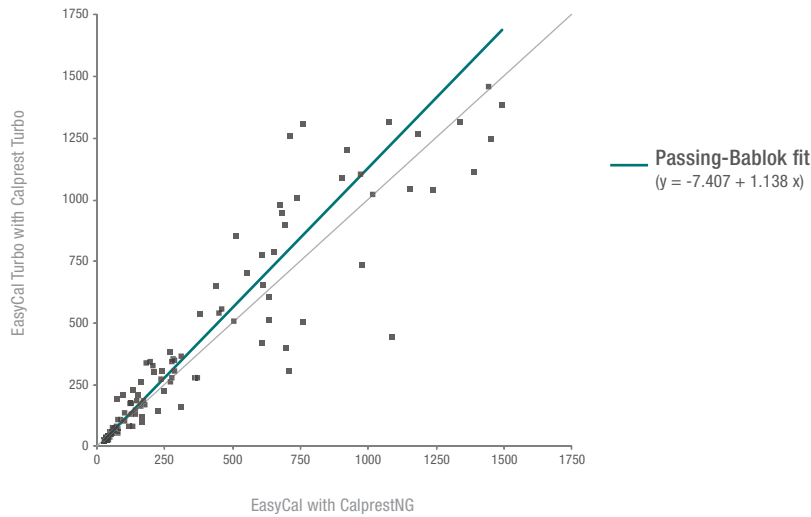


Figure 1. Regression analysis using Passing-Bablok fit comparing the results obtained using *EasyCal Turbo* with *Calprest Turbo* and *EasyCal* with *Calprest NG* assays.

Qualitative agreement of <i>EasyCal Turbo</i> with <i>Calprest Turbo</i> versus <i>EasyCal</i> with <i>Calprest NG</i>					
		<i>EasyCal Turbo</i> with <i>Calprest Turbo</i>			
		BORD	NEG	POS	Total
<i>EasyCal</i> with <i>Calprest NG</i>	BORD	15	1	4	20
	NEG	1	12	0	13
	POS	2	0	68	70
	Total	18	13	72	103
Borderline as positive					
Negative agreement (95% CI)		92.3% (66.7 - 98.6%)			
Positive agreement (95% CI)		98.9% (94.0 - 99.8%)			
Total agreement (95% CI)		98.1% (93.2 - 99.5%)			
Borderline as negative					
Negative agreement (95% CI)		87.9% (72.7 - 95.2%)			
Positive agreement (95% CI)		97.1% (90.2 - 99.2%)			
Total agreement (95% CI)		94.2% (87.9 - 97.3%)			

Table 2. Qualitative comparison between the results obtained using *EasyCal Turbo* with *Calprest Turbo* and *EasyCal* with *Calprest NG* assays analyzing the data using the borderline range as positive and negative separately.

Test immunoturbidimetrico per il rilevamento quantitativo di calprotectina da campioni fecali

REF 9300

DESTINAZIONE D'USO

Calprest® Turbo è un test turbidimetrico con particelle di lattice per la determinazione quantitativa di calprotectina fecale che 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.

PRINCIPIO DEL TEST

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. **Calprest Turbo** è un saggio turbidimetrico immunologico potenziato da particelle (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni fecali umani. Il test è stato messo a punto per essere utilizzato su diversi analizzatori automatici. È facile da usare, ampiamente applicabile ed i risultati sono ottenuti in breve tempo.

Calprest Turbo si basa sull'agglutazione *in vitro* di particelle di lattice di polistirene rivestite di anticorpi anti-calprotectina con l'antigene calprotectina presente nella soluzione analizzata. Qualora non vi fosse calprotectina nel campione, la miscela mantiene un aspetto limpido. Con la presenza della calprotectina la turbidità del mezzo aumenta a seguito dell'aggregazione dell'antigene con gli anticorpi che rivestono le particelle di lattice. Tale turbidità viene misurata come un aumento dell'assorbanza a determinate lunghezze d'onda ed è proporzionale alla quantità di calprotectina presente nel campione.

MATERIALI FORNITI (QUANTITÀ SUFFICIENTE PER ALMENO 200 TEST)

Componente	Quantità	Colore tappo	Composizione
Calprest Turbo Reagent 1	2 bottiglie x 27 ml		Reagente amplificante, pronto all'uso
Calprest Turbo Reagent 2	1 bottiglia x 8 ml		Soluzione di particelle di lattice rivestite con anticorpi contro calprotectina umana, pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 0	1 fiala x 1 ml	Giallo	Soluzione di calprotectina (0 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 1	1 fiala x 1 ml	Rosa	Soluzione di calprotectina (50 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 2	1 fiala x 1 ml	Rosso	Soluzione di calprotectina (100 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 3	1 fiala x 1 ml	Viola	Soluzione di calprotectina (250 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 4	1 fiala x 1 ml	Verde	Soluzione di calprotectina (750 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Calibrator 5	1 fiala x 1 ml	Blu	Soluzione di calprotectina (1.500 µg/g), pronta all'uso
Calprest Turbo Control 1	2 fiale x 1 ml	Bianco	Calprotectina ricombinante umana in soluzione tampone pronta all'uso, non diluire L'intervallo dei valori è stampato sull'etichetta
Calprest Turbo Control 2	2 fiale x 1 ml	Marrone	Calprotectina ricombinante umana in soluzione tampone pronta all'uso, non diluire L'intervallo dei valori è stampato sull'etichetta

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Provette per raccolta campioni.
- Contenitore per trasporto.
- Guanti monouso e attrezzatura da laboratorio.
- Dispositivo di prelievo campioni fecali (ad es. **EasyCal Turbo** ref. 9302).
- Anse per inoculazione monouso, sterili, oppure bastoncini di legno (per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Provette monouso con tappo a vite da circa 14 ml (per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Tampone di estrazione 1x (Extraction solution presente in **Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Provette tipo Eppendorf (1-1,5 ml).
- Bilancia digitale (range di misurazione 40-150 mg) (per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Agitatore Vortex.
- Agitatore basculante (per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Microcentrifuga (10.000 x g) (per la metodica di estrazione fecale manuale descritta a pag. 6).
- Pipette di precisione.

Apparecchiatura per la misurazione turbidimetrica

Qualsiasi analizzatore automatico per turbidimetria, per il protocollo specifico per lo strumento fare riferimento alla Application note.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ REAGENTI E SOLUZIONI DI LAVORO

- Tutti i reagenti e le soluzioni di lavoro devono essere conservati a 2-8°C.
- La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente.
- Evitare l'esposizione ad alte temperature, luce solare diretta o condizioni di estrema umidità.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- I campioni dei pazienti devono essere trattati in accordo con la buona pratica di laboratorio (BPL), usando appropriate precauzioni e ad ogni modo considerandoli come potenzialmente infettivi.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Il kit non contiene materiale di origine umana.
- È richiesta una persona con formazione per utilizzare l'analizzatore per tecnica turbidimetrica.
- Non scambiare i componenti di lotti diversi. Una buona performance può essere garantita solo usando componenti dello stesso lotto di **Calprest Turbo**.
- Non scambiare i tappi delle diverse fiale.
- L'analizzatore deve essere pronto all'uso prima dell'esecuzione del test.
- Qualora i risultati del test dovessero eccedere i valori dell'intervallo di misurazione, usare il tampone di estrazione 1x (Extraction solution 1x, ref. 9299) per diluire il campione e ripetere il saggio.
- Le componenti del kit non devono essere usate dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- In caso di danneggiamento dell'imballo esterno, accertarsi che siano presenti e integre tutte le componenti elencate nella sezione "Materiali forniti". In presenza di perdita di liquido dai flaconi il kit non deve essere utilizzato.
- Seguire la buona pratica di laboratorio (BPL), indossare abbigliamento protettivo, usare guanti monouso, occhiali di protezione e mascherina. Non mangiare, bere o fumare nell'area di lavoro.
- Tutti i campioni devono essere trattati come potenzialmente pericolosi e maneggiati alla stregua di agenti infettivi.
- Le soluzioni devono essere eliminate dopo l'utilizzo in un apposito contenitore, secondo le regolamentazioni locali.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Raccolta casuale del campione. Raccogliere una quantità sufficiente di campione fecale umano. I campioni devono essere raccolti in un contenitore monouso asciutto e pulito (senza conservanti o soluzioni di trasporto). Campioni fecali molli o liquidi sono comunque accettati in quanto la normalizzazione al peso fecale è parte del calcolo dei risultati. Da evitare la raccolta di campioni fecali da pannolini a meno che la raccolta non possa avvenire da una porzione non in contatto diretto col materiale del 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 7 giorni prima di essere testato. Se non testati immediatamente, congelare 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. L'utente può scegliere il metodo di preparazione del campione preferito.

A. Preparazione del campione con **EasyCal Turbo**

1. Per la procedura di raccolta/estrazione, si prega di consultare le istruzioni per l'uso di **EasyCal Turbo** ref. 9302.
2. A seguito della procedura di estrazione, l'estratto fecale è pronto per essere testato. Inserire il tubo di **EasyCal Turbo** (privo di imbuto e asta sagomata) direttamente nell'analizzatore turbidimetrico, oppure trasferire il surnatante in un adattatore dello strumento utilizzato (non fornito) per iniziare la procedura analitica.
3. Se l'estratto non viene analizzato immediatamente, può essere conservato come indicato nelle istruzioni per l'uso di **EasyCal Turbo** (Ref. 9302).

B. Preparazione del campione manuale

Per ciascun campione da testare, usare una provetta da centrifuga con tappo a vite. Contrassegnare le provette con nome o numero del paziente.

1. Pesare (tara) la provetta con tappo a vite assieme all'ansa da inoculazione o al bastoncino di legno.
2. Mescolare bene le feci con l'ansa da inoculazione o con il bastoncino di legno in modo da omogenizzare al meglio il campione. Con l'ansa da inoculo (o bastoncino) prelevare approssimativamente 50 mg (tra 40 e 60 mg) di feci e metterli nella provetta con tappo a vite (pesata nel punto 1).
3. Pesare la provetta (contenente l'ansa ed il campione) e calcolare il peso netto delle feci (tra 40 e 60 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 il tampone di estrazione pronto all'uso (**Calprest Turbo** kit di estrazione ref. 9299, con rapporto peso/volume finale 1:100), per esempio 50 mg feci + 4,95 ml di tampone di estrazione, come descritto nella tabella sottostante. La concentrazione del campione fecale nella soluzione di estrazione sarà di 10 mg/ml. Chiudere la provetta.

Feci (mg)	Tampone di estrazione (ml)	Feci (mg)	Tampone di estrazione (ml)
60	5,94	45	4,45
55	5,45	40	3,96
50	4,95		

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 $10.000 \times g$ 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 conservato alle seguenti condizioni:
 - Fino a 72 ore a temperatura ambiente
 - Fino a 14 giorni a $2-8^{\circ}\text{C}$
 - Fino a 90 giorni a -20°C . I campioni congelati possono essere utilizzati per un massimo di 4 cicli di congelamento/scongelo

PROCEDURA ANALITICA

1. Assicurarsi che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$).
2. Scongelo i campioni e portarli a temperatura ambiente.
3. **Calprest Turbo** Reagent 1 e **Calprest Turbo** Reagent 2 sono soluzioni pronte all'uso in bottiglie che possono essere caricate direttamente nell' Eu-Turbo Analyzer (ref. 9194). Qualora il test dovesse essere utilizzato su un diverso analizzatore turbidimetrico, il contenuto delle bottiglie deve essere trasferito in bottiglie proprietarie del sistema utilizzato.
4. Le fiale dei calibratori **Calprest Turbo** Calibrator (Calibrator da 0 a 5) e le fiale dei controlli **Calprest Turbo** Control (Control 1 e Control 2) sono pronte all'uso.
5. **Impostare la curva di calibrazione:**
 - 5.1 Per la curva di calibrazione usare solo le fiale dei calibratori **Calprest Turbo** Calibrator. La concentrazione è indicata sull'etichetta di ciascuna fiala.
 - 5.2 Una volta impostata, la curva è stabile a bordo fino a 30 giorni, sebbene sia altamente raccomandabile calibrare il sistema almeno settimanalmente.
 - 5.3 Ricalibrare il sistema ad ogni cambio lotto o qualora i controlli dovessero uscire dai limiti indicati sulle etichette dei controlli stessi o sul certificato d'analisi fornito con il kit.
6. **Controllo di qualità:**
 - 6.1 Per il controllo di qualità usare le fiale dei controlli **Calprest Turbo** Control 1 e **Calprest Turbo** Control 2. La concentrazione è indicata sull'etichetta di ciascuna fiala.
 - 6.2 Si consiglia di testare i controlli **Calprest Turbo** Control ogni giorno prima di testare campioni fecali di pazienti, in modo da validare la curva di calibrazione.
 - 6.3 Qualora i valori ottenuti dovessero risultare fuori dai limiti lotto-specifici, si consiglia di revisionare la strumentazione, i reagenti e la tecnica utilizzata.
7. **Eseguire il test:**
 - 7.1 La metodica può essere applicata ai più comuni analizzatori turbidimetrici. Per la lista degli strumenti validati e le relative note applicative (Application note), si prega di contattare Eurospital al seguente indirizzo email:

marketing.diagnostics@eurospital.it

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Risultati negativi, vale a dire valori di calprotectina minori di $50 \mu\text{g/g}$, indicano un normale livello di calprotectina nel campione fecale analizzato.
- Risultati positivi, vale a dire valori di calprotectina superiori di $120 \mu\text{g/g}$, indicano un'anormale presenza di calprotectina nel campione fecale analizzato. Individui adulti che presentano questi valori sono identificati come pazienti con patologie gastrointestinali infiammatorie che richiedono ulteriori analisi per poter diagnosticare la patologia esatta.
- Risultati borderline, con valori di calprotectina nella zona grigia ($50-120 \mu\text{g/g}$), devono essere analizzati nuovamente dopo 4-6 settimane.

La seguente tabella riassume l'interpretazione dei risultati:

Concentrazione calprotectina	Interpretazione	Follow-Up
$< 50 \mu\text{g/g}$	Normale	Nessuno
$50 - 120 \mu\text{g/g}$	Borderline	Ri-analizzare dopo 4-6 settimane
$> 120 \mu\text{g/g}$	Anormale	Ripetere secondo indicazioni cliniche

Ulteriori valutazioni, compresi pazienti asintomatici, così come pazienti con IBS (da differenziare da IBD), assieme a studi internazionali, hanno confermato l'appropriatezza di questi valori.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Valore di cutoff di *Calprest Turbo*:

- Concentrazioni di calprotectina determinate da campioni fecali, risultanti essere minori di 50 µg/g, sono da considerarsi normali, di conseguenza non indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale.
- Concentrazioni di calprotectina determinate da campioni fecali, risultanti essere maggiori di 120 µg/g, sono indicative di una infiammazione del tratto gastrointestinale.

PROZONA

Sono stati eseguiti studi con valori di calprotectina fino a 8.000 µg/g, senza aver osservato risultati falsi negativi. Non sono stati eseguiti studi con concentrazioni maggiori di calprotectina.

LIMITI

- Pazienti con agranulocitosi possono generare segnali falsi negativi dovuti alla scarsa produzione di neutrofili da parte del midollo osseo.
- Alcuni pazienti che assumono Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei, presentano un aumento dei livelli di calprotectina fecale.
- 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 Turbo*.
- 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.
- 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 Turbo*, pertanto la diagnosi di MICI (IBD) attiva non può essere basata unicamente sulla positività al saggio *Calprest Turbo*.
- *Calprest Turbo* dovrebbe essere usato per la determinazione di calprotectina fecale solo da campioni fecali umani. Il kit non è stato progettato per essere usato su altre matrici come sangue, siero, plasma, urine, fluido cerebrospinale, fluido orale, fluido spinale o empiema. L'utilizzo del test su campioni diversi dalle feci umane non è stato ancora validato. La qualità del test dipende anche dalla qualità del campione analizzato; è necessario ottenere campioni fecali appropriati.
- Un risultato positivo indica una presenza anormale di calprotectina nei campioni fecali. Ad un risultato positivo dovrebbe seguire un'investigazione clinica aggiuntiva, come ad es. colonoscopia o biopsia, in modo da identificare adeguatamente la natura dell'infiammazione e stabilire la sua estensione.
- La calprotectina fecale è un indicatore della presenza di neutrofili nelle feci e non è specifica per le MICI (IBD).
- Qualora i sintomi dovessero persistere, la valutazione della patologia dovrebbe essere condotta con metodi alternativi. Risultati negativi non escludono MICI (IBD) con infiammazione, alcune patologie come la celiachia e/o polipi colitici microscopici in cui prendono parte infiammazioni mononucleari.
- Livelli di calprotectina fecale neonatale sono stati osservati essere più elevati rispetto a bambini normali con una media di 167 µg/g (intervallo 22-860 µg/g).

INTERFERENZE E CROSS REATTIVITÀ

In una valutazione per determinare la cross reattività, nessuna cross reattività è stata rilevata contro altri marcatori fecali occasionalmente presenti nelle feci, come ad es. albumina di siero bovino, acido ascorbico ed emina.

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

È stato eseguito uno studio di confronto tra metodi, comparando *Calprest Turbo* di Eurospital con il predicato *Calprest NG* di Eurospital riportante una specificità diagnostica del 97,9% ed una sensibilità diagnostica dell'83,1% (quando i borderline vengono considerati come positivi).

Comparazione del metodo

Cento tre (103) campioni fecali umani sono stati estratti in parallelo con *EasyCal Turbo* e *EasyCal*. I campioni di feci sono estratti in doppio per determinare la concentrazione della calprotectina utilizzando *EasyCal Turbo* con *Calprest Turbo* e *EasyCal* con *Calprest® NG*, in accordo con i rispettivi foglietti illustrativi. I risultati ottenuti, sono riassunti in Tabella 1 e Tabella 2 e rappresentati in Figura 1.

EasyCal Turbo con Calprest Turbo (y) contro EasyCal con Calprest NG (x)	
Regressione Passing-Bablok	<i>EasyCal Turbo</i> con <i>Calprest Turbo</i> = -7,407 + 1,138 <i>EasyCal</i> con <i>Calprest NG</i>
Pendenza (95% CI)	1,138 (1,021 a 1,246)
Intercetta-Y (95% CI)	-7,407 (-14,37 a -1,100)
Correlazione - r	0.924
Bias a 120 µg/g (95% CI)	7,7% (-1,2% a 14,2%)

Tabella 1. Comparazione quantitativa tra i risultati ottenuti utilizzando *EasyCal Turbo* con *Calprest Turbo* e *EasyCal* con *Calprest NG*. Viene applicata l'analisi di regressione Passing-Bablok.

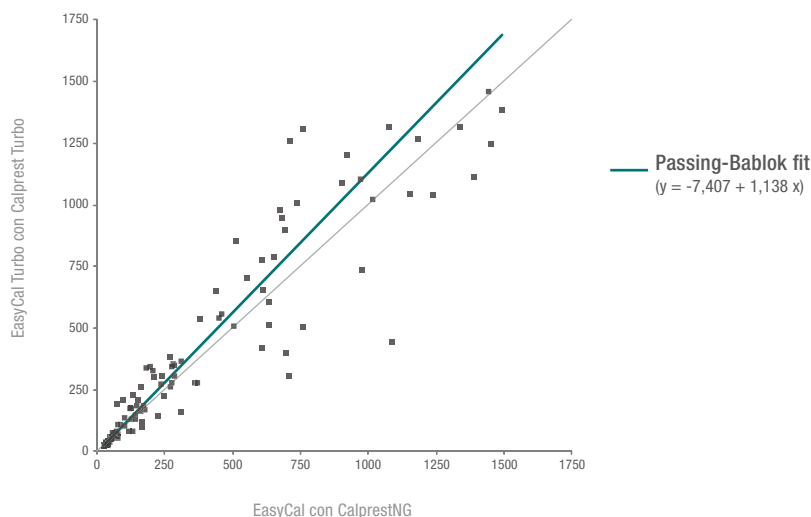


Figura 1. Analisi di regressione usando l' idoneità Passing-Bablok comparando i risultati ottenuti utilizzando **EasyCal Turbo** con **Calprest Turbo** e **EasyCal** con **Calprest NG**.

Concordanza qualitativa di EasyCal Turbo con Calprest Turbo contro EasyCal con Calprest NG

		EasyCal Turbo con Calprest Turbo			
		BORD	NEG	POS	Totale
EasyCal con Calprest NG	BORD	15	1	4	20
	NEG	1	12	0	13
	POS	2	0	68	70
	Totale	18	13	72	103

Borderline considerati positivi	
Concordanza negativa (95% CI)	92,3% (66,7 - 98,6%)
Concordanza positiva (95% CI)	98,9% (94,0 - 99,8%)
Concordanza totale (95% CI)	98,1% (93,2 - 99,5%)
Borderline considerati negativi	
Concordanza negativa (95% CI)	87,9% (72,7 - 95,2%)
Concordanza positiva (95% CI)	97,1% (90,2 - 99,2%)
Concordanza totale (95% CI)	94,2% (87,9 - 97,3%)

Tabella 2. Comparazione qualitativa tra i risultati ottenuti utilizzando **EasyCal Turbo** con **Calprest Turbo** e **EasyCal** con **Calprest NG** analizzando i dati utilizzando l'intervallo limite come positivo e negativo.

Dosage immunoturbidimétrique pour la détection quantitative de la calprotectine à partir d'échantillons fécaux

REF 9300

UTILISATION PRÉVUE

Calprest® Turbo est un test turbidimétrique avec des particules de latex pour la détermination quantitative de calprotectine fécale, qui peut être utilisé comme complément diagnostique *in vitro* pour le diagnostic des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI ou IBD), de la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse et les distinguer du Syndrome de l'Intestin Irritable (SII ou IBS) associant l'interprétation du résultat du test aux informations cliniques du patient et des autres analyses de laboratoire.

PRINCIPE DU TEST

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.

Calprest Turbo est un essai turbidimétrique immunologique renforcé par des particules (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) pour la détermination quantitative de la calprotectine dans des échantillons de selles humaines. Le test a été mis au point pour être utilisé sur différents dispositifs d'analyse automatiques. Il est facile à utiliser, amplement applicable et les résultats s'obtiennent rapidement. **Calprest Turbo** se base sur l'agglutination *in vitro* de particules de latex de polystyrène revêtues d'anticorps anti-calprotectine avec l'antigène calprotectine présent dans la solution analysée. S'il n'y a pas de calprotectine dans l'échantillon, le mélange conserve un aspect limpide. En présence de calprotectine, la turbidité du mélange augmente suite à l'agrégation de l'antigène avec les anticorps qui revêtent les particules de latex. Cette turbidité est mesurée comme une augmentation de l'absorbance à certaines longueurs d'onde et est proportionnelle à la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon.

MATÉRIEL FOURNI (QUANTITÉ SUFFISANTE POUR AU MOINS 200 TESTS)

Composant	Quantité	Bouchon couleur	Composition
Calprest Turbo Reagent 1	2 bouteilles x 27 ml		Réactif amplifiant, prêt à l'emploi
Calprest Turbo Reagent 2	1 bouteille x 8 ml		Solution de particules de latex revêtues avec des anticorps contre la calprotectine humaine. Prête à l'emploi
Calprest Turbo Calibrator 0	1 flacon x 1 ml	Jaune	Solution de calprotectine (0 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 1	1 flacon x 1 ml	Rose	Solution de calprotectine (50 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 2	1 flacon x 1 ml	Rouge	Solution de calprotectine (100 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 3	1 flacon x 1 ml	Violet	Solution de calprotectine (250 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 4	1 flacon x 1 ml	Vert	Solution de calprotectine (750 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Calibrator 5	1 flacon x 1 ml	Bleu	Solution de calprotectine (1.500 µg/g), ready to use
Calprest Turbo Control 1	2 flacons x 1 ml	Blanc	Calprotectine humaine recombinante en solution tampon, prêt à l'emploi, ne pas diluer La plage des valeurs est imprimée sur l'étiquette
Calprest Turbo Control 2	2 flacons x 1 ml	Marron	Calprotectine humaine recombinante en solution tampon, prêt à l'emploi, ne pas diluer La plage des valeurs est imprimée sur l'étiquette

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Tubes pour la collecte des échantillons.
- Conteneur pour le transport.
- Gants à usage unique et équipement de laboratoire.
- Dispositif de prélèvement des échantillons de selles (par ex. **EasyCal Turbo** ref. 9302).
- Anses d'inoculation jetables, stériles ou bâtonnets en bois (pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Tubes à usage unique avec bouchon à vis d'environ 14 ml (pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Tampon d'extraction 1X (Extraction solution présent dans le **Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Tubes de type Eppendorf (1-1,5 ml).
- Balance de précision numérique (plage de mesure 40-150 mg) (pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Agitateur Vortex.
- Agitateur à rouleaux (pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Micro centrifugeuse (10.000 x g) (pour la méthode d'extraction fécale manuelle décrite à la page 10).
- Pipettes de précision.

Dispositif pour la mesure turbidimétrique

Tout dispositif d'analyse automatique de turbidimétrie, pour le protocole spécifique à l'instrument faire référence à l'Application note.

CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS ET SOLUTIONS DE TRAVAIL

- Tous les réactifs et les solutions de travail doivent être conservés à 2-8°C.
- La date d'expiration est imprimée sur l'étiquette de chaque élément.
- Éviter l'exposition à des températures élevées, à la lumière solaire directe ou à des conditions de très forte humidité.

PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- Les échantillons patients doivent être traités conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), en utilisant des précautions appropriées et en les considérant dans tous les cas comme potentiellement infectieux.
- Pour usage diagnostique *in vitro*.
- Le kit ne contient pas de matériel d'origine humaine.
- Une personne ayant reçu une formation appropriée devra être chargée d'utiliser le dispositif d'analyse avec technique turbidimétrique.
- Ne pas échanger les éléments de lots différents. Une bonne performance peut être garantie seulement en utilisant les éléments du même lot de **Calprest Turbo**.
- Ne pas échanger les bouchons des différents flacons.
- Le dispositif d'analyse doit être prêt à l'emploi avant l'exécution du test.
- Si les résultats du test dépassent les valeurs de l'intervalle de mesure, utiliser le tampon d'extraction 1X (Extraction solution 1X, ref. 9299) pour diluer l'échantillon et répéter l'essai.
- Les éléments du kit ne doivent pas être utilisés après la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Si l'emballage extérieur est endommagé, s'assurer que tous les éléments indiqués dans la rubrique matériel fourni sont présents et intacts. En cas de fuite de liquide des flacons, le kit ne doit pas être utilisé.
- Suivre les bonnes pratiques de laboratoire (BPL), porter des vêtements de protection, des gants à usage unique, des lunettes de protection et un masque. Ne pas manger, boire ou fumer dans l'espace de travail.
- Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement dangereux et manipulés comme des agents infectieux.
- Les solutions doivent être éliminées après l'utilisation dans un conteneur prévu à cet effet, conformément aux réglementations locales.

COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

Collecte aléatoire de l'échantillon. Collecter une quantité suffisante d'échantillon de selles humaines. Les échantillons doivent être collectés dans un conteneur jetable sec et propre (sans conservateurs ou solutions de transport). Les échantillons de selles molles ou liquides sont acceptés car la normalisation au poids fécal fait partie du calcul des résultats. Il faut éviter la collecte d'échantillons de selles sur les couches, sauf si la collecte peut s'effectuer sur une partie qui n'est pas directement en contact avec le matériau de la couche.

Caractéristiques de l'échantillon

Prélever environ 1-5 g de selles et les placer dans un conteneur adéquat. Aucun conservateur n'est nécessaire.

Transport de l'échantillon

L'échantillon de selles doit être reçu et extrait par le laboratoire sous 10 jours à compter du prélèvement. La température pendant le transport ne devrait jamais dépasser les 30°C.

Conservation de l'échantillon

L'échantillon de selles en laboratoire peut être conservé à 2-8°C pendant 7 jours avant d'être testé. S'ils ne sont pas testés immédiatement, congeler les échantillons de selles à -20°C.

PROCÉDURE

Préparation de l'échantillon

Décongeler les échantillons de selles et s'assurer que tous les réactifs atteignent la température ambiante (20-25°C).

Il existe deux différentes méthodes de préparation des échantillons de selles, manuelle ou avec l'utilisation du dispositif d'extraction fécale. L'utilisateur peut choisir la méthode de préparation de l'échantillon qu'il préfère.

A. Préparation de l'échantillon avec **EasyCal Turbo**

1. Pour la procédure de collecte/extraction, nous vous prions de consulter le notice d'utilisation de **EasyCal Turbo** ref. 9302.
2. Suite à la procédure d'extraction, l'extrait fécal est prêt à être testé. Insérer le tube d'**EasyCal Turbo** (sans entonnoir et sans sonde) directement dans l'analyseur turbidimétrique ou transférer le surnageant dans un adaptateur du dispositif utilisé (non fourni) pour commencer la procédure d'analyse.
3. Si l'extrait n'est pas analysé immédiatement, il peut être conservé selon la notice d'utilisation de **EasyCal Turbo** (Ref. 9302).

B. Préparation manuelle de l'échantillon

Pour chaque échantillon à tester, utiliser un tube de centrifugeuse avec bouchon à vis. Marquer sur les tubes le nom ou le numéro du patient.

1. Peser (tare) le tube avec bouchon à vis avec l'anse d'inoculation ou le bâtonnet en bois.
2. Bien mélanger les selles avec l'anse d'inoculation ou avec le bâtonnet en bois de façon à homogénéiser au mieux l'échantillon. Avec l'anse d'inoculation (ou le bâtonnet), prélever à peu près 50 mg (entre 40 et 60 mg) de selles et les mettre dans le tube avec bouchon à vis (pesé au point 1).
3. Peser le tube (contenant l'anse et l'échantillon) et calculer le poids net des selles (entre 40 et 60 mg).
4. Casser le manche de l'anse en laissant la partie inférieure avec les selles et 4-6 cm du manche à l'intérieur du tube.
5. Ajouter le tampon d'extraction prêt à l'emploi (**Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, avec un rapport poids / volume finale 1:100), par exemple 50 mg de selles + 4,95 ml de tampon d'extraction, tel que cela est décrit dans le tableau ci-dessous. La concentration d'échantillon fécal dans la solution d'extraction sera de 10 mg / ml. Fermer le tube.

Selles (mg)	Tampon d'extraction (ml)	Selles (mg)	Tampon d'extraction (ml)
60	5,94	45	4,45
55	5,45	40	3,96
50	4,95		

6. Agiter/mélanger vigoureusement au vortex pendant 30 secondes.
7. Homogénéiser pendant 25 ± 5 minutes à l'aide de l'agitateur. L'anse à l'intérieur du tube fera fonction d'agitateur.
8. Transférer l'extrait obtenu (1 ml) dans un tube de type Eppendorf et centrifuger pendant 20 minutes à 10000 x g à température ambiante en utilisant une centrifugeuse de table.
9. Transférer 0,5 ml de surnageant clair dans un tube neuf de type Eppendorf. Éviter le contact avec le culot car des agrégats ou des particules déposés peuvent générer des valeurs de calprotectine erronées.
10. Les extraits peuvent être testés immédiatement ou conservés dans les conditions suivantes:
 - Jusqu'à 72 heures à la température ambiante
 - Jusqu'à 14 jours à 2-8°C
 - Jusqu'à 90 jours à -20°C. Les échantillons congelés peuvent être soumis à 4 cycles de congélation/décongélation maximum

PROCÉDURE D'ANALYSE

1. S'assurer que tous les réactifs atteignent la température ambiante (20-25°C).
2. Décongeler les échantillons et les porter à température ambiante.
3. **Calprest Turbo** Reagent 1 et **Calprest Turbo** Reagent 2 sont des solutions prêtes à l'emploi remplies dans des bouteilles qui peuvent être chargées directement dans l'Eu-Turbo Analyzer (réf. 9194). Si le test est utilisé sur un autre analyseur turbidimétrique, le contenu des flacons doit être transféré dans des flacons propriétaires du système utilisé.
4. Les flacons des calibrateurs **Calprest Turbo** Calibrator (Calibrator de 0 à 5) et les flacons des contrôles **Calprest Turbo** Control (Control 1 et Control 2) sont prêts à l'emploi.
5. Paramétrer la courbe d'étalonnage:
 - 5.1 Pour la courbe d'étalonnage, utiliser seulement les flacons des calibrateurs **Calprest Turbo** Calibrator. La concentration est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.
 - 5.2 Une fois paramétrée, la courbe est stable jusqu'à 30 jours, bien qu'il soit fortement recommandé d'étalonner le système au moins une fois par semaine.
 - 5.3 Étalonner à nouveau le système à chaque changement de lot ou si les contrôles sortaient des limites indiquées sur les étiquettes des contrôles eux-mêmes ou sur les certificats d'analyse fournis avec le kit.
6. Contrôle qualité:
 - 6.1 Pour le contrôle qualité, utiliser les flacons des contrôles **Calprest Turbo** Control 1 et **Calprest Turbo** Control 2. La concentration est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.
 - 6.2 Nous conseillons de tester les contrôles **Calprest Turbo** Control chaque jour avant de tester les échantillons de selles de patients, de façon à valider la courbe d'étalonnage.
 - 6.3 Si les valeurs obtenues dépassent les limites lots-spécifiques, nous conseillons de réviser les instruments, les réactifs et la technique utilisée.
7. Effectuer le test:
 - 7.1 La méthode peut être appliquée aux analyseurs turbidimétriques les plus communs. Pour la liste des instruments validés et les notes d'application relatives (Application note), nous vous prions de contacter Eurospital à l'adresse e-mail ci-dessous:

marketing.diagnostica@eurospital.it

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Les résultats négatifs, c'est-à-dire des valeurs de calprotectine inférieures à 50 µg/g, indiquent un niveau de calprotectine normal dans l'échantillon de selles analysé.
- Les résultats positifs, c'est-à-dire des valeurs de calprotectine supérieures à 120 µg/g, indiquent une présence de calprotectine anormale dans l'échantillon de selles analysé. Les adultes présentant ces valeurs sont identifiés comme des patients souffrant de maladies gastro-intestinales inflammatoires qui requièrent des analyses complémentaires afin de pouvoir diagnostiquer la pathologie exacte.
- Les résultats borderline, avec des valeurs de calprotectine dans la zone grise (50 - 120 µg/g), doivent être analysés à nouveau dans un délai de 4-6 semaines.

Le tableau suivant résume l'interprétation des résultats:

Concentration de calprotectine	Interprétation	Suivi
< 50 µg/g	Normal	Aucun
50 - 120 µg/g	Borderline	Ré-analyser dans un délai de 4-6 semaines
> 120 µg/g	Anormal	Répéter selon les indications cliniques

D'autres évaluations, y compris de patients asymptomatiques ainsi que de patients souffrant d'un IBS (à différencier des IBD), combinées à des études internationales, ont confirmé le caractère adéquat de ces valeurs.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Valeur de cutoff de *Calprest Turbo*:

- Les concentrations de calprotectine déterminées d'échantillons de selles inférieures à 50 µg/g doivent être considérées normales donc n'indiquant pas une inflammation de l'appareil gastro-intestinal.
- Les concentrations de calprotectine déterminées d'échantillons de selles supérieures à 120 µg/g doivent être considérées comme indicatrices d'une inflammation de l'appareil gastro-intestinal.

PROZONE

Des études ont été menées avec des valeurs de calprotectine jusqu'à 8.000 µg/g, sans avoir observé de faux négatifs. Aucune étude avec des concentrations majeures de calprotectine n'ont été menées.

LIMITES

- Les patients ayant une agranulocytose peuvent obtenir de faux négatifs dus à la production insuffisante de neutrophiles de la part de la moelle osseuse.
- Certains patients qui prennent des Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) verront leur taux de calprotectine fécale augmenter.
- Les patients souffrant de MICI (IBD) oscillent entre phases actives (inflammation) et inactives de la maladie. Il faut tenir compte de ces phases lorsque l'on utilise l'essai *Calprest Turbo*.
- L'utilisation d'Inhibiteurs de la Pompe à Protons (IPP), colites microscopiques ou maladies diverticulaires peuvent porter à une augmentation des niveaux de calprotectine. Les patients atteints de la maladie coeliaque non traitée peuvent avoir, occasionnellement, des niveaux de calprotectine élevés.
- D'autres dysfonctionnements intestinaux, y compris les infections gastro-intestinales et les tumeurs colorectales, peuvent augmenter les niveaux de calprotectine. Les échantillons de ces patients peuvent résulter positifs au test *Calprest Turbo*, par conséquent le diagnostic de MICI (IBD) active ne peut être basé uniquement sur la positivité à l'essai *Calprest Turbo*.
- *Calprest Turbo* devrait être utilisé pour la détermination de la calprotectine fécale seulement dans des échantillons de selles humaines. Le kit n'a pas été conçu pour être utilisé sur d'autres matrices telles que sang, plasma, urines, liquide cébrospinal, liquide oral, liquide spinal ou émyème. L'utilisation du test sur des échantillons autres que des selles humaines n'a pas encore été validée. La qualité du test dépend aussi de la qualité de l'échantillon analysé; il est nécessaire d'obtenir des échantillons de selles adéquats.
- Un résultat positif indique une présence anormale de calprotectine dans les échantillons de selles. Un résultat positif devrait être suivi d'une recherche clinique complémentaire, comme par exemple une coloscopie ou une biopsie, de manière à identifier de façon appropriée la nature de l'inflammation et établir son étendue.
- La calprotectine fécale est un indicateur de la présence de neutrophiles dans les selles et n'est pas spécifique aux MICI (IBD).
- Si les symptômes persistent, l'évaluation de la pathologie devrait être menée avec des méthodes alternatives. Les résultats négatifs n'excluent pas une MICI (IBD) avec inflammation, certaines pathologies comme la maladie coeliaque et/ou des polypes coliques microscopiques qui impliquent des inflammations mononucléaires.
- Les niveaux de calprotectine fécale néonatale ont été observés comme plus élevés par rapport aux enfants normaux, avec une moyenne de 167 µg/g (plage 22-860 µg/g).

INTERFÉRENCES ET CROSS-RÉACTIVITÉ

Dans une évaluation visant à déterminer la cross-réactivité, aucune cross-réactivité n'a été relevée contre d'autres marqueurs fécaux présents occasionnellement dans les selles, comme par exemple l'albumine de sérum bovin, l'acide ascorbique et l'héméine.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Une étude de comparaison de méthodes a été réalisée comparant le *Calprest Turbo* d'Eurospital et le prédicat *Calprest NG* d'Eurospital avec une spécificité diagnostique de 97,9% et une sensibilité diagnostique de 83,1% (lorsque les limites sont considérées comme positives).

Méthode de comparaison

Cent trois (103) échantillons de selles humaines ont été extraits en parallèle avec *EasyCal Turbo* et *EasyCal*. Les échantillons de selles extraits ont été testés en double pour la détermination de la concentration de calprotectine en utilisant les tests *EasyCal Turbo* avec *Calprest Turbo* et *EasyCal* avec *Calprest® NG*, conformément à leurs notices d'emballage respectives. Les résultats obsolètes sont résumés dans les tableaux 1 et 2, ainsi que représentés sur la figure 1.

Comparaison des méthodes *EasyCal Turbo* avec *Calprest Turbo* (y) et *EasyCal* avec *Calprest NG* (x)

Régression de Passing-Bablok	<i>EasyCal Turbo</i> avec <i>Calprest Turbo</i> = -7,407 + 1,138 <i>EasyCal</i> avec <i>Calprest NG</i>
Pente (95% CI)	1,138 (1,021 à 1,246)
Y-intercept (95% CI)	-7,407 (-14,37 à -1,100)
Corrélation - r	0.924
Biais à 120 µg/g (95% CI)	7,7% (-1,2% à 14,2%)

Tableau 1. Comparaison quantitative entre les résultats obtenus avec *EasyCal Turbo* avec *Calprest Turbo* et *EasyCal* avec *Calprest NG*. Une analyse de régression Passing-Bablok a été utilisée.

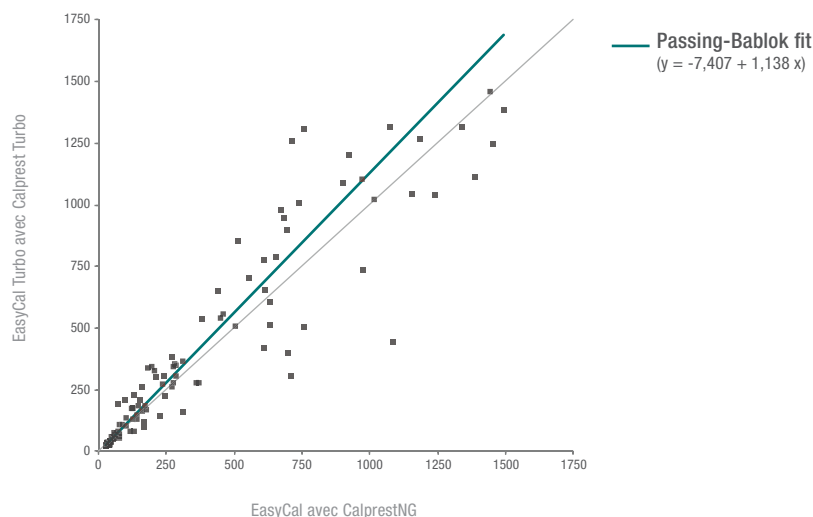


Figure 1. Analyse de régression Passing-Bablok comparant les résultats obtenus en utilisant les tests *EasyCal Turbo* avec *Calprest Turbo* et *EasyCal* avec *Calprest NG*.

Concordance qualitative de EasyCal Turbo avec Calprest Turbo contre EasyCal avec Calprest NG					
		EasyCal Turbo avec Calprest Turbo			
		BORD	NEG	POS	Total
EasyCal avec Calprest NG	BORD	15	1	4	20
	NEG	1	12	0	13
	POS	2	0	68	70
	Total	18	13	72	103

Valeurs limites d'échantillons considérés comme positifs	
Concordance négatif (95% CI)	92,3% (66,7 - 98,6%)
Concordance positif (95% CI)	98,9% (94,0 - 99,8%)
Concordance total (95% CI)	98,1% (93,2 - 99,5%)

Valeurs limites d'échantillons considérés comme négatifs	
Concordance négatif (95% CI)	87,9% (72,7 - 95,2%)
Concordance positif (95% CI)	97,1% (90,2 - 99,2%)
Concordance total (95% CI)	94,2% (87,9 - 97,3%)

Tableau 2. Comparaison qualitative entre les résultats obtenus avec les tests *EasyCal Turbo* avec *Calprest Turbo* et *EasyCal* avec *Calprest NG* analysant les données en utilisant la plage limite comme positive et négative séparément.

INTENCIÓN DE USO

Calprest® Turbo es un ensayo turbidimétrico con partículas de látex para la detección cuantitativa de calprotectina fecal que puede utilizarse como complemento de diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica (EII), la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, y distinguirlas del Síndrome de Intestino Irritable (SII), combinando la interpretación del resultado del ensayo con la información clínica del paciente y otras pruebas de laboratorio.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

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.

Calprest Turbo es un inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas. La prueba ha sido desarrollada para su uso en varios analizadores automatizados. Es fácil de usar, se aplica ampliamente y los resultados se obtienen en poco tiempo. **Calprest Turbo** se basa en la aglutinación *in vitro* de partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpos anti-calprotectina y el antígeno calprotectina presente en la solución analizada. Si no hay calprotectina en la muestra, la mezcla mantiene un aspecto claro. Con la presencia de calprotectina la turbidez del medio aumenta como resultado de la agregación del antígeno con los anticuerpos que recubren las partículas de látex. Esta turbidez se mide como un aumento de la absorbancia a ciertas longitudes de onda y es proporcional a la cantidad de calprotectina presente en la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS (CANTIDAD SUFICIENTE PARA AL MENOS 200 ENSAYOS)

Componente	Cantidad	Color de tapa	Composición
Calprest Turbo Reagent 1	2 botellas x 27 ml		Reactivo amplificador, listo para usar
Calprest Turbo Reagent 2	1 botella x 8 ml		Solución de partículas de látex recubiertas de anticuerpos contra la calprotectina humana; listo para usar
Calprest Turbo Calibrator 0	1 tubos x 1 ml	Amarillo	Solución de calprotectina (0 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Calibrator 1	1 tubos x 1 ml	Rosa	Solución de calprotectina (50 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Calibrator 2	1 tubos x 1 ml	Rojo	Solución de calprotectina (100 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Calibrator 3	1 tubos x 1 ml	Púrpura	Solución de calprotectina (250 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Calibrator 4	1 tubos x 1 ml	Verde	Solución de calprotectina (750 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Calibrator 5	1 tubos x 1 ml	Azul	Solución de calprotectina (1.500 µg/g), listo para ser usados
Calprest Turbo Control 1	2 tubos x 1 ml	Blanco	Calprotectina humana recombinante en solución tampón, listo para usar, no lo diluya El rango de valores está impreso en la etiqueta
Calprest Turbo Control 2	2 tubos x 1 ml	Marrón	Calprotectina humana recombinante en solución tampón, listo para usar, no lo diluya El rango de valores está impreso en la etiqueta

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de recolección de muestras.
- Contenedor de transporte.
- Guantes desechables y equipo de laboratorio.
- Dispositivo de muestreo fecal (por ejemplo, **EasyCal Turbo** ref. 9302).
- Asas bacteriológicas desechables y estériles o palos de madera (para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Tubos de ensayo desechables con capuchón de rosca de aprox. 14 ml (para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Tampón de extracción 1X (Extraction solution presente en el kit **Calprest Turbo** Extraction ref. 9299, para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf (1-1,5 ml).
- Escala digital (rango de medición 40-150 mg) (para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Agitador Vortex.
- Agitador rodante (para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Microcentrifuga (10.000 x g) (para el método de extracción fecal manual descrito en la pág. 14).
- Pipetas de precisión.

Equipo de medición turbidimétrica

Cualquier analizador automático de turbidimetría; para el protocolo específico del instrumento, consulte la nota de aplicación.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS Y SOLUCIONES DE TRABAJO

- Todos los reactivos y soluciones de trabajo deben almacenarse a 2-8°C.
- La fecha de caducidad está impresa en la etiqueta de cada componente.
- Evite la exposición a altas temperaturas, la luz solar directa o condiciones de extrema humedad.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Las muestras de los pacientes deben tratarse de conformidad con las buenas prácticas de laboratorio (BPL), tomando las precauciones adecuadas y, en cualquier caso, considerándolas como potencialmente infecciosas.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- El kit no contiene material de origen humano.
- Se requiere una persona capacitada para utilizar el analizador para la técnica turbidimétrica.
- No intercambie componentes de diferentes lotes. El buen funcionamiento solo puede garantizarse utilizando componentes del mismo lote de **Calprest Turbo**.
- No intercambie los capuchones de los diferentes viales.
- El analizador debe estar listo para ser usado antes de realizar el ensayo.
- Si los resultados de la prueba exceden los valores del rango de medición, utilice el tampón de extracción 1X (Extraction solution 1X, ref. 9299) para diluir la muestra y repita el ensayo.
- Los componentes del kit no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- Si el embalaje exterior está dañado, asegúrese de que todos los componentes enumerados en la sección “Materiales suministrados” estén presentes e intactos. En caso de fuga de líquido de los frascos, el kit no debe ser utilizado.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio (BPL), lleve ropa de protección, guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No coma, beba o fume en el área de trabajo.
- Todas las muestras deben ser tratadas como potencialmente peligrosas y manipuladas como agentes infecciosos.
- Las soluciones deben ser eliminadas después de su uso en un contenedor apropiado de acuerdo con las regulaciones locales.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Muestreo aleatorio. Recoger una cantidad suficiente de muestra de heces humanas. Las muestras deben recogerse en un recipiente desechable limpio y seco (sin conservantes ni soluciones de transporte). Se aceptan muestras fecales blandas o líquidas, ya que la normalización al peso fecal forma parte del cálculo de los resultados. Las muestras fecales de los pañales no deben recogerse a menos que se recojan de una porción que no esté en contacto directo con el material del pañal.

Características de la muestra

Tome unos 1-5 g de heces y colóquelas en un recipiente adecuado. No se requieren conservantes.

Transporte de la muestra

La muestra de heces debe ser recibida y extraída por el laboratorio dentro de los 10 días siguientes a su recogida. La temperatura durante el transporte nunca debe exceder los 30°C.

Almacenamiento de la muestra

La muestra de heces en el laboratorio puede ser almacenada a 2-8°C durante 7 días antes de la prueba. Si no se analizan inmediatamente, congele las muestras de heces a -20°C.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra

Descongele las muestras de heces y asegúrese de que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C).

Hay dos métodos diferentes de preparación de muestras fecales, el manual o el uso del dispositivo de extracción fecal **EasyCal Turbo**. El usuario puede elegir el método de preparación de la muestra que prefiera.

A. Preparación de la muestra con **EasyCal Turbo**

1. Para el procedimiento de recolección/extracción, consulte las instrucciones de uso de **EasyCal Turbo** ref. 9302.
2. Después del procedimiento de extracción, el extracto fecal está listo para ser probado. Inserte el tubo de **EasyCal Turbo** (sin embudo y varilla moldeada) directamente en el analizador turbidimétrico, o transfiera el sobrenadante a un adaptador de instrumento (no suministrado) para iniciar el procedimiento analítico.
3. Si el extracto no se analiza inmediatamente, se puede almacenar de acuerdo con las instrucciones de uso de **EasyCal Turbo** (Ref. 9302).

B. Preparación de la muestra manual

Para cada muestra que se vaya a analizar, utilice un tubo de centrifuga con capuchón de rosca. Marque los tubos con el nombre o el número de paciente.

1. Pese (tara) el tubo de centrifuga con capuchón de rosca junto con el asa bacteriológica o el palo de madera.
2. Mezcle bien las heces con el asa bacteriológica o el palo de madera para homogeneizar correctamente la muestra. Utilizando el asa bacteriológica (o palo de madera), tome aproximadamente 50 mg (entre 40 y 60 mg) de heces y colóquelas en el tubo con capuchón de rosca (pesado en el punto 1).
3. Pese el tubo (que contiene el asa y la muestra) y calcule el peso neto de las heces (entre 40 y 60 mg).
4. Rompa el mango del asa, dejando la parte inferior con las heces y 4-6 cm del mango dentro del tubo.
5. Añada el tampón de extracción listo para ser usado (**Calprest Turbo** Extraction kit ref. 9299, relación peso/volumen 1:100), por ejemplo, 50 mg de heces + 4,95 ml de tampón de extracción, como se describe en la tabla siguiente. La concentración de la muestra fecal en la solución de extracción será de 10 mg / ml. Cierre el tubo.

Heces (mg)	Tampón de extracción (ml)	Heces (mg)	Tampón de extracción (ml)
60	5,94	45	4,45
55	5,45	40	3,96
50	4,95		

6. Agite/mezcle vigorosamente con el agitador vortex durante 30 segundos.
7. Homogenice durante 25 ± 5 minutos en el agitador. El asa dentro del tubo actuará como un agitador.
8. Transfiera el homogeneizado (1 ml) a un tubo tipo Eppendorf y centrifugue durante 20 minutos a $10.000 \times g$ a temperatura ambiente con una centrífuga de mesa.
9. Transfiera 0,5 ml del sobrenadante claro a un nuevo tubo tipo Eppendorf. Evite el contacto con el fondo, ya que los agregados o las partículas pueden generar valores erróneos de calprotectina.
10. El extracto puede ser analizado inmediatamente o almacenarse en las siguientes condiciones:
 - Hasta 72 horas a temperatura ambiente
 - Hasta 14 días a $2-8^{\circ}\text{C}$
 - Hasta 90 días a -20°C . Las muestras congeladas pueden utilizarse hasta para 4 ciclos de congelación/descongelación

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

1. Asegúrese de que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$).
2. Descongele las muestras y llévelas a temperatura ambiente.
3. **Calprest Turbo** Reagent 1 y **Calprest Turbo** Reagent 2 son soluciones listas para usar llenado en botellas que pueden ser cargadas directamente en el Eu-Turbo Analyzer (ref. 9194). Si la prueba se utiliza en un analizador turbidimétrico diferente, el contenido de las botellas tiene que ser transferido a botellas propias del sistema utilizado.
4. Los viales de los calibradores **Calprest Turbo** Calibrator (Calibrator 0 a 5) y los viales de **Calprest Turbo** Control (Control 1 y Control 2) están listos para su uso.
5. Ajuste la curva de calibración:
 - 5.1 Utilice solo los viales de los calibradores **Calprest Turbo** Calibrator para la curva de calibración. La concentración se indica en la etiqueta de cada vial.
 - 5.2 Una vez ajustada, la curva es estable a bordo hasta 30 días, aunque se recomienda encarecidamente calibrar el Sistema al menos semanalmente.
 - 5.3 Volver a calibrar el sistema en cada cambio de lote o si los controles superen los límites indicados en las etiquetas de control o en el certificado de análisis suministrado con el kit.
6. Control de calidad:
 - 6.1 Utilice los viales de los controles **Calprest Turbo** Control 1 y **Calprest Turbo** Control 2 para el control de calidad. La concentración se indica en la etiqueta de cada vial.
 - 6.2 Se recomienda que los controles **Calprest Turbo** Control sean probados diariamente antes de probar las muestras fecales de los pacientes para validar la curva de calibración.
 - 6.3 Si los valores obtenidos estuvieran fuera de los límites específicos del lote, se recomienda revisar la instrumentación, los reactivos y la técnica utilizados.
7. Realice el ensayo:
 - 7.1 El método puede aplicarse a los analizadores turbidimétricos más comunes. Para la lista de instrumentos validados y sus notas de aplicación (Application note), por favor contacte con Eurospital en la siguiente dirección de correo electrónico:

marketing.diagnostica@eurospital.it

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados negativos, es decir, valores de calprotectina inferiores a $50 \mu\text{g/g}$, indican un nivel normal de calprotectina en la muestra fecal analizada.
- Los resultados positivos, es decir, valores de calprotectina superiores a $120 \mu\text{g/g}$, indican un nivel anormal de calprotectina en la muestra fecal analizada. Los adultos con estos valores se identifican como pacientes con patologías inflamatorias gastrointestinales que requieren un análisis más profundo para diagnosticar la patología exacta.
- Los resultados límite con valores de calprotectina en la zona gris ($50 - 120 \mu\text{g/g}$) deben volver a analizarse después de 4-6 semanas.

En la siguiente tabla se resume la interpretación de los resultados:

Concentración de calprotectina	Interpretación	Seguimiento
$< 50 \mu\text{g/g}$	Normal	Ninguno
$50 - 120 \mu\text{g/g}$	Al límite	Volver a analizar después de 4-6 semanas
$> 120 \mu\text{g/g}$	Anormal	Repetición según las indicaciones clínicas

Otras evaluaciones, que incluyen a pacientes asintomáticos, así como a pacientes con SII (para diferenciarlo del IBD), junto con estudios internacionales,

han confirmado la idoneidad de estos valores.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Valor de cutoff de *Calprest Turbo*:

- Unas concentraciones de calprotectina determinadas a partir de muestras fecales, que resultan ser inferiores a 50 µg/g, se consideran normales y, por lo tanto, no son indicativas de inflamación del tracto gastrointestinal.
- Unas concentraciones de calprotectina determinadas a partir de muestras fecales, que resultan ser superiores a 120 µg/g, son indicativas de inflamación del tracto gastrointestinal.

PROZONA

Se realizaron estudios con valores de calprotectina de hasta 8.000 µg/g, sin observar resultados negativos falsos. No se realizaron estudios con concentraciones de calprotectina más altas.

LÍMITES

- Los pacientes con agranulocitosis pueden generar señales falsas negativas debido a la escasa producción de neutrófilos en la médula ósea.
- Algunos pacientes que toman medicamentos Antiinflamatorios No Esteroides (AINE) tendrán elevaciones en sus niveles de calprotectina fecal.
- Los pacientes con EII (IBD) pasan de etapas activas (inflamación) a inactivas de la enfermedad. Estas etapas deben tenerse en cuenta al utilizar el ensayo *Calprest Turbo*.
- El uso de Inhibidores de la Bomba de Protones (IBP), colitis microscópicas o enfermedades diverticulares pueden provocar un aumento de los niveles de calprotectina. Los pacientes con enfermedad celíaca que no están siendo tratados pueden ocasionalmente tener altos niveles de calprotectina.
- Otras disfunciones intestinales, como las infecciones gastrointestinales y el cáncer colorrectal, pueden aumentar los niveles de calprotectina. Las muestras de estos pacientes pueden dar positivo en el ensayo *Calprest Turbo*, por lo que el diagnóstico de EII (IBD) activo no puede basarse únicamente en un ensayo *Calprest Turbo* positivo.
- *Calprest Turbo* solo debería utilizarse para la determinación de la calprotectina fecal a partir de muestras de heces humanas. El kit no está diseñado para ser usado en otras matrices como sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido oral, líquido espinal o empiema. Todavía no se ha validado el uso del ensayo en muestras diferentes a las heces humanas. La calidad de la prueba depende también de la calidad de la muestra analizada; se deben obtener muestras fecales adecuadas.
- Un resultado positivo indica una presencia anormal de calprotectina en las muestras fecales. Un resultado positivo debe ser seguido por investigaciones clínicas adicionales, como una colonoscopia o una biopsia, para identificar adecuadamente la naturaleza de la inflamación y establecer su alcance.
- La calprotectina fecal es un indicador de la presencia de neutrófilos en las heces y no es específica para las EII (IBD).
- Si los síntomas persisten, la evaluación de la patología debe realizarse con otros métodos alternativos. Los resultados negativos no excluyen las EII (IBD) con inflamación, algunas enfermedades como la celiaquía y/o pólipos de colitis microscópica, que implican principalmente una inflamación mononuclear.
- Se observaron niveles de calprotectina fecal neonatal más altos que los de los niños normales, con un promedio de 167µg/g (rango 22-860 µg/g).

INTERFERENCIAS Y REACTIVIDAD CRUZADA

En una evaluación para determinar la reactividad cruzada, no se detectó ninguna reactividad cruzada contra otros marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces, como por ejemplo, la albúmina sérica bovina, el ácido ascórbico y la hemina.

CARACTERÍSTICAS DE PRESENTACIÓN

Se realizó un estudio de comparación de métodos, comparando *Calprest Turbo* de Eurospital y el predicado *Calprest NG* de Eurospital con una especificidad diagnóstica del 97,9% y una sensibilidad diagnóstica del 83,1% (cuando los límites se consideran positivos).

Comparación del método

Ciento tres (103) muestras de heces humanas se extrajeron en paralelo con *EasyCal Turbo* y *EasyCal*. Las muestras de heces se extraen por duplicado para determinar la concentración de calprotectina utilizando *EasyCal Turbo* con *Calprest Turbo* y *EasyCal* con *Calprest®NG*, de acuerdo con los folletos respectivos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2 y se representan en la Figura 1.

EasyCal Turbo con Calprest Turbo (y) versus EasyCal con Calprest NG (x)	
Regresión de Passing-Bablok	<i>EasyCal Turbo</i> con <i>Calprest Turbo</i> = -7,407 + 1,138 <i>EasyCal</i> con <i>Calprest NG</i>
Pendiente (95% CI)	1,138 (1,021 a 1,246)
Y-intercepta (95% CI)	-7,407 (-14,37 a -1,100)
Correlación - r	0.924
Bias en 120 µg/g (95% CI)	7,7% (-1,2% a 14,2%)

Tabla 1. Comparación cuantitativa entre los resultados obtenidos con los ensayos *EasyCal Turbo* con *Calprest Turbo* y *EasyCal* con *Calprest NG*. Se utilizó el análisis de regresión de Passing-Bablok.

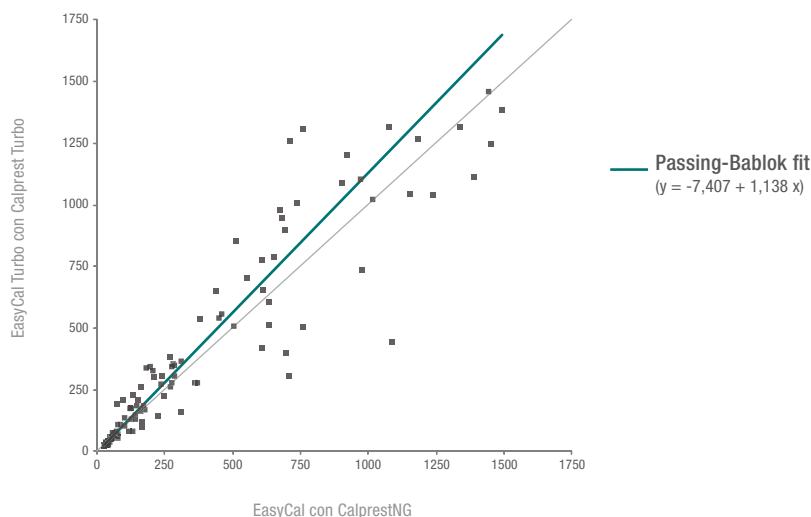


Figura 1. Análisis de regresión utilizando la idoneidad de Passing-Bablok mediante la comparación de los resultados obtenidos con **EasyCal Turbo** con **Calprest Turbo** y **EasyCal** con **Calprest NG**.

Concordancia cualitativa de EasyCal Turbo con Calprest Turbo contra EasyCal con Calprest NG

		EasyCal Turbo con Calprest Turbo			
		BORD	NEG	POS	Total
EasyCal con Calprest NG	BORD	15	1	4	20
	NEG	1	12	0	13
	POS	2	0	68	70
	Total	18	13	72	103

Valores dudosos se consideran positivos

Acuerdo negativo (95% CI)	92,3% (66,7 - 98,6%)
Acuerdo positivo (95% CI)	98,9% (94,0 - 99,8%)
Acuerdo total (95% CI)	98,1% (93,2 - 99,5%)

Valores dudosos se consideran negativos

Acuerdo negativo (95% CI)	87,9% (72,7 - 95,2%)
Acuerdo positivo (95% CI)	97,1% (90,2 - 99,2%)
Acuerdo total (95% CI)v	94,2% (87,9 - 97,3%)

Tabla 2. Comparación cualitativa entre los resultados obtenidos con **EasyCal Turbo** con **Calprest Turbo** y **EasyCal** con ensayos **Calprest NG** que analizan los datos utilizando el rango límite como positivo y negativo por separado.

Immunturbidimetrischer Test zum quantitativen Nachweis von Calprotectin aus Stuhlproben

REF 9300

VERWENDUNGSZWECK

Calprest® Turbo ist ein turbidimetrischer Latex-Assay für den quantitativen Nachweis von Calprotectin in humanen Stuhlproben. **Calprest Turbo** kann als ein Hilfsmittel zur *In-vitro*-Diagnostik herangezogen werden, das die Diagnose von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), insbesondere Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, unterstützt und, in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden, zur Unterscheidung von CED vom Reizdarm-Syndrom (RDS) dient. Dieser Assay ist einfach, schnell und vielseitig anwendbar. Dieses Produkt ist für mehrere Analyseautomaten optimiert.

TESTPRINZIP

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.

Calprest Turbo ist ein partikelverstärkter turbidimetrischer Immunoassay (PETIA) zum quantitativen Nachweis von Calprotectin in menschlichen Stuhlproben. Der Test wurde zur Verwendung an mehreren automatischen Analysegeräten entwickelt. Er ist einfach, vielseitig anwendbar und die Testergebnisse stehen in kurzer Zeit zur Verfügung. **Calprest Turbo** basiert auf der *In-vitro*-Agglutination von mit Polystyrol-Latexpartikel beschichteten anti-Calprotectin-Antikörpern mit dem in der analysierten Lösung vorhandenen Calprotectin. Ist in der Stuhlprobe kein Calprotectin vorhanden, bleibt die Mischung als gleichmäßige Suspension erhalten. In Gegenwart von Calprotectin erhöht sich die Trübung des Mediums nach der Aggregation mit den Antikörpern auf den Latexpartikeln. Eine solche Trübung wird als Zunahme der Extinktion bei der determinierten Wellenlänge gemessen und ist proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Antigens.

INHALT (AUSREICHEND FÜR MINDESTENS 200 TESTS)

Komponente	Menge	Deckelfarbe	Inhalt
Calprest Turbo Reagent 1	2 Flaschen x 27 ml		Enhancing Reagenz, gebrauchsfertig
Calprest Turbo Reagent 2	1 Flasche x 8 ml		Lösung mit Latexpartikeln, die mit Antikörpern gegen humanes Calprotectin beschichtet sind; gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 0	1 Röhrchen x 1 ml	Gelb	Calprotectin-Lösung (0 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 1	1 Röhrchen x 1 ml	Rosa	Calprotectin-Lösung (50 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 2	1 Röhrchen x 1 ml	Rot	Calprotectin-Lösung (100 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 3	1 Röhrchen x 1 ml	Violett	Calprotectin-Lösung (250 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 4	1 Röhrchen x 1 ml	Grün	Calprotectin-Lösung (750 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Calibrator 5	1 Röhrchen x 1 ml	Blau	Calprotectin-Lösung (1.500 µg/g); die Kalibratoren sind gebrauchsfertig
Calprest Turbo Control 1	2 Röhrchen x 1 ml	Weiß	Rekombinantes menschliches Calprotectin in Pufferlösung, gebrauchsfertig, nicht verdünnen. Der Wertebereich ist auf dem Etikett angegeben
Calprest Turbo Control 2	2 Röhrchen x 1 ml	Braun	Rekombinantes menschliches Calprotectin in Pufferlösung, gebrauchsfertig, nicht verdünnen. Der Wertebereich ist auf dem Etikett angegeben

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Stuhlprobenbehälter
- Transportbehälter
- Einweghandschuhe und Laborausüstung
- Stuhlsammelröhren (z.B. **EasyCal Turbo** ref. 9302)
- Brechbare sterile Einweg-Impfösen oder -Holzstäbchen (Bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- Polystyrol-Einwegröhrchen (14 ml) mit Schraubverschluss (Bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- **Calprest Turbo** Extraktionspuffer 1X (**Calprest Turbo** Extraction Kit, ref. 9299, bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- Mikrozentrifugen-Röhrchen (1-1,5 ml)
- Digitale Feinwaage (40-150 mg, bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- Vortexmixer
- Schüttler oder Rollmischer (Bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- Mikrozentrifuge (10.000 x g, bei Verwendung der auf Seite 22 beschriebenen manuellen Extraktionsmethode für Stuhlproben)
- Präzisionspipetten

Ausrüstung für turbidimetrische Messungen

Jede turbidimetrische automatische Analysevorrichtung; für das gerätespezifische Protokoll siehe den zusätzlichen Anwendungshinweis.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT VON REAGENZIEN UND ARBEITSLÖSUNGEN

- Alle Reagenzien und Arbeitslösungen müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Das Verfallsdatum ist auf allen Etiketten der Kit-Komponenten angegeben.
- Nicht hohen Temperaturen, direktem Sonnenlicht oder extremer Feuchtigkeit aussetzen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Patientenpräparate und Stuhlproben sollten unter Beachtung der Guten Laborpraxis (GLP) mit geeigneten Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Das Kit enthält keine menschlichen Materialien.
- Eine in Turbidimetrietechnik und im Gebrauch des Autoanalysators ausgebildete Person ist erforderlich.
- Kit-Komponenten verschiedener Chargen nicht zusammen verwenden. Eine zufriedenstellende Testleistung ist nur dann gewährleistet, wenn Komponenten aus derselben **Calprest Turbo**-Charge verwendet werden.
- Die Drehverschlüsse verschiedener Reagenzien-Röhrchen nicht vertauschen.
- Das Analysegerät muss einsatzbereit sein, bevor ein Assay durchgeführt wird.
- Wenn das Ergebnis den Messbereich überschreitet, den Extraktionspuffer 1X (**Calprest Turbo** Extraction Kit Ref. 9299) verwenden, um die Probe zu verdünnen und den Assay zu wiederholen.
- Komponenten nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Bei beschädigter Verpackung sich vergewissern, dass alle unter „Inhalt“ aufgeführten Komponenten vorhanden und unbeschädigt sind. Tritt aus den Röhrchen Flüssigkeit aus, den Kit nicht verwenden.
- Die Lösungen sollten nach dem Test gemäß den örtlichen Vorschriften in einem geeigneten Behälter entsorgt werden.

STUHLPROBENENTNAHME

Stichprobenartige Entnahme. Eine ausreichende Menge humanen Stuhl entnehmen. Diese Stuhlproben in sauberen und trockenen Einwegbehältern (ohne Konservierungsmittel oder Transportmedien) sammeln. Weiche oder flüssige Stuhlproben sind zulässig, da die Normalisierung des Stuhlprobengewichts Teil der Ergebnisberechnung ist. Die Abgabe von Stuhlproben aus Windeln sollte vermieden werden, es sei denn, die abgegebene Probe kann aus einem Teil des Stuhls entnommen werden, der nicht mit dem Windelmateriale in Berührung gekommen ist.

Stuhlprobenanforderungen

1-5 g Stuhl in einem sauberen Röhrchen mit Schraubverschluss sammeln. Es sind keine Konservierungsmittel erforderlich, noch angezeigt.

Stuhlprobentransport

Stuhlproben sollten zum Labor gebracht und innerhalb von 10 Tagen nach der Sammlung extrahiert werden. Die Transporttemperatur sollte nicht über 30 °C liegen.

Stuhlprobenlagerung

Stuhlproben im Labor können bis zu 7 Tage bei 2-8 °C gelagert werden, bevor der Test durchgeführt werden muss. Für eine längere Lagerung die Stuhlproben bei -20 °C einfrieren.

VERFAHREN

Stuhlprobenvorbereitung

Gefrorene Stuhlproben auftauen lassen und sicherstellen, dass alle Reagenzien für das Extraktionsverfahren Raumtemperatur (20-25 °C) angenommen haben. Es gibt zwei alternative Methoden der Stuhlprobenvorbereitung: manuell oder mit dem **EasyCal Turbo** Stuhlentnahmeröhrchen. Die Anwender können ihre bevorzugte Methode zur Stuhlprobenvorbereitung wählen.

A. **EasyCal Turbo** Stuhlprobenvorbereitung

1. Informationen über das Verfahren zur Probenentnahme/Extraktion sind in der Arbeitsanleitung von **EasyCal Turbo** (Ref. 9302) aufgeführt.
2. Nach dem Extraktionsverfahren ist der Stuhlextrakt für die Testdurchführung vorbereitet. Das **EasyCal Turbo**-Röhrchen (ohne Trichter und Stäbchen) direkt in die turbidimetrische Analysevorrichtung einsetzen oder den Überstand für das Analyseverfahren in einen Adapter (nicht mitgeliefert) überführen.
3. Wird der Extrakt nicht sofort analysiert, kann er gemäß der Gebrauchsanweisung von EasyCal Turbo (Ref. 9302) gelagert werden.

B. **Manuelle** Probenvorbereitung

Für jede zu testende Probe ein Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss verwenden. Das Zentrifugenröhrchen mit dem Namen oder der Nummer des Patienten beschriften.

1. Das leere Zentrifugenröhrchen zusammen mit der Impföse oder dem hölzernen Applikatorstäbchen wiegen (tarieren).
2. Die Stuhlprobe mittels der Impföse oder des hölzernen Applikatorstäbchens gut mischen, damit die Stuhlprobe so homogen wie möglich ist. Mit Hilfe der Impföse (oder des hölzernen Applikatorstäbchens) etwa 50 mg (zwischen 40-60 mg) an Stuhl entnehmen und in das zuvor gewogene Zentrifugenröhrchen überführen.
3. Das Röhrchen mit der Impföse oder dem Holzstäbchen und der enthaltenen Stuhlprobe wiegen und das Nettogewicht der Probe berechnen (40-60 mg).
4. Den Ösengriff oder das Holzstäbchen abbrechen, und die Öse oder das Holzstäbchen mit der Stuhlprobe und einen 4 bis 6 cm langen Griff im Zentrifugenröhrchen lassen.
5. Fügen Sie die gebrauchsfertige 1X fache Extraktionslösung (Calprest Turbo Extraction Kit, Ref. 9299) in einem Gewichts-Volumen-Verhältnis von 1:100 hinzu, z. B. 50 mg Stuhlprobe + 4,95 ml Extraktionslösung (siehe Tabelle unten). Die fäkale Stuhlprobenkonzentration in der Extraktionslösung wird dann 10 mg/ml betragen. Das Röhrchen verschließen.

Stuhlprobe (mg)	Extraktionslösung (ml)	Stuhlprobe (mg)	Extraktionslösung (ml)
60	5,94	45	4,45
55	5,45	40	3,96
50	4,95		

6. Mit einem Vortexmixer 30 Sekunden lang kräftig schütteln/mischen.
7. Mit einem Schüttler oder Rollmischer für 25 ± 5 Minuten homogenisieren. Die Impföse oder das Holzstäbchen im Röhrchen wirken als Rüttler.
8. Das Homogenat (1 ml) in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführen und für 20 Minuten mit 10000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren.
9. 0,5 ml des klaren, überschüssigen Extrakts in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführen. Kontakt mit Rückständen vermeiden, da Aggregate oder Partikel zu fehlerhaften Calprotectin-Werten führen können.
10. Die Extrakte können sofort getestet oder unter folgenden Bedingungen gelagert werden:
 - Bis zu 72 Stunden bei Raumtemperatur
 - Bis zu 14 Tage bei 2-8°C
 - Bis zu 90 Tage bei -20°C. Gefrorene Proben können bis zu 4 Einfrier- / Auftauzyklen unterzogen werden.

ANALYTISCHES VERFAHREN

1. Sicherstellen, dass alle Reagenzien Raumtemperatur (20-25 °C) erreicht haben.
2. Gefrorene Stuhlproben bei Raumtemperatur auftauen.
3. **Calprest Turbo** Reagent 1 und **Calprest Turbo** Reagent 2 sind gebrauchsfertig in Flaschen abgefüllt werden, die direkt in den Eu-Turbo Analyser (Ref. 9194) geladen werden können. Soll der Test auf einem anderen turbidimetrischen Analysator durchgeführt werden, muss der Inhalt der Flaschen in Flaschen umgefüllt werden, die dem verwendeten System eigen sind.
4. **Calprest Turbo** Calibrator Röhrchen (Calibrator 0 bis 5) und **Calprest Turbo** Control Röhrchen (Control 1 und Control 2) sind gebrauchsfertig.
5. Erstellung der Kalibrierungskurve:
 - 5.1 Zur Kalibrierung nur **Calprest Turbo** Calibrator-Röhrchen verwenden. Die Konzentration ist auf dem Etikett jedes Röhrchens angegeben.
 - 5.2 Nach der Einstellung ist die Kalibrierungskurve bis zu 30 Tage zulässig stabil. Es wird jedoch dringend empfohlen, das System wöchentlich zu kalibrieren.
 - 5.3 Das System ist neu zu kalibrieren, sobald die Reagenzien-Charge geändert wird oder wenn die Kontrollen außerhalb des auf dem jeweiligen Etikett bzw. dem Kit beigefügten Analysezertifikat angegebenen Bereichs liegen.
6. Qualitätskontrolle:
 - 6.1 Für die Qualitätskontrolle **Calprest Turbo** Control 1- und **Calprest Turbo** Control 2-Röhrchen verwenden. Die Konzentration ist auf dem Etikett jedes Röhrchens angegeben.
 - 6.2 Zur Validierung der Kalibrierungskurve sollten die Kontrollen täglich vor den Patientenproben durchlaufen.
 - 6.3 Wenn die erhaltenen Ergebnisse außerhalb des für die Kontrollcharge angegebenen Bereichs liegen, müssen Ausrüstung, Reagenzien oder die Technik überprüft werden.
7. Testablauf:
 - 7.1 Der Test kann mit den gängigsten turbidimetrischen Geräten durchgeführt werden. Für die Liste der validierten turbidimetrischen Analysegeräte und die dazugehörigen Anwendungshinweise unter der folgenden E-Mail-Adresse an Eurospital wenden:

marketing.diagnostics@eurospital.it

BEWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

- **Negative Ergebnisse:** Calprotectin-Werte unter 50 µg/g zeigen ein normales Vorkommen von Calprotectin in den analysierten Stuhlproben an.
- **Positive Ergebnisse:** Calprotectin-Werte über 120 µg/g zeigen ein anormales Vorkommen von Calprotectin in den analysierten Stuhlproben an. Weisen Proben erwachsener Patienten derartige Konzentrationen auf, so können diese mit einer gastrointestinal-entzündlichen Pathologie in Verbindung gebracht werden und die Durchführung weiterer, diagnostisch-invasiver Untersuchungen wird empfohlen.
- **Grenzwertige Ergebnisse:** Calprotectin-Werte im Graubereich (50 - 120 µg/g) sollten nach 4-6 Wochen erneut überprüft werden.

Die folgende Tabelle fasst die Beurteilung der Ergebnisse zusammen:

Calprotectin-Konzentration	Bewertung	Follow-Up
< 50 µg/g	Normal	Entfällt
50 - 120 µg/g	Grenzwertig	Nach 4 bis 6 Wochen erneut überprüfen
> 120 µg/g	Anormal	Wiederholen wie klinisch indiziert

Weitere Bewertungen, einschließlich asymptomatischer Patienten sowie Patienten mit RDS (zur Unterscheidung von CED), und internationale Studien bestätigten die Eignung dieser Werte.

LEISTUNGSMERKMALE

Calprest Turbo Grenzwert:

- Calprotectin-Konzentrationen unter 50 µg/g Stuhl gelten als normale Werte und weisen nicht auf eine Entzündung des Magen-Darm-Trakts hin.
- Calprotectin-Konzentrationen über 120 µg/g Stuhl weisen auf eine Entzündung des Magen-Darm-Trakts hin.

PROZONEN-EFFEKT

Es wurden Studien bis zu einer fäkalen Calprotectin-Konzentration von 8.000 µg/g durchgeführt und es wurden keine falsch-negativen Ergebnisse beobachtet. Studien mit höheren Konzentrationen liegen nicht vor.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Falsch-negative Werte können sich bei Patienten mit Granulozytopenie aufgrund einer Knochenmarksdepression ergeben.
- Patienten, die nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) einnehmen, können einen erhöhten Stuhlcalprotectinspiegel aufweisen.
- Patienten mit CED schwanken zwischen aktiven (entzündlichen) und inaktiven Stadien der Krankheit. Diese Stadien müssen bei der Verwendung des **Calprest Turbo** Assays berücksichtigt werden.
- Die Einnahme von Protonenpumpenhemmern (PPI) oder das Vorhandensein einer mikroskopischen Kolitis bzw. von Divertikelerkrankungen können ebenfalls zu einem erhöhten Calprotectinspiegel führen. Patienten mit unbehandelter Zöliakie können gelegentlich einen erhöhten Calprotectin-Wert aufweisen.
- Andere Darmstörungen, einschließlich vieler Magen-Darm-Infektionen und Darmkrebs, können zu erhöhten Calprotectin-Spiegeln führen. Diese Proben werden mit dem **Calprest Turbo** Assay positiv getestet. Die Diagnose einer aktiven CED kann daher nicht allein auf der Grundlage eines positiven Ergebnisses mit dem **Calprest Turbo** Assay gestellt werden.
- **Calprest Turbo** sollte nur zur Bestimmung von Calprotectin aus menschlichen Stuhlproben verwendet werden. Der Kit ist nicht für die Verwendung mit anderen Körperflüssigkeiten (z. B. Blut, Serum, Plasma, Urin, Rückenmarkflüssigkeit, Speichel, Gelenksflüssigkeit oder Empyemflüssigkeit) vorgesehen. Die Verwendung des Tests mit anderen Proben als menschlichem Stuhl wurde noch nicht validiert. Die Qualität der Untersuchung hängt von der Qualität der analysierten Stuhlprobe ab. Es müssen geeignete Stuhlproben entnommen werden.
- Positive Ergebnisse weisen auf das Vorkommen von Calprotectin in Stuhlproben hin. Nach einem positiven Ergebnis sollten weitere klinische Untersuchungen wie Koloskopien und Biopsien folgen, um die Art der Entzündung genau zu bestimmen und ihr Ausmaß festzustellen.
- Fäkales Calprotectin ist ein Indikator für das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten im Stuhl und nicht spezifisch für CED.
- Wenn die Symptome oder der Zustand weiterhin bestehen, sollte die Beurteilung des Krankheitsbildes mit alternativen Methoden durchgeführt werden. Negative Ergebnisse schließen eine CED nicht aus; einige Erkrankungen wie Zöliakie und mikroskopische Kolitispolypen, die hauptsächlich mit mononukleäre Entzündungen einhergehen, können zu einem niedrigen Calprotectin-Spiegel in Stuhlproben führen.
- Es wurde berichtet, dass Calprotectin-Spiegel im Stuhl von Neugeborenen mit einem Mittelwert von 167 µg/g (Bereich 22-860 µg/g) höher liegen als bei größeren, gesunden Kindern.

INTERFERENZEN UND KREUZREAKTIVITÄT

Bei einer Evaluierung zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde keine Kreuzreaktivität mit anderen Stuhlmarkern festgestellt, die gelegentlich im Stuhl vorhanden waren, wie Rinderserumalbumin, Ascorbinsäure und Häm-in.

LEISTUNGSMERKMALE

Eine Methodenvergleichsstudie wurde zwischen Eurospital **Calprest Turbo** und dem Produkt Eurospital **Calprest NG** mit 97,9% diagnostischer Spezifität und 83,1% diagnostischer Sensibilität durchgeführt (wenn Grenzl-inien als positiv angesehen werden).

Vergleichsmethode

Einhundertdrei (103) menschliche Stuhlproben wurden parallel mit **EasyCal Turbo** und **EasyCal** extrahiert. Die extrahierten Stuhlproben wurden doppelt zur Bestimmung der Calprotectin-Konzentration unter Verwendung von **EasyCal Turbo** mit **Calprest Turbo**- und **EasyCal** mit **Calprest®NG**-Assays gemäß ihren jeweiligen Packungsbeilagen getestet. Die beobachteten Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengefasst und in Abbildung 1 dargestellt.

Methodenvergleich EasyCal Turbo mit Calprest Turbo (y) gegen EasyCal mit Calprest NG (x)	
Regression nach Passing-Bablok	EasyCal Turbo mit Calprest Turbo = -7,407 + 1,138 EasyCal mit Calprest NG
Steigung (95% CI)	1,138 (1,021 zu 1,246)
Y-Achsenabschnitt (95% CI)	-7,407 (-14,37 zu -1,100)
Korrelation - r	0.924
Standardabweichung bei 120 µg/g (95% CI)	7,7% (-1,2% zu 14,2%)

Tabelle 1. Quantitativer Vergleich zwischen den Ergebnissen, die unter Verwendung von **EasyCal Turbo** mit **Calprest Turbo**- und **EasyCal** mit **Calprest NG**-Assays erhalten wurden. Es wurde die Passing-Bablok-Reggressionsanalyse verwendet.

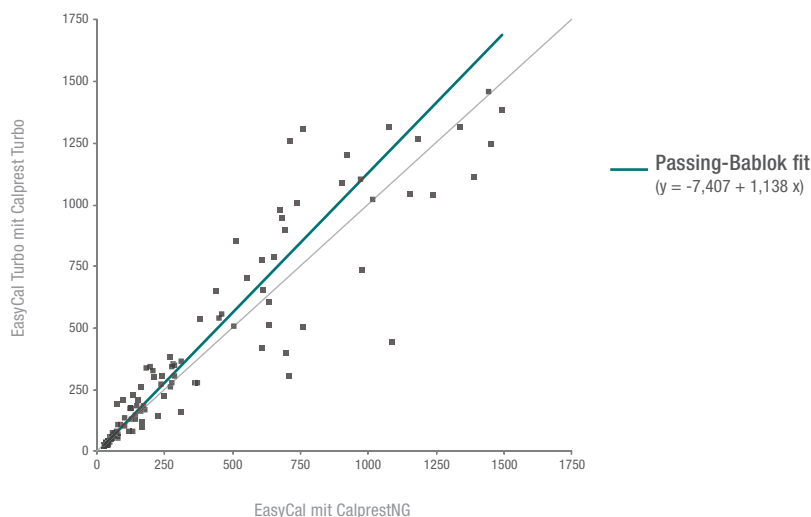


Abbildung 1. Regressionsanalyse mit Passing-Bablok-Fit zum Vergleich der Ergebnisse von **EasyCal Turbo** mit **Calprest Turbo** und **EasyCal** mit **Calprest NG**.

Qualitative Übereinstimmung von EasyCal Turbo mit Calprest Turbo gegen EasyCal mit Calprest NG

		EasyCal Turbo mit Calprest Turbo			
		GRENZW	NEG	POS	Gesamt
EasyCal mit Calprest NG	GRENZW	15	1	4	20
	NEG	1	12	0	13
	POS	2	0	68	70
	Gesamt	18	13	72	103

Grenzwertig gilt als positiv

Negative Übereinstimmung (95% CI)	92,3% (66,7 - 98,6%)
Positive Übereinstimmung (95% CI)	98,9% (94,0 - 99,8%)
Gesamtübereinstimmung (95% CI)	98,1% (93,2 - 99,5%)

Grenzwertig gilt als negativ












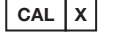


Negative Übereinstimmung (95% CI)	87,9% (72,7 - 95,2%)
Positive Übereinstimmung (95% CI)	97,1% (90,2 - 99,2%)
Gesamtübereinstimmung (95% CI)	94,2% (87,9 - 97,3%)

Tabelle 2. Qualitativer Vergleich zwischen den mit **EasyCal Turbo** und **Calprest Turbo** sowie **EasyCal** und **Calprest NG** ermittelten Ergebnissen, wobei die Daten unter Verwendung des Grenzbereichs getrennt als positiv und negativ analysiert wurden.

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”.

Legend / Legenda / Légende / Leyenda / Legende

	Consult electronic instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso elettroniche / Consulter la notice d'utilisation électronique / Consultense las instrucciones electrónicas de uso / Elektronischen Gebrauchsanweisung beachten		Sufficient for / Sufficiente per / Suffisant pour / Válido para / Ausreichend für
	Use by / Data di scadenza / Date de péremption / Fecha de caducidad / Verwendbar bis		Manufacturer / Fabbricante / 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		Reagent / Reagente / Réactif / Reactivo / Reagens
	Catalogue number / Numero di Catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestell Inummer		Control / Controllo / Contrôle / Control / Kontrolle
	Keep dry / Conservare in luogo asciutto / Garder au sec / Almacenar en lugar seco / Bleib trocken		Calibrator / Calibratore / Calibrateur / Calibrador / Kalibrator
	Keep out of the sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole / Gardez hors de la lumière du soleil / Manténgase fuera de la luz del sol / Vor dem Sonnenlicht schützen		Batch number / Numero di lotto / Numéro de lot / Número de lote / Chargennummer

English
Italiano
Français
Español
Deutsch

**ANNEX INFORMATION OF THE VALIDATED COMPATIBLE TURBIDIMETRIC INSTRUMENTS
INFORMAZIONI DEGLI STRUMENTI TURBIDIMETRICI COMPATIBILI VALIDATI
ANNEXE INFORMATIONS SUR LES INSTRUMENTS TURBIDIMÉTRIQUES COMPATIBLES VALIDÉS
ANEXO INFORMACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS TURBIDIMÉTRICOS COMPATIBLES VALIDADOS
ANHANG INFORMATIONEN DER VALIDIERTEN KOMPATIBELN TURBIDIMETRISCHEN INSTRUMENTE**

Manufacturer	Model
Eurospital	Eu-Turbo Analyzer
Abbott	Alinity; Architect c1000 / c4000 / c8000
Awareness	Chemwell-T
Beckman Coulter	AU480 / AU680
Biosystems	A15
DyaSis	Respons 910
Mindray	BS-200 / BS-200E
Ortho	Vitros 5600
Roche	cobas c111, c501, c702
Siemens	ADVIA 1800/2400; Atellica
Tokyo Boeki	Biolis i24/i50
Binding site	Optilite
Erba	XL-180 / XL-200
Tecom	TC220

Calprest Turbo

Ref. 9300, 200 tests.

Ref. 9300, 200 test.

Ref. 9300, 200 tests.

Ref. 9300, 200 ensayos.

Ref. 9300, 200 tests.



Eurospital SpA

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

