



BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Ensayo ELISA de calprotectina

Para uso diagnóstico *in vitro*

EK-CAL 96 tests

EK-CAL2 192 tests

Fecha de liberación: 2022-11-16

Versión A3

 Fabricante

BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Suiza

Tel.: +41 61 487 1212

Fax: +41 61 487 1234

info@buhlmannlabs.ch

USO PREVISTO

El ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA es un ensayo diagnóstico *in vitro* automatizado para la determinación cuantitativa de calprotectina en muestras de heces humanas al efecto de facilitar la valoración de la inflamación de la mucosa intestinal. Los resultados del ensayo pueden utilizarse en el diagnóstico para distinguir entre las enfermedades inflamatorias orgánicas del tracto gastrointestinal (enfermedad inflamatoria intestinal, EII, en particular la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU)) y las enfermedades funcionales (síndrome del intestino irritable, SII) (ref. 1-7) en los pacientes con dolor abdominal crónico y para facilitar el control de la EII (ref. 7-18).

Solo para uso en laboratorio.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA permite la medición selectiva de la calprotectina en extractos fecales mediante ELISA de tipo *sandwich*. La placa de microtitulación de BÜHLMANN fCAL® ELISA está recubierta con un anticuerpo de captura monoclonal (mAb) altamente específico para los complejos poliméricos y heterodiméricos de la calprotectina. Los extractos de las muestras fecales del paciente, los controles para la determinación de la aceptabilidad de la prueba ELISA y los calibradores se cargan en los pocillos de la placa de microtitulación. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y unos pasos de lavado, un anticuerpo (Ab) de detección conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) detecta las moléculas de calprotectina unidas al anticuerpo de captura en la placa. Después de la incubación y pasos de lavado adicionales, se añade el sustrato cromogénico de HRP, tetrametilbenzidina (TMB) (formación de color azul), seguido de una solución de parada (cambio a color amarillo). La absorción se mide a 450 nm. La concentración final de calprotectina en µg/g de heces de la muestra del paciente se determina mediante la curva de calibración generada a partir de los valores medidos en el calibrador.

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampón de extracción	3 frascos × 125 mL	6 frascos × 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Placa de microtitulación con revestimiento previo de mAb anticalprotectina	12 × 8 tiras de pocillos con marco	2 × 12 × 8 tiras de pocillos con marco	B-CAL-MP	Listo para usar
Alfombrilla de sellado	3 unidades	6 unidades	-	Listo para usar
Concentrado de tampón de lavado (10×) con conservantes	1 frasco × 100 mL	2 frascos × 100 mL	B-CAL-WB	Diluir cada uno con 900 mL de H ₂ O desionizada
Tampón de incubación con conservantes	2 frascos × 125 mL	3 frascos × 125 mL	B-CAL-IB	Listo para usar
Calibradores de A a E⁽¹⁾²⁾ Calprotectina sérica en una matriz tampón con conservantes	5 viales × 1 mL	5 viales × 1 mL	B-CAL-CASET	Listo para usar

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAL	EK-CAL2		
Controles bajo / alto³⁾ Calprotectina sérica en una matriz tampón con conservantes	2 viales × 1 mL	2 viales × 1 mL	B-CAL-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático Ab anticalprotectina conjugado con HRP	1 vial × 12 mL	2 viales × 12 mL	B-CAL-EL	Listo para usar
Sustrato de TMB TMB en tampón de citrato	1 vial × 12 mL	2 viales × 12 mL	B-TMB12	Listo para usar
Solución de parada ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial × 12 mL	2 viales × 12 mL	B-ST512	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 1

¹⁾ La concentración real de calprotectina de los calibradores A a E es de 4, 12, 40, 120 y 240 ng/mL, respectivamente. Para el procedimiento ELISA de intervalo inferior, los valores del calibrador deben fijarse como sigue: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de calprotectina. Esta asignación corresponde a la dilución final de la muestra 1:2500 en el procedimiento ELISA de intervalo inferior.

²⁾ Si se selecciona el procedimiento ELISA de intervalo extendido, los valores nominales del calibrador deben fijarse como sigue: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de calprotectina. Esta asignación corresponde a la dilución final de la muestra 1:7500 en el procedimiento ELISA de intervalo extendido.

³⁾ Los controles contienen cantidades específicas de calprotectina humana natural. Consultar la ficha de datos de control de calidad para conocer los valores reales de concentración

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS Y SOLUCIONES DE TRABAJO

Reactivos sellados / sin abrir	
Conservar a 2-8 °C. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituídos	
Tampón de extracción	Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C.
Placa de microtitulación	Volver a colocar inmediatamente las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio que contiene los paquetes de secante y sellar completamente. Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C.
Tampón de lavado diluido	Consérvese hasta un máximo de 6 meses a 2-8 °C.
Tampón de incubación	
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Sustrato de TMB	
Solución de parada	

Tabla 2

REACTIVOS Y MATERIALES INCLUIDOS COMPLEMENTARIOS

Dispositivos de extracción de heces

Los dispositivos de extracción de heces descritos en la tabla 3 no están incluidos en el kit. Los dispositivos de extracción elegidos deben pedirse por separado.

Kits de dispositivos de extracción	Cantidad	Código
CALEX® Cap	Paquetes de 50, 200 o 500 tubos disponibles, cada uno de los cuales contiene 5 mL de tampón de extracción. Listo para usar	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, espátulas y fondos	B-CAL-RD

Tabla 3

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

Procedimiento de extracción

- Pipetas de precisión de 100 µL y 1000 µL con puntas desechables
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para transferir los extractos (opcional)
- Cámara de flujo laminar
- Agitador vórtex multitubo/agitador vórtex
- Micro centrifuga (≥3000 g)
- Centrifuga (≥500 g)
- Dispositivos de extracción (véase la Tabla 3 anterior) o, para el procedimiento de extracción manual:
 - Asas de siembra desechables de 10 µL
 - Tubos de polipropileno de 15 mL con tapón de rosca, requeridos
 - Balanza de precisión (10-200 mg)

Procedimiento ELISA

- Pipetas de precisión de 10 µL, 100 µL y 1000 µL con puntas desechables
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de las muestras.
- Probeta de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado
- Lavador de placas de microtitulación (véanse las precauciones técnicas) o frasco comprimible para el tampón de lavado
- Agitador de placas de microtitulación (véanse las precauciones técnicas)
- Papel secante
- Lector de microplacas para la medición de la absorbancia a 450 nm

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Los calibradores y controles de este ensayo contienen componentes de origen humano. Aunque los ensayos de detección del antígeno de superficie del VHB y de los anticuerpos del VHC y VIH1/2 hayan dado resultado negativo, los reactivos deben manipularse como si pudiesen transmitir infecciones y de acuerdo con las

Prácticas Correctas de Laboratorio (PCL), adoptando las precauciones oportunas.

- Este kit contiene componentes clasificados de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008: clorhidrato de 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (conc. ≥ 0,0015%), por lo que los reactivos pueden provocar reacciones cutáneas alérgicas (H317); ácido sulfúrico (conc. ≥ 2,5 - <5%), por lo que los reactivos pueden causar irritación cutánea (H315) e irritación ocular grave (H319.).
- Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, enjuagar inmediatamente con abundante agua; de lo contrario, pueden producirse irritaciones / quemaduras.
- Los reactivos y productos químicos deben tratarse como residuos peligrosos conforme a las normas nacionales de seguridad sobre riesgos biológicos.

Precauciones técnicas

Componentes del kit

- En el proceso de producción se acumulan residuos en los pocillos de la placa de microtitulación. Éstos se eliminan en el paso de lavado (paso 3 del procedimiento de ensayo) y no afectan a los resultados.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezclar ni utilizar componentes de kits con números de lote diferentes.
- Se deben realizar los máximos esfuerzos para asegurar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos y muestras o entre pocillos.
- Dejar que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente. Mezclar bien (en vórtex) los reactivos antes de su uso.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

Procedimiento de extracción manual

- Para lograr resultados cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces añadida en el tampón de extracción. Debe evitarse la contaminación en la parte superior del tubo de extracción. Después de la mezcla, puede quedar una pequeña cantidad de partículas insolubles.

Procedimiento ELISA

- En el procedimiento ELISA, los pasos de lavado son esenciales para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Dejar incubar el tampón de lavado en los pocillos durante un mínimo de 20 segundos antes de retirarlo.
- Si se utiliza un lavador automatizado, se deberá elegir el «modo placa», en el que cada paso del proceso (dispensado/aspiración) se realiza de manera secuencial en todas las tiras antes de proceder al ciclo de lavado siguiente. De este modo, se garantiza el tiempo mínimo de incubación.
- Es obligatorio realizar el número de ciclos de lavado indicado para obtener resultados reproducibles.
- El agitador de placas debe ajustarse a aproximadamente 450 rpm (7,5 Hz). Unas frecuencias de rotación más altas pueden causar una baja linealidad

de dilución en valores entre 300/900 y 600/1800 µg/g. El movimiento debe ser rotatorio y no horizontal.

- Para asegurar que la reacción antígeno/anticuerpo es completa, el tiempo de incubación del paso 5 debe ser de al menos 30 minutos. Un tiempo de incubación moderadamente más largo (de hasta 5 minutos) no influye en el resultado final.
- El marcador enzimático es inactivado por el oxígeno y es altamente sensible a la azida de sodio, el timerosal, el ácido hipocloroso y los clorohidrocarburos aromáticos que se encuentran a menudo en los suministros de agua de laboratorio. Por lo tanto, solo se debe utilizar agua desionizada de alta calidad.
- Cada vez que se realiza el ensayo (por cada placa o placa parcial) se debe generar una nueva curva de calibración.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida devuelve una lectura superior a la del calibrador más alto, el calibrador E, la muestra podrá diluirse con tampón de incubación y analizarse de nuevo según el procedimiento de ensayo. El factor de dilución total resultante debe tenerse en cuenta en el cálculo de los resultados.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el procedimiento de extracción, se requiere menos de 1 g de muestra de heces naturales. Recoger la muestra de heces en tubos simples.

Importante: La muestra debe recogerse sin ningún aditivo químico o biológico.

Transporte de las muestras

El laboratorio deberá recibir las muestras de heces para su procesamiento en un plazo de 3 días desde su recolección. Las muestras de heces pueden enviarse a temperatura ambiente o refrigeradas.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras de heces deben refrigerarse a 2-8 °C y extraerse en un plazo de 3 días a partir de su recepción en el laboratorio. No conservar las muestras a temperaturas elevadas.

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES Y ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS

1. CALEX® Cap

1.1 Procedimiento de extracción

Seguir las instrucciones de uso proporcionadas con el dispositivo CALEX® Cap (código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositivo CALEX® Cap: Las muestras de heces líquidas se pueden pipetear directamente en el dispositivo CALEX® Cap. Desenroscar la tapa azul y pipetear 10 µL de muestra de materia fecal en el dispositivo. Volver a tapar el dispositivo CALEX® Cap y proceder con el paso de mezclado en vórtex de acuerdo con el procedimiento de extracción descrito e ilustrado en las instrucciones de uso suministradas con el dispositivo CALEX® Cap.

Importante: Después de la extracción, centrifugar el dispositivo CALEX® Cap durante 5 minutos a 500-3000 g y continuar con el procedimiento del ensayo.

1.2 Estabilidad de los extractos

Los extractos de calprotectina fecal en los extractos obtenidos con CALEX® Cap son estables a temperatura ambiente (23 °C) durante 7 días y a 2-8 °C hasta 15 días. Para una conservación más prolongada, congelar los extractos a -20 °C. Los extractos congelados son estables durante un período de hasta 23 meses.

Los extractos de Calex® Cap pueden ser congelados directamente y conservados en el dispositivo CALEX® Cap. Los extractos pueden someterse a cuatro ciclos de congelación y descongelación. Antes de la medición, equilibrar los extractos congelados a temperatura ambiente, mezclar en vórtex completamente durante 10 segundos y centrifugar durante 5 minutos a 500-3000 g.

2. Otros dispositivos de extracción

2.1 Procedimientos de extracción

Seguir las instrucciones de uso incluidas el dispositivo de extracción correspondiente:

- Dispositivo de extracción fecal Roche (código 10745804322) o Smart-Prep de BÜHLMANN (código B-CAL-RD);

Importante: Después de la extracción con BÜHLMANN Smart Prep centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3000 g. Alternativamente, transferir el homogeneizado a un tubo de Eppendorf de 2 mL y centrifugar en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000 g. Decantar el sobrenadante en un tubo fresco y etiquetado y continuar con el procedimiento de ensayo.

2.2 Estabilidad de los extractos

Los extractos de calprotectina fecal obtenidos con Smart-Prep son estables a 2-8 °C durante ≤ 7 días y a -20 °C hasta 36 meses.

3. Extracción manual

3.1 Procedimiento de extracción

1. Etiquetar y pesar el tubo de polipropileno vacío, incluida el asa de siembra. Anotar el peso (tara).
2. Sacar de 50 a 100 mg de la muestra de materia fecal por medio del asa de siembra, colocarla en el tubo anteriormente pesado y volver a pesarla (peso bruto). En el muestreo, evitar las fibras presentes en la muestra.
3. Calcular la cantidad neta de la muestra, restando la tara del peso bruto, romper el asa de siembra y dejar la parte inferior en el tubo.
4. Añadir el tampón de extracción según la fórmula $x \text{ mg materia fecal} \times 49 = \mu\text{L tampón de extracción}$ (p.ej. 50 mg de materia fecal + 2450 µL tampón) en el tubo y cerrarlo.
5. Extraer las muestras siguiendo los pasos:
 - Mezclar vigorosamente el tubo de extracción que contiene el tampón y la muestra fecal en un vórtex (multitubo) durante 30 segundos (a la velocidad máxima).
 - A continuación, incubar el tubo de extracción durante 25 ± 5 minutos en un agitador de placas a unas 400 rpm. El asa de siembra en el tubo sirve para mejorar la agitación.
 - Una vez más, mezclar vigorosamente mediante vórtex el tubo de extracción durante 30 segundos.

- Transferir 1,5 mL de homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000 g.
- Decantar el sobrenadante en un tubo fresco y etiquetado y continuar con el procedimiento de ensayo o almacenar los extractos (consultar el apartado de conservación de extractos).

3.2 Estabilidad de los extractos

La calprotectina fecal obtenida por extracción manual puede conservarse a 2-8 °C durante ≤ 7 días y a -20 °C hasta 36 meses.

INTERVALO DE TRABAJO

El ensayo puede realizarse como procedimiento ELISA de intervalo inferior o extendido. Se debe seleccionar el procedimiento apropiado en función de la concentración esperada de calprotectina:

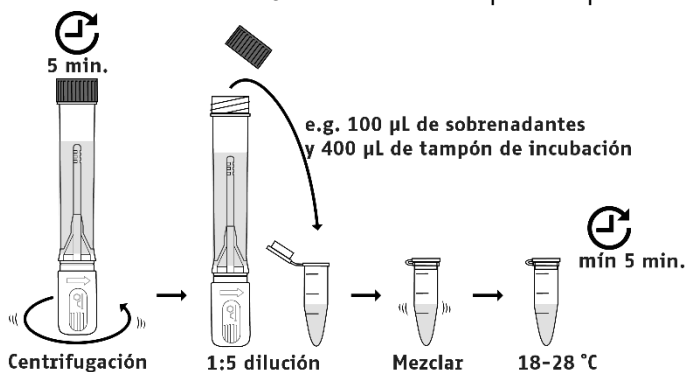
- Para muestras con hasta 600 µg/g de calprotectina, seleccionar el procedimiento de intervalo inferior (intervalo de trabajo 10-600 µg/g).
- Si las muestras tienden a superar los 600 µg/g, seleccionar el procedimiento de intervalo extendido (intervalo de trabajo 30-1800 µg/g).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Importante: Equilibrar los reactivos a 18-28 °C durante al menos 30 minutos antes de usarlos. Diluir exclusivamente los extractos fecales. Los calibradores y controles están listos para usar.

1. Opción 1 de dilución de muestras: Intervalo de trabajo 10-600 µg/g

- Dispositivo CALEX® Cap:** Diluir los extractos de heces 1:5 con el tampón de incubación (por ejemplo, 100 µL de extracto y 400 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.



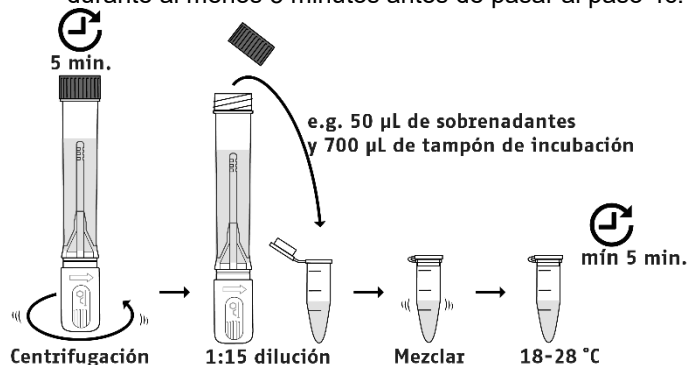
- Extracción manual o Smart-Prep:** Diluir los extractos de heces 1:50 con el tampón de incubación (por ejemplo, 20 µL de extracto y 980 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.

1. Opción 2 de dilución de muestras: Intervalo de trabajo 30-1800 µg/g

El intervalo de trabajo se puede ampliar en un factor 3 diluyendo las muestras 1:7500 en lugar de 1:2500. Se recomienda este procedimiento si se esperan altas concentraciones de calprotectina.

- Dispositivo CALEX® Cap** Diluir los extractos de heces 1:15 con el tampón de incubación (por ejemplo, 50 µL de extracto y 700 µL de tampón de incubación) y

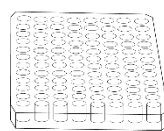
mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.



- Manual extraction o Smart-Prep:** Diluir los extractos de heces 1:150 con el tampón de incubación (por ejemplo, 20 µL de extracto y 2980 µL de tampón de incubación) y mezclar bien. Equilibrar las muestras a 18-28 °C durante al menos 5 minutos antes de pasar al paso 4c.

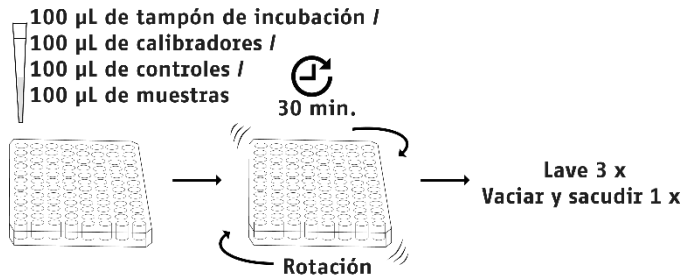
- Preparar un marco de placa con suficientes tiras para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidas. Retirar las tiras sobrantes del marco y volver a sellarlas en la bolsa de aluminio junto con los paquetes de secante sin demora. Conservar refrigeradas.
- Lavar los pocillos recubiertos dos veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo. Vaciar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.

Importante: El tampón de lavado debe permanecer en los pocillos durante un mínimo de 20 segundos durante cada paso de lavado.

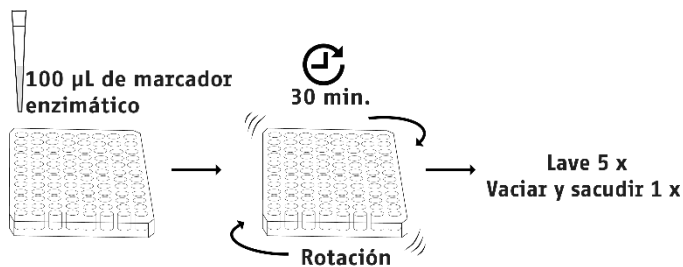


→ Vaciar y sacudir

- Pipetear 100 µL de tampón de incubación (blanco) y Pipetear 100 µL de los calibradores A-E en los pocillos respectivos.
- Pipetear 100 µL de los controles bajo y alto en los pocillos respectivos.
- Pipetear 100 µL de cada muestra diluida en los pocillos siguientes.
- Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado e incubar durante 30 + máx. 5 minutos en un agitador de placas a ~450 rpm a 18-28 °C (véanse las Precauciones técnicas - Procedimiento ELISA).
- Retirar y desechar la alfombrilla de sellado. Vaciar los pocillos y lavar tres veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo (véanse las Precauciones técnicas - Procedimiento ELISA). Vaciar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.

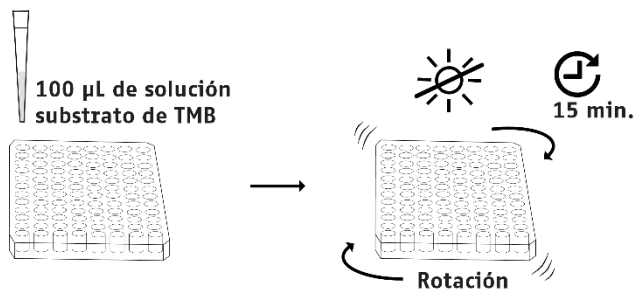


- Pipetear 100 µL del marcador enzimático en todos los pocillos.
- Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado e incubar durante 30 ± 5 minutos en un agitador de placas ajustado a ~ 450 rpm a $18-28$ °C.
- Retirar y desechar la alfombrilla de sellado. Vaciar los pocillos y lavarlos cinco veces utilizando al menos 300 µL de tampón de lavado por cada pocillo. Vaciar los pocillos y golpear la placa con firmeza sobre papel secante.



Importante: Equilibrar la solución sustrato de TMB a $18-28$ °C.

- Pipetear 100 µL de la solución sustrato de TMB a cada pocillo.
- Cubrir la placa con una alfombrilla de sellado, proteger la placa de la luz directa e incubar durante 15 ± 2 minutos en un agitador de placas ajustado a ~ 450 rpm a $18-28$ °C.



- Pipetear 100 µL de solución de parada en todos los pocillos. Eliminar las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Realizar el paso 13 en un plazo de 30 minutos.
- Leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.



CONTROL DE CALIDAD

Para usar correctamente el producto, es necesario entender a fondo estas instrucciones de uso. Solo se obtendrán resultados fiables aplicando técnicas precisas de laboratorio y siguiendo con precisión estas instrucciones de uso.

El kit BÜHLMANN fCAL® ELISA se suministra con dos controles: el control bajo y el control alto. Los valores de referencia de los controles se indican en la hoja de datos de control de calidad incluida en cada kit. Los valores e intervalos indicados en la hoja de datos de control de calidad siempre se refieren al lote en cuestión y deben utilizarse para la comparación directa de los resultados. En caso de que los resultados de los controles bajo y/o alto estuvieran fuera del intervalo indicado en la hoja de datos de control de calidad, se recomienda considerar inválida la serie completa.

Se recomienda el uso de controles internos, además de los controles del kit, de acuerdo con la normativa local y nacional. El uso de controles internos se recomienda para asegurar la validez continuada de los resultados. Dado que no existe ningún control para la calprotectina fecal disponible comercialmente, para el control de calidad interno se recomienda el uso de un grupo de extractos fecales con niveles normales y alterados.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe estar dentro de los límites de aceptabilidad establecidos del laboratorio. Si la eficacia diagnóstica del ensayo no cumple los límites establecidos y se han excluido errores en la técnica mediante la repetición, comprobar los siguientes aspectos: i) dispositivos de pipeteado, control de temperatura y temporización; ii) ajustes del lector ELISA; iii) fechas de caducidad de los reactivos; iv) condiciones de conservación e incubación; v) color de la solución sustrato de TMB (debe ser incolora); vi) pureza del agua; vii) métodos de aspiración y lavado.

ESTANDARIZACIÓN Y TRAZABILIDAD METROLÓGICA

No existen materiales de referencia ni procedimientos de medición de referencia que sean reconocidos a nivel internacional o nacional para el analito calprotectina en muestras fecales. Los valores de los calibradores de BÜHLMANN fCAL® ELISA se determinan en varias series de mediciones utilizando material de referencia interno procedente de suero humano y el procedimiento de medición de BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentración de calprotectina del material de referencia interno se estableció utilizando MRP8/14 purificado de granulocitos humanos como material de referencia principal.

Se determinó que los intervalos de confianza del 95% de la incertidumbre combinada de los calibradores del producto y de la incertidumbre combinada de los controles del producto son inferiores al 13,3% y al 16,4%, respectivamente.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

Curva estándar

Se recomienda utilizar un programa informático capaz de realizar los siguientes cálculos: restar el valor de DO del blanco de cada pocillo del calibrador para calcular el valor del calibrador. Determinar una curva estándar usando un ajuste logístico de 4 parámetros.

Controles y muestras

Se recomienda utilizar un programa informático capaz de realizar los siguientes cálculos: restar el valor de DO del

blanco de cada pocillo de control o muestra. Calcular la concentración de calprotectina del control o muestra en cada pocillo, en $\mu\text{g/g}$, utilizando la curva estándar establecida.

Intervalo de trabajo 10-600 $\mu\text{g/g}$

Si se selecciona el procedimiento ELISA de intervalo inferior, las concentraciones del calibrador deben fijarse como sigue: 10, 30, 100, 300 y 600 $\mu\text{g/g}$ de calprotectina. Los resultados deben multiplicarse por los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final diferente a 1:2500) para obtener los resultados finales.

Consultar la tabla 12 y la figura 1 para datos representativos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva estándar se muestran solo a efecto de ejemplificación. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras a analizar.

Intervalo de trabajo 30-1800 $\mu\text{g/g}$

Si se elige el procedimiento ELISA de intervalo extendido, los valores nominales del calibrador deben fijarse como sigue: 30, 90, 300, 900 y 1800 $\mu\text{g/g}$ de calprotectina. Los resultados deben multiplicarse por los factores de dilución adicionales (si se utiliza una dilución final diferente a 1:7500) para obtener los resultados finales.

Consultar la tabla 15 y la figura 3 para datos representativos (resultados y curva estándar). Estos resultados y la curva estándar se muestran solo a efecto de ejemplificación. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras a analizar.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con el kit BÜHLMANN fCAL® ELISA están destinados exclusivamente a la determinación de la concentración de calprotectina en muestras de heces humanas.
- Los resultados del ensayo deben ser interpretados en combinación con la información derivada de la evaluación clínica del paciente y los otros procedimientos diagnósticos.
- En el control de la EII, se ha sugerido que las mediciones múltiples de calprotectina fecal realizadas a intervalos de hasta 4 semanas maximizan la precisión diagnóstica en el pronóstico las recaídas clínicas de los enfermos (ref. 19-20).
- Los resultados pueden no ser clínicamente aplicables a niños menores de 4 años de edad con ligeros aumentos de la concentración de calprotectina fecal (ref. 21-24).
- Los pacientes que toman antiinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden presentar concentraciones elevadas de calprotectina fecal.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I. Diferenciar entre las enfermedades gastro-intestinales orgánicas de las funcionales

Las categorías de resultados se basan en datos de estudios clínicos realizados por BÜHLMANN y son recomendaciones de BÜHLMANN. Todos los resultados del ensayo deben ser interpretados en combinación con la información derivada de las manifestaciones clínicas del paciente, sus antecedentes médicos y otros datos clínicos y de laboratorio:

Umbrales clínicos

Se analizaron los resultados de 58 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con SII y 131 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con EII, de un estudio clínico internacional, para obtener los valores mostrados en la tabla 4.

Concentración de calprotectina	Interpretación	Seguimiento
< 80 $\mu\text{g/g}$	Normal	Ninguno
80 – 160 $\mu\text{g/g}$	Zona gris/valor límite	Seguimiento en un plazo de 4 a 6 semanas
> 160 $\mu\text{g/g}$	Elevado	Repetir según sea necesario

Tabla 4

Valores de calprotectina por debajo de 80 $\mu\text{g/g}$

Unos valores de calprotectina fecal <80 $\mu\text{g/g}$ no son indicativos de inflamación gastrointestinal. Los pacientes con bajas concentraciones de calprotectina probablemente no necesiten procedimientos invasivos para determinar la causa de la inflamación.

Valores de calprotectina entre o igual a 80 y 160 $\mu\text{g/g}$

Unos valores intermedios de calprotectina fecal de entre o igual a 80 y 160 $\mu\text{g/g}$, también denominados valores de la zona gris, no son una indicación directa de inflamación activa que requiera un seguimiento inmediato con pruebas invasivas. Sin embargo, no se puede excluir la presencia de inflamación. Se recomienda la reevaluación de los valores de calprotectina fecal después de entre 4 y 6 semanas para determinar el estado inflamatorio.

Valores de calprotectina superiores a 160 $\mu\text{g/g}$

Los valores de calprotectina fecal >160 $\mu\text{g/g}$ son indicativos de infiltrado neutrofilico en el tubo gastrointestinal y pueden indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria activa. Se recomienda llevar a cabo los procedimientos de investigación especializados oportunos para alcanzar un diagnóstico clínico global.

Evaluación clínica

La capacidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA para diferenciar la EII de los otros trastornos gastrointestinales no inflamatorios, incluido el SII, se evaluó en un estudio clínico en el que participaron 337 pacientes adultos y niños. Ciento treinta y cinco (135) pacientes tenían un diagnóstico final de EII (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o colitis intermedia), 130 pacientes presentaban SII y 72 pacientes presentaban dolor abdominal y/o diarrea u otras afecciones gastrointestinales no inflamatorias (véase la tabla 5). El diagnóstico final se apoyó en datos endoscópicos y otros datos clínicos.

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 $\mu\text{g/g}$ y una especificidad clínica del 83,7% a 160 $\mu\text{g/g}$ en la diferenciación entre la EII y otras afecciones gastrointestinales no inflamatorias, incluido el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,923 (véase la tabla 6).

Se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 93,3% a 80 $\mu\text{g/g}$ y una especificidad clínica del 85,4% a 160 $\mu\text{g/g}$ en la diferenciación entre la EII y el SII. El análisis de la curva de eficacia diagnóstica dio como resultado un AUC de 0,933 (véase la tabla 8).

La combinación óptima de cortes para estos grupos de pacientes se estableció en 80 $\mu\text{g/g}$ y 160 $\mu\text{g/g}$ de calprotectina mediante el análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC). Esta combinación es

ligeramente más restrictiva que la combinación de **un corte inferior más sensible de 50 µg/g**, con una especificidad ligeramente inferior, y **un corte superior de 200 µg/g**, con una sensibilidad ligeramente inferior (tablas 7 y 9).

II. IMonitorización de EII

Umbrales clínicos y evaluación

La determinación de la calprotectina fecal es un método fiable y sencillo para facilitar el control de los pacientes con EII (ref. 7-18).

Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios independientes determinaron la correlación entre los valores de calprotectina y el estado inflamatorio de la mucosa intestinal del paciente basado en las evaluaciones endoscópicas (tabla 10). Utilizando los ensayos de calprotectina de BÜHLMANN, tres estudios determinaron el valor diagnóstico de la calprotectina para pronosticar la remisión y las recaídas clínicas, sobre la base de los síntomas, los índices de actividad clínica, la necesidad no programada de aumento del tratamiento, la hospitalización y las urgencias (tabla 11).

Las categorías de resultados mostradas son recomendaciones y su determinación se basa en el conocimiento condensado de los valores de corte y los estudios de eficacia diagnóstica publicados. Se recomienda la determinación de los umbrales individuales de cada paciente por el médico sobre la base del valor de referencia de calprotectina del paciente durante la remisión de la enfermedad.

Valores de calprotectina por debajo de 100 µg/g

Unos valores de calprotectina fecal por debajo de 100 µg/g pueden indicar de forma fiable que el paciente presenta bajo riesgo de recaída clínica y se encuentra en remisión endoscópica, por lo que pueden evitarse los procedimientos endoscópicos invasivos (ref. 7-18).

Valores de calprotectina entre 100 y 300 µg/g

Valores de calprotectina fecal entre 100-300 µg/g pueden indicar la necesidad de un control más estricto para evaluar las tendencias de desarrollo de la enfermedad.

Valores de calprotectina superiores a 300 µg/g:

Si se obtienen valores de calprotectina fecal superiores a 300 µg/g, se debe repetir el ensayo y, en caso de confirmarse el resultado, realizar más pruebas de forma prioritaria (ref. 7-18).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La eficacia diagnóstica de BÜHLMANN fCAL® ELISA se estableció utilizando el método de extracción manual, a menos que se indique lo contrario.

Intervalo de trabajo: 10-600 µg/g

Repetibilidad (precisión intraensayo): 1,9-8,0% CV

Precisión dentro de un mismo laboratorio: 5,5-14,0% CV

La repetibilidad y la precisión dentro del laboratorio se determinaron de acuerdo con la norma EP05-A2 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 22 días × 2 repeticiones. Se analizaron diez muestras de heces extraídas con concentraciones de calprotectina que oscilaban entre 13,2 y 501,4 µg/g (Tabla 13).

Límite de detección (LoD): 4,2 µg/g

El LoD se determinó de acuerdo con la norma EP17-A del CLSI y con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5% y de falsos negativos (β) inferiores al 5% sobre la base

de 240 determinaciones, con 80 muestras de blanco (tampón de extracción) y 160 repeticiones de valores bajos; y un **LoB de 0,29 µg/g**.

Límite de cuantificación (LoQ): 9,8 µg/g

El LoQ se determinó utilizando los datos obtenidos en el estudio de precisión dentro del laboratorio, incluyendo una muestra fecal adicional con una concentración de 7,4 µg/g. El LoQ se determinó como la concentración de calprotectina en la que el ajuste no lineal de los datos de precisión total intersecta el valor deseado de precisión del 20% CV.

Linealidad: 10-600 µg/g

El intervalo de linealidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA se ha determinado conforme a la norma EP06-A del CLSI. Se permitió una desviación máxima de la linealidad de ±20%. Para valores inferiores a 75 µg/g se permitió una diferencia absoluta inferior a ±15 µg/g (tabla 14).

Exactitud/Recuperación

Sesgo total: -1,1%;

Límite inferior de concordancia: -17,5%;

Límite superior de concordancia: 15,4%

Cuatro muestras fecales extraídas negativas se enriquecieron con cantidades crecientes de calprotectina de muestras de suero. Los resultados se presentan en la figura 2.

Efecto gancho a dosis altas

Se pueden medir muestras con concentraciones teóricas de hasta 60'000 µg/g sin limitar el intervalo de medición del ensayo.

Intervalo de trabajo: 30-1800 µg/g

Repetibilidad (precisión intraensayo): 1,7-5,8% CV

Precisión dentro de un mismo laboratorio: 3,1-9,4% CV

La repetibilidad y la precisión dentro del laboratorio se determinaron de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 10 días × 2 series × 4 repeticiones. Se analizaron siete extractos de muestras de heces combinadas con concentraciones de calprotectina que oscilaban entre 38,5 y 918,0 µg/g (Tabla 16).

Precisión entre lotes: 4,2-9,7% CV

La reproducibilidad entre lotes se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 3 lotes × 5 días × 5 repeticiones y un modelo de componentes de varianza de efectos aleatorios. Se analizaron seis extractos de muestras con concentraciones de calprotectina que oscilaban entre 46,4 y 1476,1 µg/g (Tabla 17).

Reproducibilidad (estudio multicéntrico de evaluación de la precisión): 6,4-19,0% CV

La reproducibilidad se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI con un diseño de 3 laboratorios × 2 operadores × 5 días × 2 series × 4 repeticiones. En el estudio se usaron tres lotes de reactivos. Se analizaron cinco extractos de muestras de heces combinadas con concentraciones de calprotectina que oscilaban entre 42,1 y 1053,3 µg/g (Tablas 18).

Límite de detección (LoD): 12,6 µg/g

El LoD se determinó de acuerdo con la norma EP17-A2 del CLSI y con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5% y de falsos negativos (β) inferiores al 5% sobre la base de 120 determinaciones, con 60 muestras de blanco

(tampón de extracción) y 60 repeticiones de valores bajos; y un LoB de 8,3 µg/g.

Límite de cuantificación (LoQ): 21,3 µg/g

El LoQ se determinó conforme a la norma EP17-A2 del CLSI sobre la base de 60 determinaciones y un objetivo de precisión del 20% CV.

Linealidad: 30-1800 µg/g

El intervalo de linealidad de BÜHLMANN fCAL® ELISA se ha determinado conforme a la norma EP06-A del CLSI. Se permitió una desviación máxima de la linealidad de ±20%. Para valores inferiores a 75 µg/g se permitió una diferencia absoluta inferior a ±15 µg/g (tabla 19).

Exactitud / recuperación: 96,4-102,2%

Siete extractos de muestras de heces con valores de calprotectina que oscilaban entre 46,5-990,2 µg/g se enriquecieron con 180 µg/g de calprotectina del material de calibración. El enriquecimiento se realizó al 10% del volumen del extracto de la muestra. Las «muestras de referencia» se enriquecieron con el volumen correspondiente de tampón de incubación. Las muestras de referencia y las muestras enriquecidas se analizaron por triplicado (Tabla 20).

Procedimientos preanalíticos

La eficacia diagnóstica de BÜHLMANN fCAL® ELISA en lo relativo a los procedimientos preanalíticos se estableció en el intervalo de trabajo 30-1800 µg/g.

Reproducibilidad de la extracción - extracción

manual: 9,5-20,5%

La reproducibilidad de la extracción se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 10 extracciones × 2 repeticiones. Se analizaron nueve muestras clínicas de heces, que comprendían muestras con consistencia sólida, semisólida y líquida, con valores de concentración de calprotectina de entre 51,2 y 1783,7 µg/g, (Table 21).

Reproducibilidad de la extracción: CALEX® Cap:

7,9-16,9%

La reproducibilidad de la extracción se determinó de acuerdo con la norma EP05-A3 del CLSI utilizando un diseño de estudio de 3 lotes de CALEX® Cap × 4 extracciones × 4 réplicas. Se analizaron cinco muestras clínicas de heces, que comprendían muestras con consistencia sólida, semisólida y líquida, con valores de concentración de calprotectina de entre 42,5 y 2949,9 µg/g (Tabla 22).

Comparación de métodos: CALEX® Cap frente a extracción manual

Sesgo en 80 µg/g: 5,9% (IC del 95%: 1,4-12,2%)

Sesgo en 160 µg/g: 12,0% (IC del 95%: 7,8-17,0%)

Sesgo medio: 10,1% (IC del 95%: 5,7-14,5%)

El estudio del método de comparación se realizó conforme a la norma EP09-A3 del CLSI. Se extrajeron doscientas cuarenta y una (241) muestras clínicas con un lote del dispositivo CALEX® Cap. Se establecieron valores de referencia, con un intervalo de concentración final de calprotectina de 30,5-1496,6 µg/g, con el método de extracción manual. Se realizaron valoraciones únicas para ambos métodos. El sesgo se determinó mediante regresión lineal de Passing-Bablok y el método de Bland-Altman (tablas 23 y 24).

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

La sensibilidad del ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA a los productos farmacéuticos orales, suplementos nutricionales, hemoglobina y microbios enteropatógenos se evaluó de acuerdo con la norma EP07-A2 del CLSI. Sesgos superiores al 10% en los resultados se consideraron interferencia. No se detectaron interferencias con las sustancias que se muestran en la tabla 25, hasta las concentraciones indicadas. No se detectó interferencia con los microbios enteropatógenos que se muestran en la tabla 26 hasta las concentraciones indicadas de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de extracto fecal.

TABLAS Y FIGURAS

Estudios clínicos

Estudios clínicos - Diferenciar entre las enfermedades gastrointestinales orgánicas de las funcionales

Diagnóstico final	Distribución de los resultados de los pacientes en número (porcentaje) en los intervalos diagnósticos del ensayo BÜHLMANN fCAL® ELISA.			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
EII	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
SII	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Otros trastornos GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabla 5

EII frente a no EII	Punto de decisión clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidad (IC del 95%)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Especificidad (IC del 95%)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
VPP (IC del 95%)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
VPN (IC del 95%)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
AUC ROC (IC del 95%)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabla 6

EII frente a no EII	Punto de decisión clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidad (IC del 95%)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Especificidad (IC del 95%)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
VPP (IC del 95%)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
VPN (IC del 95%)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabla 7

EII frente a SII	Punto de decisión clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidad (IC del 95%)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Especificidad (IC del 95%)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
VPP (IC del 95%)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
VPN (IC del 95%)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
AUC ROC (IC del 95%)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabla 8

EII frente a SII	Punto de decisión clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidad (IC del 95%)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Especificidad (IC del 95%)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
VPP (IC del 95%)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
VPN (IC del 95%)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabla 9

No EII - SII + otros trastornos GI

IC – intervalo de confianza

VPP – valor predictivo positivo

VPN - valor predictivo negativo

AUC ROC - área bajo la curva de características operativas del receptor

Estudio clínico – Control de la EII

Calprotectina ¹ frente a actividad de la EII determinada por vía endoscópica	Estudio 1 España (v. ref. 9)	Estudio 2 España (v. ref. 10)	Estudio 3 Australia, Nueva Zelanda (v. ref.11)
Número, edad y sexo de los pacientes	89 (EC ²) Edades: 32-58 44% hombres	123 (CU ³) Edades: 18-85 66,4% hombres	99 (EC ² after resection) Edades: 29-47 46,5% hombres
Corte	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
VPN	98%	86%	91%
VPP	76%	80,3%	53%

Tabla 10

¹ Estudio 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL y Quantum Blue® fCAL high range
Estudio 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² EC = Pacientes con enfermedad de Crohn

³ CU = Pacientes con colitis ulcerosa

Estudio clínico – Control de la EII

Calprotectina ¹ frente a remisión o recaída clínica en el futuro	Estudio 4 REINO UNIDO (v. ref. 12)	Estudio 5 España (v. ref. 13)	Estudio 6 España (v. ref. 14)
Número, edad y sexo de los pacientes	92 (EC ²) 38% hombres	30 (EC ²) tratamiento con adalimumab Edades: 24-64 43,3% hombres	33 (EC ²) 20 (CU ³) terapia con infliximab Edades: 18-68 47,2% hombres
Período de seguimiento después de la medición de calprotectina	12 meses	4 meses	12 meses
Pacientes en recaída clínica después del seguimiento	11%	30%	23%
Corte	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
VPN	96,8%	100%	96,1%
VPP	27,6%	75%	68,7%

Tabla 11

¹ Estudio 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Estudio 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL y Quantum Blue® fCAL high range

² EC = Pacientes con enfermedad de Crohn

³ CU = Pacientes con colitis ulcerosa

TABLAS Y FIGURAS

Procedimiento para el intervalo de valores más bajos 10-600 µg/g/

Ejemplo de resultados

	Conc. [µg/g]	Absorb. [OD]	Calc. Conc. [µg/g]	CV Conc [%]
Media del blanco		0,096		
Cal A	10	0,073		
Cal A	10	0,066		
Media de Cal A	10	0,069		7,2
Cal B	30	0,143		
Cal B	30	0,153		
Media de Cal B	30	0,148		4,8
Cal C	100	0,465		
Cal C	100	0,456		
Media de Cal C	100	0,460		1,4
Cal D	300	1,121		
Cal D	300	1,135		
Media de Cal D	300	1,128		0,9
Cal E	600	1,658		
Cal E	600	1,671		
Media de Cal E	600	1,664		0,6
Ctrl Low		0,201	41	
Ctrl Low		0,189	39	
Media del control bajo		0,195	40	4,4
Ctrl High		0,598	134	
Ctrl High		0,583	130	
Media del control alto		0,590	132	1,8

Tabla 12

Ejemplo de curva estándar

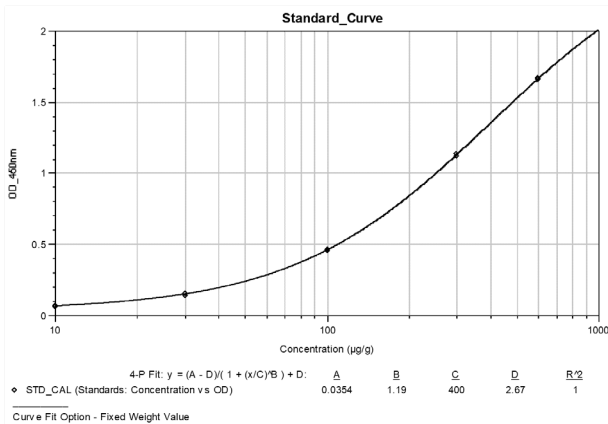


Figura 1

Precisión dentro de un mismo laboratorio

Muestra n.º	n	Media [µg/g]	Repetibilidad		Entre días		Precisión total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
#1957	44	13,2	1,0	8,0%	1,5	11,6%	1,8	14,0%
#1933	42	20,5	0,9	4,2%	1,6	7,7%	1,8	8,8%
#1934	44	19,7	1,2	6,0%	1,6	8,4%	2,0	10,3%
#1935	44	37,1	1,2	3,2%	2,1	5,8%	2,4	6,7%
#1936	44	35,4	0,9	2,7%	2,5	7,4%	2,7	7,8%
#1937	44	58,6	1,6	2,9%	3,6	6,4%	3,9	7,0%
#1938	44	83,9	2,6	3,1%	4,3	5,2%	5,0	6,0%
#1939	44	141,4	2,6	1,9%	7,1	5,2%	7,5	5,5%
#1956	44	294,1	14,0	4,8%	18,0	6,2%	22,8	7,8%
#1940	44	501,4	27,7	5,7%	20,9	4,3%	34,7	7,1%

Tabla 13

Linealidad

ID	Intervalo de medición analizado	R ²	Valor de p para el coeficiente no lineal	Intervalo de linealidad
S1	2,3 – 740,0	0,972	p > 0,05	3,1 – 602,8
S2	5,1 – 999,5	0,988	p < 0,05	5,1 – 654,0
S3	1,3 – 690,2	0,994	p < 0,05	3,9 – 690,2
S4	9,6 – 827	0,940	p < 0,05	9,6 – 658,7

Tabla 14

Recuperación del analito

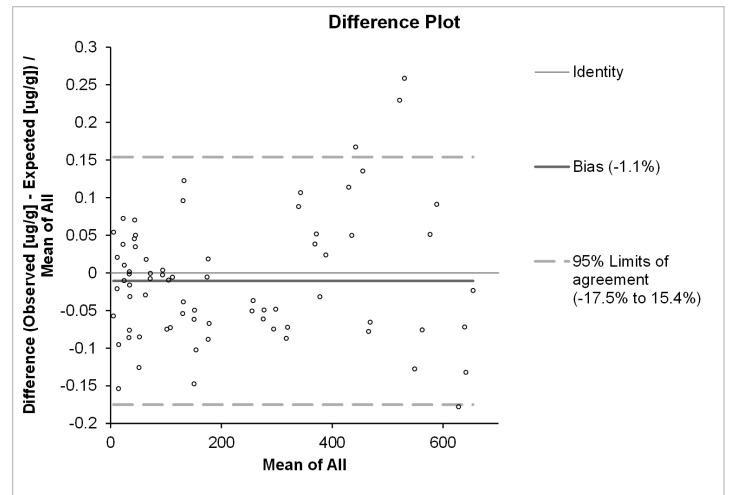


Figura 2

TABLAS Y FIGURAS

Procedimiento para el intervalo de valores amplio 30-1800 µg/g

Ejemplo de resultados

	Concentración [µg/g]	Absorbancia [DO]
Calibrador A	30	0,047
	30	0,046
Calibrador B	90	0,138
	90	0,140
Calibrador C	300	0,464
	300	0,452
Calibrador D	900	1,207
	900	1,192
Calibrador E	1800	1,627
	1800	1,630
Media del blanco		0,057
Control bajo		0,147
		0,162
Control alto		0,618
		0,618

Tabla 15

Ejemplo de curva estándar

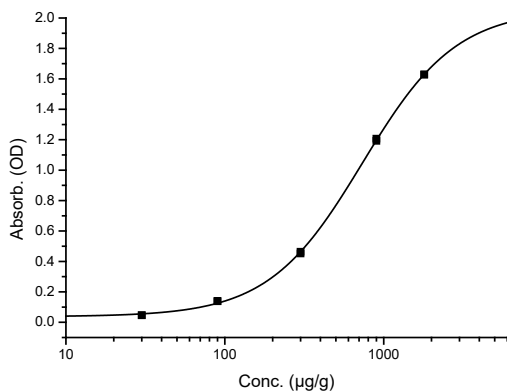


Figura 3

Precisión dentro de un mismo laboratorio

ID	Media [µg/g]	n	Repetibilidad		Entre series		Entre días		Dentro de un mismo laboratorio	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
P1	38,5	80	2,3	5,8%	1,8	4,8%	2,2	5,6%	3,6	9,4%
P2	67,0	80	2,0	3,0%	3,5	5,2%	1,6	2,4%	4,3	6,4%
P3	135,7	80	2,3	1,7%	5,6	4,1%	0,0	0,0%	6,0	4,4%
P4	207,1	80	4,1	2,0%	12,5	6,0%	0,0	0,0%	13,2	6,4%
P5	337,1	80	5,9	1,8%	18,3	5,4%	0,0	0,0%	19,3	5,7%
P6	562,6	80	11,0	2,0%	13,6	2,4%	2,5	0,4%	17,7	3,1%
P7	918,0	80	18,6	2,0%	62,1	6,8%	20,8	2,3%	68,1	7,4%

Tabla 16

Precisión entre lotes

ID	Media [µg/g]	n	Intraserial		Entre días		Entre lotes		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
2	46,4	74	2,5	5,5%	0,5	1,1%	2,4	5,3%	4,5	9,7%
3	105,5	75	2,5	2,4%	1,4	1,4%	2,1	2,0%	4,5	4,2%
4	133,6	75	5,0	3,8%	1,9	1,4%	4,2	3,2%	7,2	5,4%
5	178,5	75	6,3	3,5%	0,0	0,0%	6,3	3,5%	9,2	5,2%
6	435,2	75	12,4	2,9%	7,5	1,7%	18,1	4,2%	23,2	5,3%
7	1476,1	75	48,4	3,3%	88,6	6,0%	31,4	2,1%	110,6	7,5%

Tabla 17

Reproducibilidad (estudio multicéntrico de evaluación de la precisión)

ID	Media [µg/g]	n	Entre operadores		Entre laboratorios		Total (reproducibilidad)	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	42,1	236	0,0	0,0%	4,4	10,4%	8,0	19,0%
S02	67,4	238	1,7	2,6%	3,9	5,7%	8,6	12,7%
S03	142,3	238	2,4	1,7%	4,0	2,8%	16,8	11,8%
S04	379,8	240	0,0	0,0%	13,7	3,6%	24,2	6,4%
S05	1053,3	238	39,5	3,8%	64,4	6,1%	97,3	9,2%

Tabla 18

Linealidad

ID	Intervalo de medición analizado [µg/g]	R ²	Valor de p para el coeficiente no lineal	Intervalo de linealidad [µg/g]
FRB	22,8 – 1932,0	0,998	p < 0,05	24,6 – 1932,0
FRC	26,2 – 2096,2	0,997	p < 0,05	26,2 – 2096,2

Tabla 19

Exactitud / recuperación

ID	Valor medio muestra inicial [µg/g]	Valor esperado muestra inicial + enriquecida [µg/g]	Valor observado muestra inicial + enriquecida [µg/g]	Porcentaje de recuperación [%]
#1	46,5	226,5	224,5	99,1%
#2	63,7	243,7	247,7	101,6%
#3	89,0	269,0	274,9	102,2%
#4	111,6	291,6	292,0	100,1%
#5	163,5	343,5	331,1	96,4%
#6	304,0	484,0	475,0	98,1%
#7	990,2	1170,2	1166,6	99,7%

Tabla 20

TABLAS Y FIGURAS

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO – PROCEDIMIENTOS

Reproducibilidad de la extracción: pesaje manual

ID	Media [µg/g]	n	Dentro de una misma extracción		Entre extracciones		Precisión total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	51,2	20	4,5	8,9%	7,8	15,2%	9,0	17,6%
S03	88,3	20	6,6	7,5%	13,3	15,0%	14,8	16,8%
S05	66,8	20	10,6	15,8%	3,7	5,5%	11,2	16,7%
S06	179,3	20	16,8	9,4%	32,8	18,3%	36,8	20,5%
S07	366,1	20	22,4	6,1%	32,3	8,8%	39,3	10,7%
S08	327,4	20	15,4	4,7%	26,9	8,2%	31,0	9,5%
S09	1783,7	20	198,3	11,1%	262,0	14,7%	328,6	18,4%

Tabla 21

Reproducibilidad de la extracción: CALEX® Cap

ID	Media [µg/g]	Dentro de una misma extracción		Entre extracciones		Entre lotes		Precisión total	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	42,5	1,6	3,9%	5,2	12,1%	0,0	0,0%	5,4	12,7%
B	126,5	3,2	2,5%	9,6	7,6%	9,3	7,4%	13,8	10,9%
C	207,4	5,1	2,4%	34,8	16,8%	0,0	0,0%	35,1	16,9%
D	515,5	13,9	2,7%	38,2	7,4%	0,0	0,0%	40,7	7,9%
E	2949,9	93,0	3,2%	214,6	7,3%	47,0	1,6%	238,6	8,1%

Tabla 22

Comparación de métodos: extracción con CALEX® Cap o manual

Análisis de Bland-Altman		
Sesgo medio (95%)	Límite inferior de concordancia (IC del 95%)	Límite superior de concordancia (IC del 95%)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabla 23

Análisis de regresión de Passing-Bablok				
Pendiente (IC del 95%)	Intersección (µg/g) (IC del 95%)	Sesgo en 80 µg/g (IC del 95%)	Sesgo en 160 µg/g (IC del 95%)	r
1,181 (1,120, 1,235)	-9,7 (-16,0, -2,4)	5,9% (1,4%, 12,2%)	12,0% (7,8%, 16,9%)	0,948

Tabla 24

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Productos farmacéuticos orales, suplementos nutricionales y hemoglobina

Nombre comercial	Componente activo	Concentración mg/50 mg de heces
gyno-Tardyferon	Sulfato de hierro(II) (contiene 0,35 mg de ácido fólico)	0,11
Prednisona	Prednisona	0,31
Imurek	Azatioprina	0,19
Salofalk	Mesalazina; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalazina; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomicina	2,00
Sulfametoxazol	Sulfametoxazol	1,60
Trimetoprima	Lactato de trimetoprima	0,35
Ciproxine	Ciprofloxacino	1,25
Vitamina E	Acetato de DL-α-tocoferol	0,30
Bion 3	3 probióticos (107 CFU): <i>Lactobacillus gasseri</i> PA 16/8, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>Bifidobacterium longum</i> SP07 / 3, 12 vitaminas: A (800 µg), B1 (1,4 mg), B2 (1,6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 µg), C (60 mg), D (5 µg), E (10 mg), biotina (150 µg), ácido fólico (200 µg), niacina (18 mg) y ácido pantoténico (6 mg), y 7 minerales: yodo (100 µg), hierro (5 mg), zinc (5 mg), selenio (30 µg), cromo (25 µg), manganeso (1,2 mg) y molibdeno (25 µg).	1,06
Hemoglobina	Hemoglobina	1,25

Tabla 25

Microorganismos enteropatógenos

Nombre	Concentración final (UFC/mL de extracto de heces)
<i>Escherichia coli</i>	9,5 x 10 ⁷
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1 x 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	5,4 x 10 ⁷
<i>Citrobacter freundii</i>	9,7 x 10 ⁷
<i>Shigella flexneri</i>	1,5 x 10 ⁸
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	1,6 x 10 ⁸

Tabla 26

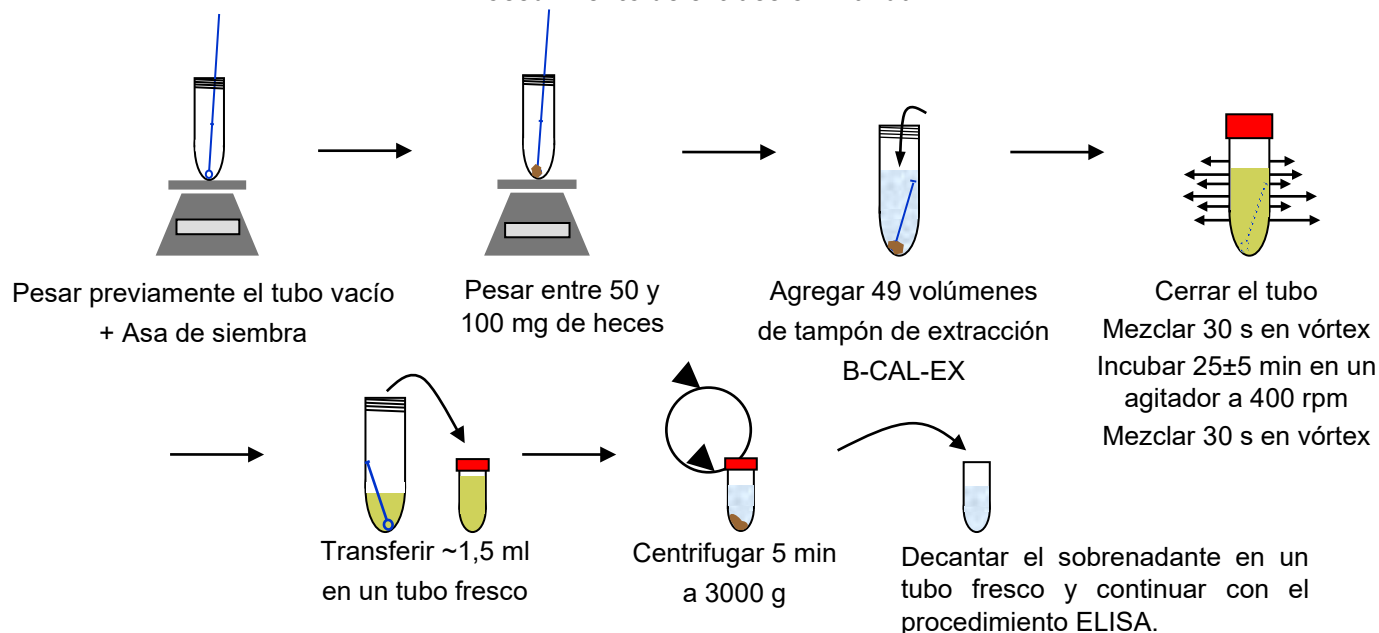
REFERENCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.*: Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreira-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreira-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lassen A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

PROCOLO BREVE

EXTRACCIÓN DE CALPROTECTINA

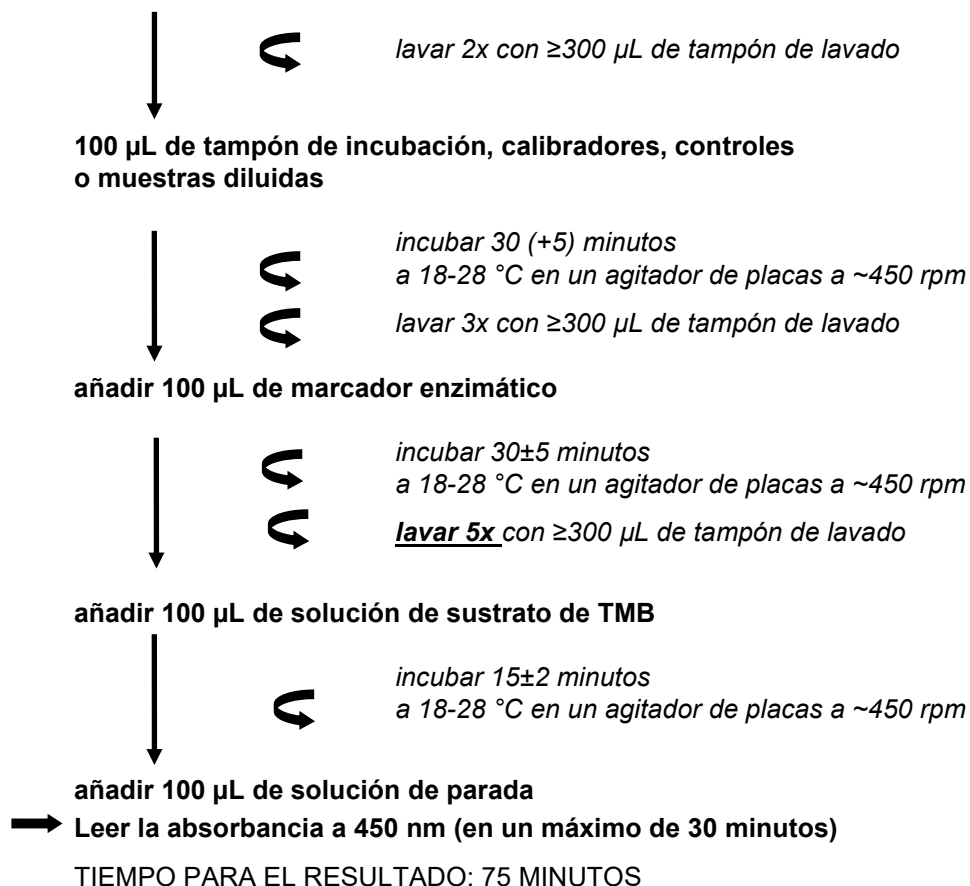
Procedimiento de extracción manual



PROCOLO BREVE

Ensayo ELISA de calprotectina

Placa de microtitulación con revestimiento previo



REGISTRO DE LOS CAMBIOS

Fecha	Versión	Cambios
2022-11-16	A3	Actualización del apartado <i>Advertencias y precauciones</i> Inclusión de los valores de incertidumbre del calibrador y justificación de la normalización interna en el apartado <i>Estandarización</i> Actualización y simplificación de la redacción del apartado «Eficacia diagnóstica», revisión del apartado <i>Símbolos</i> Nueva información sobre patentes Inclusión del número de organismo notificado en el mercado CE (procedimiento de evaluación de la conformidad según el Reglamento (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios diagnósticos <i>in vitro</i>)

NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE

Si se ha producido algún incidente grave en relación con este dispositivo, informe inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente de su Estado miembro.

DAÑOS DURANTE EL TRANSPORTE

Notificar al distribuidor si este producto se ha recibido dañado.

SÍMBOLOS

BÜHLMANN utiliza los símbolos y signos enumerados y descritos en la norma ISO 15223-1. Además, se utilizan los siguientes símbolos y signos:

Símbolo	Explicación
MP	Microplaca
BUF EX	Tampón de extracción
BUF WASH 10X	Tampón de lavado concentrado (10x)
BUF INC	Tampón de incubación
CAL A — CAL E	Calibrador A – E
CONTROL L	Control bajo
CONTROL H	Control alto
EL	Marcador enzimático
SUBS TMB	Substrato de TMB
SOLN STOP	Solución de parada

Partes del kit están protegidas por patentes EP2947459(B1); US100216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

