



BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Calprotectina ELISA

Per uso diagnostico *in vitro*

EK-CAL	96 tests
EK-CAL2	192 tests

Data di pubblicazione: 2022-11-16
Versione A3

 **Produttore**

BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Svizzera
Tel.: +41 61 487 12 12
Fax: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

ITALIANO

USO PREVISTO

BÜHLMANN fCAL® ELISA è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della calprotectina in campioni di feci umane e viene impiegato come supporto alla valutazione dell'infiammazione della mucosa intestinale. I risultati del dosaggio possono essere impiegati come supporto alla diagnosi differenziale tra malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale organiche (malattia infiammatoria intestinale (IBD), nello specifico la malattia di morbo di Crohn o colite ulcerosa (CU)) e funzionali (sindrome dell'intestino irritabile (IBS)) (rif. 1-7) in pazienti con dolore addominale cronico, nonché come supporto al monitoraggio della IBD (rif. 7-18).

Per l'uso in laboratorio.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test BÜHLMANN fCAL® ELISA consente la misurazione selettiva della calprotectina presente in estratti fecali mediante la tecnica ELISA a sandwich. I pozzetti della piastra per microtitolazione di BÜHLMANN fCAL® ELISA sono rivestiti con un anticorpo monoclonale (mAb) di cattura altamente specifico per i complessi eterodimerici e polimerici della calprotectina. Gli estratti dei campioni di feci dei pazienti, i controlli per la determinazione dell'accettabilità di ogni analisi del test ELISA e i calibratori vengono caricati nei pozzetti della micropiastra. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e le fasi di lavaggio, un anticorpo (Ab) di rilevazione coniugato con perossidasi di rafano (HRP) rileva le molecole di calprotectina legate all'anticorpo di cattura che riveste i pozzetti della piastra. Dopo l'incubazione e altre fasi di lavaggio si aggiunge TMB (tetrametilbenzidina, il substrato cromogenico della HRP, che determina la formazione di colore blu), quindi la reazione viene bloccata (e il suo colore vira al giallo). L'assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm. La concentrazione finale di calprotectina (espressa in µg/g di feci) nel campione del paziente è calcolata per interpolazione dalla curva di calibrazione ottenuta dalla misurazione dei calibratori.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampone di estrazione	3 flaconi x 125 mL	6 flaconi x 125 mL	B-CAL-EX	Pronto all'uso
Micropiastra pre-rivestita con mAB anti- calprotectina	12 strisce da 8 pozzetti con supporto	2 x 12 strisce da 8 pozzetti con supporto	B-CAL-MP	Pronto all'uso
Foglio sigillante per piastre	3 pezzi	6 pezzi	-	Pronto all'uso
Tampone di lavaggio concentrato (10x) con conservanti	1 flacone x 100 mL	2 flaconi x 100 mL	B-CAL- WB	Diluire ogni flacone con 900 mL di H ₂ O deionizzata

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAL	EK-CAL2		
Tampone di incubazione con conservanti	2 flaconi x 125 mL	3 flaconi x 125 mL	B-CAL-IB	Pronto all'uso
Calibratori da A a E^{1) 2)} Calprotectina di derivazione sierica in una matrice tampone con conservanti	5 fiale x 1 mL	5 fiale x 1 mL	B-CAL- CASET	Pronto all'uso
Controlli basso / alto³⁾ Calprotectina di derivazione sierica in una matrice tampone con conservanti	2 fiale x 1 mL	2 fiale x 1 mL	B-CAL- CONSET	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico Ab anti- calprotectina coniugato con HRP	1 fiala x 12 mL	2 fiale x 12 mL	B-CAL-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in tampone citrato	1 fiala x 12 mL	2 fiale x 12 mL	B-TMB12	Pronto all'uso
Soluzione di stop Acido solforico 0,25 M	1 fiala x 12 mL	2 fiale x 12 mL	B-ST512	Pronto all'uso Agente corrosivo

Tabella 1

- ¹⁾ La concentrazione effettiva di calprotectina nei calibratori da A a E è rispettivamente di 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL. Se si utilizza una procedura ELISA nella gamma inferiore, i valori dei calibratori devono essere così impostati: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di calprotectina. Questa assegnazione corrisponde a una diluizione finale 1:2.500 del campione quando analizzato con la procedura ELISA nella gamma inferiore.
- ²⁾ Se si sceglie una procedura ELISA nella gamma esteso, i valori nominali dei calibratori devono essere così impostati: 30, 90, 300, 900 e 1.800 µg/g di calprotectina. Questa assegnazione corrisponde a una diluizione finale 1:7.500 del campione quando analizzato con la procedura ELISA nella gamma esteso.
- ³⁾ I controlli contengono quantità lotto-specifiche di calprotectina umana nativa. Per le concentrazioni effettive, consultare la scheda dati-QC aggiuntiva.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI E DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

Reagenti sigillati/non aperti	
Conservare a 2-8 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti/ricostituiti	
Tampone di estrazione	Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi.
Micropiastre	Riporre subito le strisce di pozzetti non utilizzate dentro la busta di alluminio contenente l'essiccante e risigillarla premendo lungo tutta la chiusura ermetica. Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi.
Tampone di incubazione	
Calibratori	
Controlli	
Marcatore enzimatico	
Substrato TMB	
Soluzione di stop	

Tabella 2

REAGENTI E MATERIALI SUPPLEMENTARI DISPONIBILI

Dispositivi per l'estrazione delle feci

I dispositivi per l'estrazione delle feci descritti nella Tabella 3 non fanno parte del kit. I dispositivi di estrazione indicati devono essere ordinati separatamente.

Kit di dispositivi di estrazione	Quantità	Codice
CALEX® Cap	Sono disponibili confezioni da 50, 200 o 500 provette contenenti 5 mL di tampone di estrazione ciascuna Pronte all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 provette, spatole e camere di raccolta per le feci	B-CAL-RD

Tabella 3

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Procedura di estrazione

- Pipettatori di precisione da 100 µL e 1.000 µL con puntali monouso
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per il trasferimento degli estratti (opzionali)
- Cappa a flusso laminare
- Miscelatore vortex per più provette / Miscelatore vortex
- Microcentrifuga (≥3.000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)
- Dispositivi di estrazione (vedere tabella 3 sopra) o per la procedura di estrazione manuale:
 - Anse per l'inoculazione da 10 µL monouso

- Provette di polipropilene da 15 mL con tappo a vite indispensabile
- Bilancia di precisione (10-200 mg)

Procedura del test ELISA

- Pipettatori di precisione da 10 µL, 100 µL e 1.000 µL con puntali monouso
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione delle diluizioni dei campioni
- Cilindro da 1.000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistema di lavaggio per micropiastre (vedere le precauzioni tecniche) o erogatore a spruzzo per il tampone di lavaggio
- Agitatore di micropiastre (vedere le precauzioni tecniche)
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per misurare l'assorbanza a 450 nm

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Precauzioni per la sicurezza

- I calibratori e i controlli di questo test contengono componenti di origine umana. Sebbene i reagenti siano stati testati per l'antigene di superficie del virus HBV e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV 1/2 e siano risultati negativi, vanno considerati come potenziali vettori di infezioni e quindi maneggiati secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) adottando le precauzioni del caso.
- I componenti contenuti in questo kit sono classificati conformemente al Regolamento (CE) N. 1272/2008: cloridrato di 2-metil-4-isotiazolin-3-one (conc. ≥ 0,0015%), pertanto i reagenti possono causare reazioni allergiche cutanee (H317).
Acido solforico (conc. ≥2,5 <5%), pertanto i reagenti possono causare reazioni allergiche cutanee (H315) e irritazione oculare grave (H319.)
- Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua; in caso contrario può manifestarsi irritazione / ustioni.
- I reagenti e gli agenti chimici devono essere trattati come rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

Precauzioni tecniche

Componenti del kit

- I residui presenti nella micropiastra derivano dal processo di produzione. Vengono rimossi nella fase di lavaggio (fase 3 della procedura di analisi) e non influiscono sui risultati.
- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- Non mescolare né usare componenti di kit con numero di lotto diverso.

- Adottare tutte le precauzioni possibili per evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti.
- Lasciar equilibrare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso. Miscelare bene (con vortex) i reagenti prima dell'uso.
- I pozzetti della micropiastra non possono essere riutilizzati.

Procedura di estrazione manuale

- Per ottenere risultati quantitativi, è importante omogeneizzare completamente il campione fecale aggiunto al tampone di estrazione. Si deve evitare di contaminare il bordo superiore della provetta di estrazione. Dopo la miscelazione può rimanere una piccola quantità di particelle insolubili.

Procedura del test ELISA

- Nella procedura del test ELISA le fasi di lavaggio sono essenziali per garantire risultati riproducibili. L'incubazione del tampone di lavaggio nei pozzetti deve durare per minimo 20 secondi prima che venga riaspirato.
- Se si usa un sistema di lavaggio automatico, si raccomanda fortemente di usare la "modalità piastra", cioè ogni fase della procedura (erogazione/aspirazione) viene eseguita in sequenza su tutte le strisce prima che lo strumento prosegua con il ciclo di lavaggio successivo. In questo modo il tempo di incubazione minimo è garantito.
- Il numero indicato di cicli di lavaggio è obbligatorio per garantire la riproducibilità dei risultati.
- L'agitatore per piastre deve essere impostato su circa 450 rpm (7,5 Hz). Frequenze di rotazione più elevate possono causare scarsa linearità di diluizione a valori compresi tra 300/900 e 600/1.800 µg/g. Si deve selezionare un movimento rotatorio e non orizzontale.
- Per essere sicuri che la reazione antigene/anticorpo sia completa, il tempo di incubazione nella fase 5 deve essere di almeno 30 minuti. Tempi di incubazione leggermente più lunghi (fino a 5 minuti in più) non influiscono sul risultato finale.
- Il marcatore enzimatico è inattivato dall'ossigeno ed è estremamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso e agli idroclorocarburi aromatici spesso presenti nelle reti idriche che riforniscono i laboratori. Perciò va usata solo acqua deionizzata di alta qualità.
- Ogni volta che si esegue il test (ogni piastra o piastra parziale) va generata una nuova curva standard.
- Se la concentrazione iniziale di un campione ignoto fornisce letture che superano la concentrazione del calibratore più alto, ossia il calibratore E, il campione può essere ulteriormente diluito con il tampone di incubazione e nuovamente analizzato secondo la procedura del test. Per il calcolo dei risultati va tenuto conto del fattore di diluizione totale risultante.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per la procedura di estrazione è necessario meno di 1 g di campione di feci native. Raccogliere il campione di feci in provette semplici.

Importante: Il campione deve essere raccolto senza l'aggiunta di nessun additivo chimico o biologico.

Trasporto dei campioni

I campioni di feci devono essere ricevuti per il processamento da parte del laboratorio entro 3 giorni dalla raccolta. I campioni di feci possono essere spediti a temperatura ambiente o refrigerati.

Conservazione dei campioni

I campioni di feci devono essere refrigerati a 2-8 °C ed estratti entro 3 giorni dalla ricezione in laboratorio. I campioni non vanno conservati a temperature elevate.

ESTRAZIONE DEI CAMPIONI DI FECI E STABILITÀ DEGLI ESTRATTI

1. CALEX® Cap

1.1 Procedura di estrazione

Seguire le Istruzioni per l'uso fornite insieme al dispositivo CALEX® Cap (Codice: B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

I campioni di feci liquide possono essere pipettati direttamente nel dispositivo CALEX® Cap. Svitare il tappo blu e pipettare 10 µL di campione di feci nel dispositivo. Richiudere il dispositivo CALEX® Cap e vortexare secondo la procedura di estrazione descritta e illustrata nelle Istruzioni per l'uso fornite insieme al dispositivo CALEX® Cap.

Importante: dopo l'estrazione, centrifugare il dispositivo CALEX® Cap per 5 minuti a 500-3.000 x g e continuare la procedura del test.

1.2 Stabilità degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti con il dispositivo CALEX® Cap sono stabili a temperatura ambiente (23 °C) per 7 giorni e a 2-8°C al massimo per 15 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare gli estratti a -20°C. Gli estratti congelati sono stabili per un periodo massimo di 23 mesi.

Gli estratti ottenuti con CALEX® Cap possono essere congelati e conservati direttamente dentro il dispositivo CALEX® Cap. Gli estratti possono subire al massimo 4 cicli di congelamento / scongelamento. Prima della misurazione, lasciare equilibrare gli estratti a temperatura ambiente, vortexare bene per 10 secondi e centrifugare per 5 minuti a 500-3.000 x g.

2. Altri dispositivi di estrazione

2.1 Procedure di estrazione

Seguire le Istruzioni per l'uso fornite insieme al relativo dispositivo di estrazione:

- dispositivo di estrazione delle feci Roche (Codice: 10745804322) o BÜHLMANN Smart-Prep (Codice: B-CAL-RD).

Importante: dopo l'estrazione con BÜHLMANN Smart Prep centrifugare le provette per 5 minuti a 3.000 x g. In alternativa, trasferire l'omogenato in una provetta Eppendorf da 2 mL e centrifugarla in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g. Far decantare il surnatante in

una nuova provetta etichettata e proseguire con la procedura di analisi.

2.2 Stabilità degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti con Smart-Prep sono stabili a 2-8°C per ≤ 7 giorni o a -20°C per 36 mesi.

3. Estrazione manuale

3.1 Procedura di estrazione

1. Etichettare e pesare la provetta di polipropilene vuota, ansa di inoculazione inclusa. Annotare il peso (tara).
2. Con l'ansa di inoculazione, prelevare da 50 a 100 mg di campione fecale e porli nella provetta già pesata, quindi pesarla di nuovo (peso lordo). Durante la raccolta del campione, evitare di prelevare le fibre alimentari presenti nel campione.
3. Calcolare il peso netto del campione (sottraendo la tara dal peso lordo), spezzare l'ansa di inoculazione e lasciare la sua parte inferiore all'interno della provetta.
4. Aggiungere alla provetta il tampone di estrazione secondo la formula
 $x \text{ mg di feci} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L di tampone di estrazione}$ (per es. 50 mg di feci + 2.450 μL di tampone), quindi chiudere la provetta.
5. Estrarre il campione:
 - agitare vigorosamente la provetta di estrazione contenente il tampone e il campione fecale su un vortex (per più provette) alla velocità massima per 30 secondi;
 - quindi incubare la provetta di estrazione per 25 +/- 5 minuti su un agitatore per piastre a ca. 400 rpm. La parte dell'ansa di inoculazione rimasta nella provetta facilita l'agitazione del campione;
 - vortexare vigorosamente la provetta di estrazione per altri 30 secondi.
6. Trasferire 1,5 mL dell'omogenato in una provetta Eppendorf da 2 mL e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g.
7. Far decantare il surnatante in una nuova provetta etichettata e proseguire con la procedura di analisi o conservare gli estratti (consultare le istruzioni per la conservazione degli estratti).

3.2 Stabilità degli estratti

Gli estratti di calprotectina fecale ottenuti tramite estrazione manuale possono essere conservati a 2-8 °C per ≤ 7 giorni o a -20 °C per 36 mesi.

GAMMA DI LAVORO

L'esecuzione del dosaggio può avvenire nelle seguenti condizioni: procedura ELISA nella gamma inferiore o nella gamma esteso. Il tipo di procedura appropriato va selezionato in base alla concentrazione di calprotectina attesa:

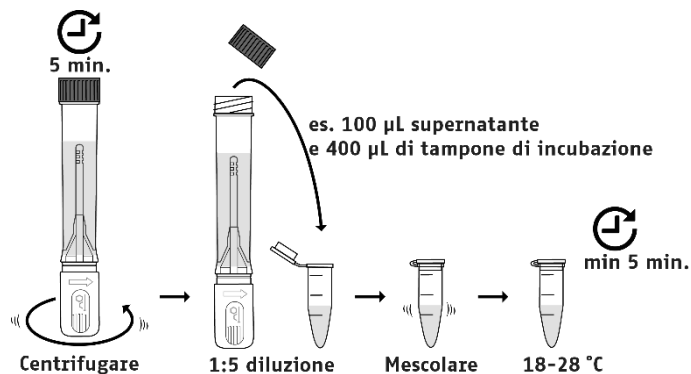
- in caso di campioni con un massimo di 600 $\mu\text{g/g}$ di calprotectina selezionare la procedura nella gamma inferiore (gamma di lavoro: 10-600 $\mu\text{g/g}$);
- se tendenzialmente i campioni superano i 600 $\mu\text{g/g}$, selezionare la procedura nella gamma esteso (gamma di lavoro: 30-1.800 $\mu\text{g/g}$).

PROCEDURA DEL TEST

Importante: lasciar equilibrare tutti i reagenti per almeno 30 minuti a 18-28 °C prima dell'uso. Diluire solo gli estratti di feci. I calibratori e i controlli sono pronti all'uso.

1. Diluizione dei campioni, opzione 1: Gamma di lavoro: 10-600 $\mu\text{g/g}$

- 1.1. Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti fecali 1:5 con tampone di incubazione (per es. 100 μL di estratto e 400 μL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

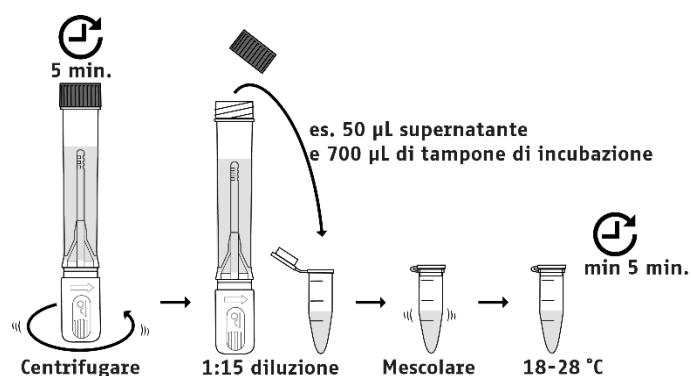


- 1.2. Estrazione manuale o con Smart Prep: Diluire gli estratti fecali 1:50 con tampone di incubazione (per es. 20 μL di estratto e 980 μL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

1. Diluizione dei campioni, opzione 2: Gamma di lavoro: 30-1.800 $\mu\text{g/g}$

Questa gamma di lavoro può essere esteso per un fattore 3 se i campioni vengono diluiti 1:7.500 invece che 1:2.500. Questa è la procedura raccomandata quando ci si aspettano concentrazioni elevate di calprotectina.

- 1.1' Dispositivo CALEX® Cap: Diluire gli estratti fecali 1:15 con tampone di incubazione (per es. 50 μL di estratto e 700 μL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.



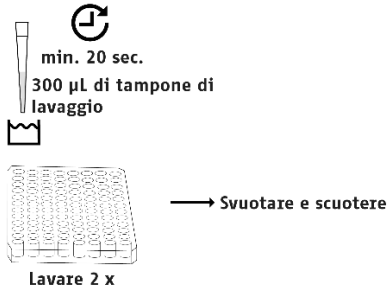
- 1.2' Estrazione manuale o con Smart Prep: Diluire gli estratti fecali 1:150 con tampone di incubazione (per es. 20 μL di estratto e 2.980 μL di tampone di incubazione) e miscelare bene. Lasciar equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla fase 4c.

2. Preparare un supporto per piastre con un numero sufficiente di strisce per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Staccare dal

supporto le strisce in eccesso e risigillarle nella busta di alluminio insieme con l'essiccante senza indugio. Conservare in frigorifero.

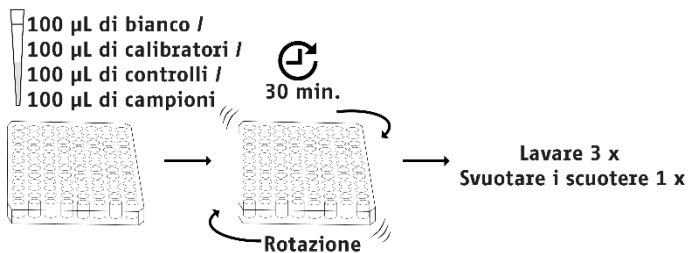
3. Lavare due volte i pozzetti rivestiti usando almeno 300 μL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

Importante: durante tutte le fasi di lavaggio, lasciare il tampone di lavaggio nei pozzetti per almeno 20 secondi.

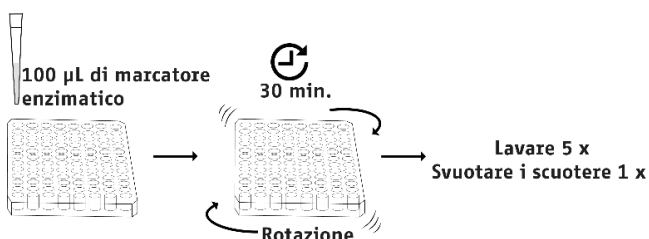


- 4a. Pipettare 100 μL di tampone di incubazione (bianco) e Pipettare 100 μL dei calibratori A-E nei rispettivi pozzetti.
- 4b. Pipettare 100 μL dei controlli basso e alto nei rispettivi pozzetti.
- 4c. Pipettare 100 μL di ogni campione diluito nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con il foglio sigillante e incubarla per 30 + max. 5 min su un agitatore per piastre impostato su ~ 450 rpm a 18-28 $^{\circ}\text{C}$ (vedere le Precauzioni tecniche – Procedura del test ELISA).

6. Togliere il foglio sigillante e gettarlo. Vuotare i pozzetti e lavarli tre volte usando almeno 300 μL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto (vedere le Precauzioni tecniche – Procedura del test ELISA). Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

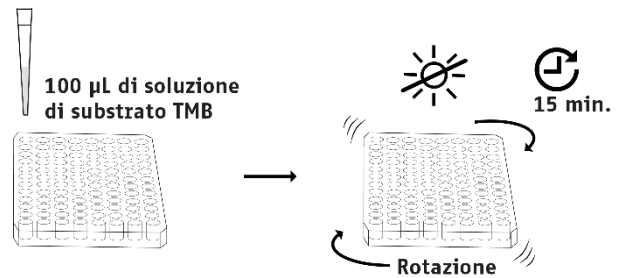


7. Pipettare 100 μL di marcatore enzimatico in tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con il foglio sigillante e incubarla per 30 ± 5 min su un agitatore per piastre impostato su ~ 450 rpm a 18-28 $^{\circ}\text{C}$.
9. Togliere il foglio sigillante e gettarlo. Vuotare i pozzetti e lavarli cinque volte usando almeno 300 μL di tampone di lavaggio per ogni pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.



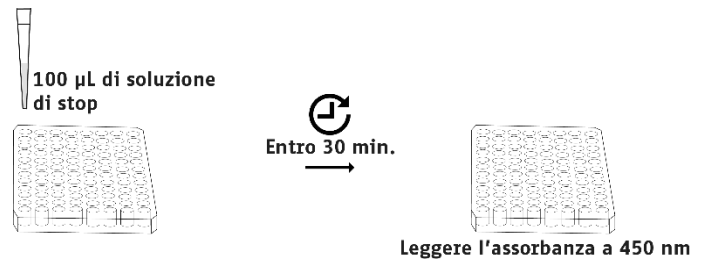
Importante: lasciar equilibrare la soluzione del substrato TMB a 18-28 $^{\circ}\text{C}$.

10. Pipettare 100 μL di soluzione del substrato TMB in tutti i pozzetti.
11. Coprire la piastra con il foglio sigillante, proteggerla dalla luce diretta e incubarla per 15 ± 2 min su un agitatore per piastre impostato su ~ 450 rpm a 18-28 $^{\circ}\text{C}$.



12. Pipettare 100 μL di soluzione di stop in tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con un puntale per pipette. Passare alla fase 13 entro 30 minuti.

13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di micropiastre.



CONTROLLO DI QUALITA'

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni per l'uso. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'applicazione di tecniche di laboratorio precise e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Nel kit BÜHLMANN fCAL® ELISA sono inclusi due controlli: basso e alto. I corrispondenti valori di riferimento dei controlli sono indicati sulla scheda dati-QC fornita insieme a ogni kit. I valori e i range indicati sulla scheda dati-QC si riferiscono sempre al lotto di quello specifico kit e vanno usati per il confronto diretto dei risultati. Nell'eventualità che i controlli basso e/o alto non rientrino nella gamma dichiarato nella scheda dati-QC, si raccomanda di considerare non valida tale analisi.

Si raccomanda di usare campioni di controllo interno, oltre ai controlli presenti nel kit, come da normative locali e nazionali. L'uso di campioni di controllo interno è consigliato per garantire la validità dei risultati su base quotidiana. Dal momento che in commercio non è disponibile alcun controllo per la calprotectina fecale, come controllo di qualità interno si consiglia l'uso di un pool di estratti di feci con livelli normali e patologici.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori di controllo deve rientrare entro i limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. Se le prestazioni del dosaggio non soddisfano i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) pipettatura, controllo della temperatura e dei tempi impostati sui dispositivi; ii) impostazioni del lettore

ELISA; iii) date di scadenza dei reagenti; iv) condizioni di conservazione e di incubazione; v) la soluzione del substrato TMB deve essere incolore; vi) purezza dell'acqua; vii) metodi di aspirazione e lavaggio.

STANDARDIZZAZIONE E TRACCIABILITÀ METROLOGICA

Per l'analisi calprotectina in campioni fecali non sono disponibili materiali di riferimento riconosciuti a livello nazionale o internazionale né procedure di riferimento per la sua misurazione. I valori dei calibratori BÜHLMANN fCAL® ELISA sono assegnati ripetendo più volte le analisi di misurazione e impiegando materiale di riferimento interno basato su siero umano, nonché la procedura di misurazione per BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentrazione di calprotectina nel materiale di riferimento interno è stata stabilita utilizzando MRP8/14 purificata da granulociti umani come materiale di riferimento primario.

L'intervallo di confidenza al 95% dell'incertezza composta dei calibratori del prodotto è risultato inferiore all'13,3%, l'incertezza composta dei controlli del prodotto inferiore al 16,4%.

CALCOLO DEI RISULTATI DEL TEST

Curva standard

Si raccomanda l'uso di un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli: sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di calibratore per calcolare il valore dei calibratori. Stabilire una curva standard utilizzando un adattamento logistico a 4 parametri (4 PL).

Controlli e campioni

Si raccomanda l'uso di un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli: sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di controllo/campione. Calcolare la concentrazione di calprotectina del controllo/campione in ogni pozzetto, in µg/g, usando la curva standard generata.

Gamma di lavoro: 10-600 µg/g

Se si seleziona una procedura ELISA nella gamma inferiore, le concentrazioni dei calibratori devono essere così impostate: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di calprotectina. Per ottenere i risultati finali, i dati ottenuti vanno moltiplicati per il fattore di diluizione addizionale (se si usa una diluizione finale diversa da 1:2.500).

Consultare la tabella 12 e la figura 1 per i dati tipici (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti solo a scopo dimostrativo. Per ogni serie di campioni da analizzare va generata una nuova curva standard.

Gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g

Se si sceglie una procedura ELISA nella gamma estesa, i valori nominali dei calibratori devono essere così impostati: 30, 90, 300, 900 e 1.800 µg/g di calprotectina. Per ottenere i risultati finali, i dati ottenuti vanno moltiplicati per il fattore di diluizione addizionale (se si usa una diluizione finale diversa da 1:7.500).

Consultare la tabella 15 e la figura 3 per i dati tipici (risultati e curva standard). Questi risultati e la curva standard sono forniti solo a scopo dimostrativo. Per ogni

serie di campioni da analizzare va generata una nuova curva standard.

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti con il kit BÜHLMANN fCAL® ELISA sono intesi per la determinazione dei livelli di calprotectina solamente in campioni di feci umane.
- I risultati del test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni cliniche ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Per il monitoraggio della IBD, la migliore accuratezza diagnostica nel prevedere la recidiva clinica nei pazienti è stata ottenuta tramite più misurazioni della calprotectina fecale eseguite a intervalli di durata massima di 4 settimane (rif. 19-20).
- I risultati non possono essere clinicamente applicabili a bambini di età inferiore ai 4 anni, i quali presentano livelli di calprotectina lievemente più alti (rif. 21-24).
- I pazienti in terapia con farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) possono presentare un aumento dei livelli fecali di calprotectina.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I. Differenziazione della malattia gastrointestinale organica da quella funzionale

Le categorie dei risultati sono basate su dati ottenuti in studi clinici eseguiti da BÜHLMANN e costituiscono le raccomandazioni di BÜHLMANN. Tutti i risultati dei test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni disponibili dai sintomi clinici del paziente, dalla anamnesi e da altri risultati clinici e di laboratorio.

Soglie cliniche

Per ottenere i valori descritti nella tabella 4, sono stati analizzati i risultati ottenuti in uno studio clinico internazionale condotto su 58 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBS e 131 campioni clinici di pazienti con diagnosi di IBD.

Concentrazione di calprotectina	Interpretazione	Follow-up
< 80 µg/g	Normale	Nessuno
80 – 160 µg/g	Zona grigia/Borderline	Follow-up entro 4-6 settimane
> 160 µg/g	Elevata	Ripetere ogni qualvolta necessario

Tabella 4

Valori di calprotectina inferiori a 80 µg/g

I valori di calprotectina fecale <80 µg/g non sono indicative di infiammazione nel tratto gastrointestinale. È probabile che i pazienti con livelli bassi di calprotectina non necessitano di procedure invasive per determinare la causa dell'infiammazione.

Valori di calprotectina compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g

I livelli intermedi di calprotectina fecale compresi tra o uguali a 80 e 160 µg/g, detti anche livelli nella zona grigia, non sono direttamente indicativi di un'infiammazione attiva che richieda un controllo immediato con l'esecuzione di test invasivi. Tuttavia non

si può escludere la presenza di infiammazione. Si raccomanda di rivalutare il livello della calprotectina dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio.

Valori di calprotectina maggiori di 160 µg/g

I valori di calprotectina fecale >160 µg/g sono indicativi di infiltrati di neutrofili nel tratto gastrointestinale; pertanto questo risultato può segnalare la presenza di una malattia infiammatoria in fase attiva. Per ottenere una diagnosi clinica completa si suggerisce di procedere con le appropriate procedure investigative da parte di specialisti.

Valutazione clinica

La capacità di BÜHLMANN fCAL® ELISA di differenziare tra IBD e altre malattie gastrointestinali (GI) non infiammatorie, inclusa la IBS, è stata valutata in uno studio clinico condotto in totale su 337 pazienti adulti e pediatrici. Di questi pazienti, 135 avevano una diagnosi finale di IBD (morbo di Crohn, colite ulcerosa o colite intermedia), 130 una diagnosi di IBS e 72 presentavano dolore addominale e/o diarrea, o altre condizioni non infiammatorie GI-correlate (vedere la tabella 5). La diagnosi finale è stata confermata sia endoscopicamente sia tramite altri risultati clinici.

Nella differenziazione tra IBD e condizioni non infiammatorie GI-correlate, inclusa la IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'83,7% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) è risultata una AUC (area sotto la curva) di 0,923 (vedere la tabella 6).

Nella differenziazione tra IBD e IBS, si può ottenere una sensibilità clinica del 93,3% a 80 µg/g e una specificità clinica dell'85,4% a 160 µg/g. Dall'analisi della curva ROC è risultata una AUC di 0,933 (vedere la tabella 8).

È stato possibile definire una combinazione di cut-off ottimale mediante un'analisi ROC per questi pool di pazienti pari a 80 µg/g e a 160 µg/g di calprotectina che è leggermente più stringente rispetto a una combinazione con **cut-off minimo a 50 µg/g**, più sensibile ma con prestazioni di specificità inferiori, e **cut-off massimo a 200 µg/g** con una sensibilità leggermente minore (tabelle 7 e 9).

II. Monitoraggio della IBD

Soglie cliniche e valutazione

La determinazione della calprotectina fecale è una procedura e semplice e affidabile a supporto del monitoraggio dei pazienti con IBD (rif. 7-18).

La correlazione tra livelli di calprotectina e stato infiammatorio della mucosa intestinale del paziente, valutato tramite endoscopia, è stata stabilita da tre studi indipendenti che si sono avvalsi di test Calprotectina BÜHLMANN per la (tabella 10). Il valore diagnostico della calprotectina nel prevedere la remissione e la recidiva clinica, in base ai sintomi del paziente, agli indici di attività clinica, alla necessità non pianificata di incrementare la terapia, al ricovero o all'emergenza, è stato determinato in tre studi utilizzando i test Calprotectina BÜHLMANN (tabella 11).

Le categorie dei risultati mostrate costituiscono soltanto delle raccomandazioni e la loro determinazione è basata sulla valutazione globale dei valori di cut-off e degli studi

sulle prestazioni cliniche pubblicati. Si consiglia ai medici di stabilire le soglie individuali di ogni paziente determinando il livello basale di calprotectina del paziente durante la remissione della malattia.

Valori di calprotectina inferiori a 100 µg/g

I livelli di calprotectina fecale inferiori a 100 µg/g possono indicare in modo affidabile i pazienti, a basso rischio di recidiva clinica, in remissione endoscopica nei quali si possono evitare le procedure endoscopiche invasive (rif. 7-18).

Valori di calprotectina nella gamma 100 - 300 µg/g

I Livelli di calprotectina fecale nella gamma 100-300 µg/g possono indicare la necessità di controlli più ravvicinati nel periodo successivo per valutare l'andamento della malattia.

Valori di calprotectina superiori a 300 µg/g

In caso di livelli di calprotectina fecale superiori a 300 µg/g l'esame va ripetuto e, se l'aumento dei livelli è confermato, è necessario eseguire altri accertamenti (rif. 7-18).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali del dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA sono state determinate usando il metodo di estrazione manuale, salvo diversamente specificato.

Gamma di lavoro: 10-600 µg/g

Ripetibilità: CV: 1,9 - 8,0%

Precisione intra-laboratorio: CV: 5,5 - 14,0%

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate in base alle linee guida EP05-A2 del CLSI usando il seguente disegno di studio: 22 giorni x 2 replicati. Sono stati testati 10 campioni fecali estratti con concentrazioni di calprotectina variabili da 13,2 a 501,4 µg/g (tabella 13).

Limite di rilevabilità (LoD): 4,2 µg/g

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A del CLSI e con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 240 determinazioni, con 80 replicati del bianco (tampone di estrazione) e 160 replicati con bassi livelli; e un **limite del bianco (LoB) di 0,29 µg/g**.

Limite di quantificazione (LoQ): 9,8 µg/g

Il LoQ è stato determinato utilizzando i dati ottenuti nello studio di precisione intra-laboratorio, includendo un campione fecale aggiuntivo con una concentrazione di 7,4 µg/g. Il LoQ è stato definito come concentrazione di calprotectina alla quale l'adattamento non lineare dei dati di precisione totale ha intersecato l'obiettivo di precisione del 20% CV.

Linearità: 10 - 600 µg/g

Il range di linearità di BÜHLMANN fCAL® ELISA è stato determinato secondo le linee guida EP06-A del CLSI. Una deviazione massima dalla linearità pari a $\pm 20\%$ è stata considerata accettabile. Per valori inferiori a 75 µg/g è stata accettata una differenza assoluta inferiore a ± 15 µg/g (tabella 14).

Accuratezza/Recupero:

Bias totale: -1,1%;

Limite inferiore di concordanza: -17,5%;

Limite superiore di concordanza: 15,4%

Quattro estratti di campioni di feci sono stati arricchiti (spiking) con quantità crescenti di calprotectina da campioni di siero. I risultati sono riportati nella figura 2.

Effetto “hook” delle concentrazioni elevate

È possibile misurare campioni con concentrazioni teoriche fino a 60.000 µg/g senza limitare la gamma di misurazione del dosaggio.

Gamma di lavoro: 30-1.800 µg/g

Ripetibilità: CV: 1,7 - 5,8%

Precisione intra-laboratorio: CV: 3,1 - 9,4%

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI usando il seguente disegno di studio: 10 giorni x 2 analisi x 4 replicati. Sono stati testati 7 estratti di campioni fecali riuniti insieme con concentrazioni di calprotectina variabili da 38,5 a 918,0 µg/g (tabella 16).

Precisione tra lotti: CV: 4,2 - 9,7%

La precisione tra lotti è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 lotti x 5 giorni x 5 replicati e un modello di analisi della varianza a effetti casuali. Sono stati testati 6 estratti di campioni fecali con concentrazioni di calprotectina variabili da 46,4 a 1.476,1 µg/g (tabella 17)

Riproducibilità (studio multicentrico per la valutazione della precisione) CV 6,4 – 19,0%

La riproducibilità è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 laboratori x 2 operatori x 5 giorni x 2 analisi al giorno x 4 replicati. Nello studio sono stati utilizzati tre lotti di reagenti. Sono stati testati 5 estratti di campioni fecali riuniti insieme con concentrazioni di calprotectina variabili da 42,1 a 1.053,3 µg/g (tabella 18).

Limite di rilevabilità (LoD): 12,6 µg/g

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI e con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 120 determinazioni, con 60 replicati del bianco (tampone di estrazione) e 60 replicati con bassi livelli; e un **limite del bianco (LoB) di 8,3 µg/g**.

Limite di quantificazione (LoQ): 21,3 µg/g

Il LoQ è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI, basandosi su 60 determinazioni e un obiettivo di precisione valutato come coefficiente di variazione (CV) del 20%.

Linearità: 30-1.800 µg/g

Il range di linearità di BÜHLMANN fCAL® ELISA è stato determinato secondo le linee guida EP06-A del CLSI. Una deviazione massima dalla linearità pari a $\pm 20\%$ è stata considerata accettabile. Per valori inferiori a 75 µg/g è stata accettata una differenza assoluta inferiore a ± 15 µg/g (tabella 19).

Accuratezza/Recupero: 96,4 – 102,2%

Sette estratti di campioni fecali con livelli di calprotectina variabili da 46,5 a 990,2 µg/g sono stati arricchiti (spiking) con 180 µg/g di calprotectina in materiale

calibratore. Lo spiking è stato eseguito al 10% del volume dell'estratto del campione. I campioni “basali” sono stati arricchiti con la corrispondente quantità di tampone di incubazione. I campioni “basali” e “basali + arricchiti” sono stati misurati in triplicato (tabella 20).

Preanalitica

Le caratteristiche prestazionali di BÜHLMANN fCAL® ELISA relativamente alle procedure analitiche sono state stabilite usando la gamma di lavoro di 30 – 1.800 µg/g.

Riproducibilità dell'estrazione - estrazione manuale: 9,5 - 20,5%

La riproducibilità dell'estrazione è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 10 estrazioni x 2 replicati. Sono stati testati 9 campioni fecali clinici, comprendenti campioni di consistenza solida, semisolida e liquida, con concentrazioni di calprotectina variabili da 51,2 a 1.783,7 µg/g (tabella 21).

Riproducibilità dell'estrazione – CALEX® Cap: 7,9 - 16,9%

La riproducibilità dell'estrazione è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 lotti di CALEX® Cap x 4 estrazioni x 4 replicati. Sono stati testati 5 campioni fecali clinici, comprendenti campioni di consistenza solida, semisolida e liquida, con concentrazioni di calprotectina variabili da 42,5 a 2.949,9 µg/g (tabella 22).

Confronto tra metodi: CALEX® Cap vs. estrazione manuale

Bias a 80 µg/g: 5,9% (IC 95%: 1,4 - 12,2%)

Bias a 160 µg/g: 12,0% (IC 95%: 7,8 - 17,0%)

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

Lo studio di confronto tra metodi è stato condotto secondo le linee guida EP09-A3 del CLSI. Sono stati estratti 241 campioni clinici utilizzando un lotto di dispositivi CALEX® Cap. I valori di riferimento, con un intervallo di concentrazione finale di calprotectina di 30,5-1.496,6 µg/g, sono stati determinati utilizzando un metodo di estrazione manuale. Gli estratti sono stati misurati tramite determinazioni singole in entrambi i metodi. Il bias è stato determinato usando l'analisi di regressione lineare di Passing-Bablok e l'analisi di Bland-Altman (tabelle 23 e 24).

SOSTANZE INTERFERENTI

La sensibilità del dosaggio BÜHLMANN fCAL® ELISA a farmaci orali, integratori nutrizionali, emoglobina e microrganismi enteropatologici è stata analizzata secondo le linee guida EP07-A2 del CLSI, utilizzando la gamma di lavoro esteso. Nei risultati, un bias eccedente il 10% è stato considerato interferenza. Non sono emerse interferenze con le sostanze elencate nella tabella 25, fino alle concentrazioni indicate. Non sono emerse interferenze con i microrganismi enteropatologici elencati nella tabella 26, fino alle quantità di unità formanti colonie (CFU) indicate per mL di estratto di campione di feci.

TABELLE E FIGURE

Studi clinici

Studio clinico – differenziazione della malattia gastrointestinale organica da quella funzionale

Diagnosi finale	Distribuzione dei risultati dei pazienti in numero (percentuale) all'interno dei range diagnostici di BÜHLMANN fCAL® ELISA.			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Altra patologia GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabella 5

IBD vs. non-IBD	Soglia decisionale clinica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilità (IC 95%)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specificità (IC 95%)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
PPV (IC 95%)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
NPV (IC 95%)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
AUC ROC (IC 95%)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabella 6

IBD vs. non-IBD	Soglia decisionale clinica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilità (IC 95%)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specificità (IC 95%)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
PPV (IC 95%)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
NPV (IC 95%)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabella 7

IBD vs. IBS	Soglia decisionale clinica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilità (IC 95%)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Specificità (IC 95%)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
PPV (IC 95%)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
NPV (IC 95%)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
AUC ROC (IC 95%)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabella 8

IBD vs. IBS	Soglia decisionale clinica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilità (IC 95%)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Specificità (IC 95%)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
PPV (IC 95%)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
NPV (IC 95%)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabella 9

non-IBD – IBS + altre patologie GI

IC: intervallo di confidenza

PPV: valore predittivo positivo

NPV: valore predittivo negativo AUC ROC: area sottostante la curva ROC (Receiver Operating Characteristic)

Studio clinico – Monitoraggio della IBD

Calprotectina ¹ vs attività della IBD determinata tramite endoscopia	Studio 1 Spagna (ref. 9)	Studio 2 Spagna (ref. 10)	Studio 3 Australia, New Zealand (ref.11)
Numero di pazienti e caratteristiche demografiche	89 (CD ²) Età: 32-58 44% uomini	123 (UC ³) Età: 18-85 66,4% uomini	99 (CD ² dopo resezione) Età: 29-47 46,5% uomini
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98%	86%	91%
PPV	76%	80,3%	53%

Tabella10

¹ Studio 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range
Studio 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² CD = pazienti con morbo di Crohn

³ UC = pazienti con colite ulcerosa

Studio clinico – Monitoraggio della IBD

Calprotectina ¹ vs futura remissione o recidiva clinica	Studio 4 Regno Unito (ref. 12)	Studio 5 Spagna (ref. 13)	Studio 6 Spagna (ref. 14)
Numero di pazienti e caratteristiche demografiche	92 (CD ²) 38% uomini	30 (CD ²) terapia con adalimumab Età: 24-64 43,3% uomini	33 (CD ²) 20 (UC ³) terapia con infliximab Età: 18-68 47,2% uomini
Durata del follow-up dopo misurazione della calprotectina	12 mesi	4 mesi	12 mesi
Pazienti in recidiva clinica dopo il follow-up	11%	30%	23%
Cut-off	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96,8%	100%	96,1%
PPV	27,6%	75%	68,7%

Tabella 11

¹ Studio 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Studio 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range

² CD = pazienti con morbo di Crohn

³ UC = pazienti con colite ulcerosa

TABELLE E FIGURE

PROCEDURA CON GAMMA INFERIORE 10-600 µg/g

Esempio di risultato

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

Tabella12

Esempio di curva standard

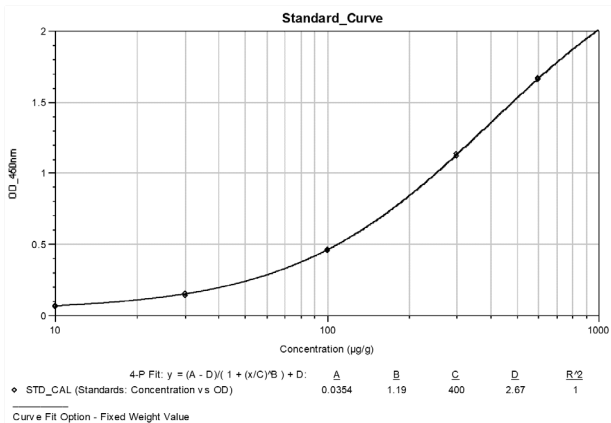


Figura 1

Precisione intra-laboratorio

Campione n.	n	Media [µg/g]	Riproducibilità		Tra giorni		Precisione totale	
			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%

Tabella13

Linearità

ID	Gamma di misurazione testato	R ²	Valore di p per il coefficiente non lineare	Gamma lineare
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

Tabella14

Recupero con spiking

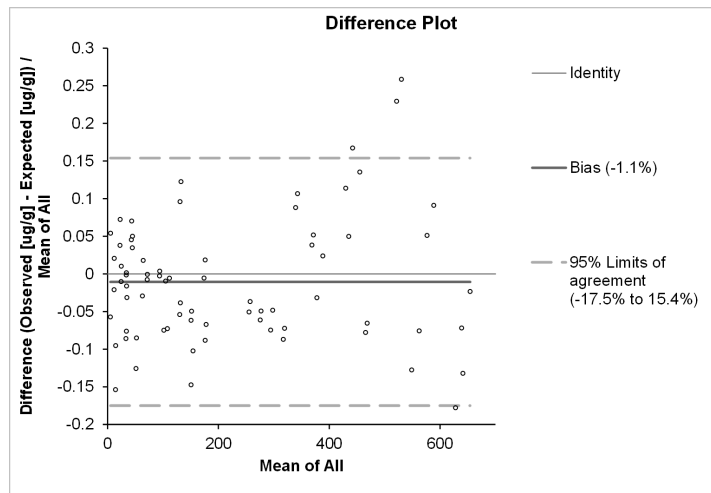


Figura 2

TABELLE E FIGURE

PROCEDURA CON GAMMA AMPLIATO 30-1800 µg/g

Esempio di risultati

	Concentrazione [µg/g]	Assorbimento [OD]
Calibratore A	30	0,047
	30	0,046
Calibratore B	90	0,138
	90	0,140
Calibratore C	300	0,464
	300	0,452
Calibratore D	900	1,207
	900	1,192
Calibratore E	1800	1,627
	1800	1,630
Bianco (media)		0,057
Controllo basso		0,147
		0,162
Controllo alto		0,618
		0,618

Tabella 15

Esempio di curva standard

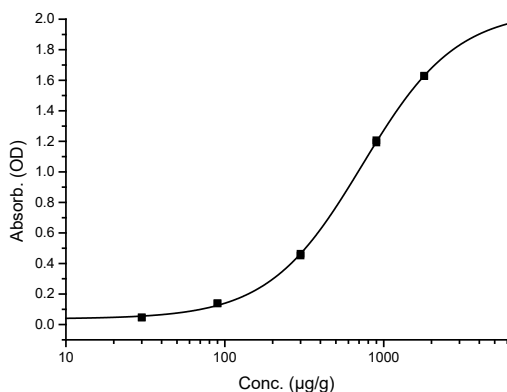


Figura 4

Precisione intra-laboratorio

ID	Media [µg/g]	n	Riproducibilità		Tra analisi		Tra giorni		Intra-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%

Tabella 16

Precisione tra lotti

ID	Media [µg/g]	n	Nella singola analisi		Tra giorni		Tra lotti		Totale	
			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%

Tabella 17

Riproducibilità - studio multicentrico per la valutazione della precisione

ID	Media [µg/g]	n	Tra operatori		Tra centri		Totale (riproducibilità)	
			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%

Tabella 18

Range di linearità

ID	Gamma di misurazione testato [µg/g]	R ²	Valore di p per il coefficiente non lineare	Range lineare [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

Tabella 19

Accuratezza / Recupero

ID	Basale (media) [µg/g]	Basale atteso + spiking [µg/g]	Basale osservato + spiking [µg/g]	Tasso di recupero [%]
#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%

Tabella 20

TABELLE E FIGURE

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI – PREANALITICA

Riproducibilità dell'estrazione – estrazione con pesatura manuale

ID	Media [µg/g]	n	Nella singola estrazione		Tra estrazioni		Precisione totale	
			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%

Tabella 21

Riproducibilità dell'estrazione – CALEX® Cap:

ID	Media [µg/g]	Nella singola estrazione		Tra estrazioni		Tra lotti		Precisione totale	
		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%

Tabella 22

Confronto tra metodi – estrazione con CALEX® Cap ed estrazione manuale

Analisi di Bland-Altman		
Bias medio (95%)	LoA inferiore (IC 95%)	LoA superiore (IC 95%)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabella 23

Analisi di regressione di Passing-Bablok				
Pendenza (IC 95%)	Intercetta (µg/g) (IC 95%)	Bias a 80 µg/g (IC 95%)	Bias a 160 µg/g (IC 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

Tabella 24

SOSTANZE INTERFERENTI

Medicinali orali, integratori alimentari ed emoglobina

Nome commerciale	Principio attivo	Concentrazione mg/50 fecale mg
gyno-Tardyferon	Solfato di ferro (II) (contiene 0,35 mg di acido folico)	0,11
Prednisone	Prednisone	0,31
Imurek	Azatioprina	0,19
Salofalk	Mesalazina; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazolo	0,18
Asacol	Mesalazina; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomicina	2,00
Sulfametoxazolo	Sulfametoxazolo	1,60
Trimetoprim	Trimetoprim lattato	0,35
Ciproxine	Ciprofloxacina	1,25
Vitamina E	DL-α-Tocoferolo acetato	0,30
Bion 3	3 probiotici (107 CFU): <i>Lactobacillus gasseri</i> PA16/8, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>Bifidobacterium longum</i> SP07/3, 12 vitamine: 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), acido folico (200 µg), niacina (18 mg), acido pantotenico (6 mg) e 7 minerali: iodio (100 µg), ferro (5 mg), zinco (5 mg), selenio (30 µg), cromo (25 µg), manganese (1,2 mg), molibdeno (25 µg)	1,06
Emoglobina	Emoglobina	1,25

Tabella 25

Microrganismi enteropatologici

Nome	Concentrazione finale (CFU/mL di estratto fecale)
<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

Tabella 26

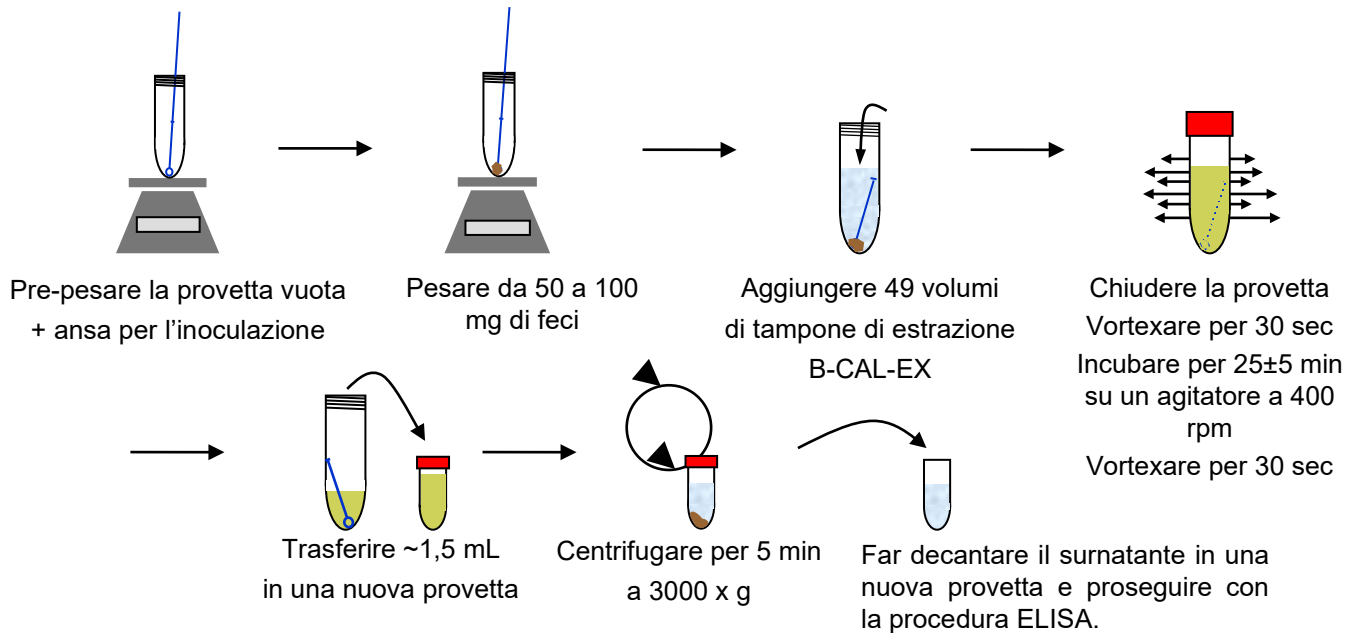
RIFERIMENTI

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. Ferreiro-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. Ferreiro-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. Lasso 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)

PROTOCOLLO IN BREVE

ESTRAZIONE DELLA CALPROTECTINA

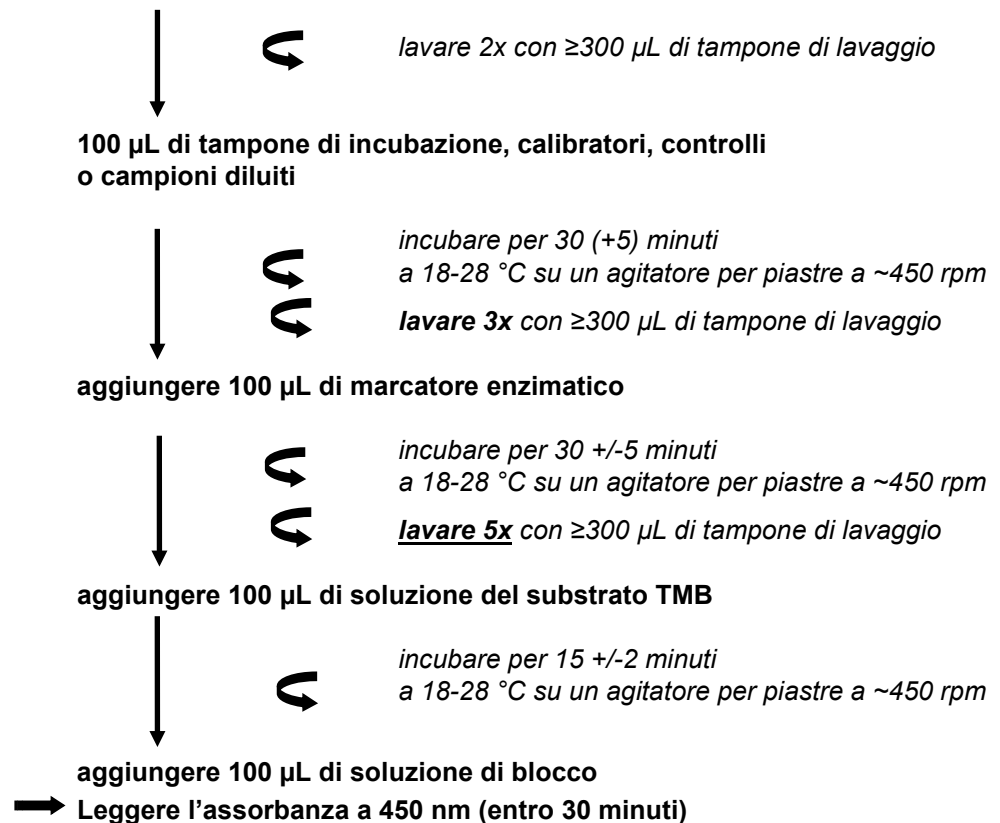
Procedura di estrazione manuale



PROTOCOLLO IN BREVE

CALPROTECTINA ELISA

Piastra per microtitolazione pre-rivestita



TEMPO AL RISULTATO: 75 minuti

REGISTRO DELLE MODIFICHE

Data	Versione	Modifica
2022-11-16	A3	Aggiornamento del capitolo <i>Avvertenze e precauzioni</i> Aggiunta dei valori di incertezza dei calibratori e motivazione della standardizzazione interna nel capitolo <i>Standardizzazione</i> Aggiornamento e semplificazione del testo nel capitolo <i>Caratteristiche prestazionali</i> Revisione del capitolo <i>Simboli</i> Aggiunta del numero di ente notificato al marchio CE – procedura di valutazione della conformità conformemente al Regolamento sui dispositivi diagnostici in vitro (IVDR) 2017/746

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE








Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

DANNI DOVUTI ALLA SPEDIZIONE

Informare il proprio distributore se il prodotto è stato ricevuto danneggiato.

SIMBOLI

BÜHLMANN utilizza i simboli e i segni elencati e descritti in ISO 15223-1. Inoltre, vengono utilizzati i seguenti simboli e segni:

Simbolo	Spiegazione
	Micropiastra
	Tampone di diluzione
	Tampone di lavaggio concentrato (10x)
	Tampone di incubazione
	Calibratore A - E
	Controllo basso
	Controllo alto
	Marcatore enzimatico
	Substrato di TMB
	Soluzione di stop

Alcune parti del kit sono protette da brevetto EP2947459(B1); US100216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

