

## RIDASCREEN® Calprotectin

**REF** G09036



## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Calprotectin es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de calprotectina humana en muestras de heces.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

La calprotectina es una proteína fijadora de calcio producida, por ejemplo, en los neutrófilos, que se libera durante los procesos inflamatorios.

La calprotectina fecal se utiliza como biomarcador de inflamaciones gastrointestinales y neoplasias en el tracto gastrointestinal.

La calprotectina (denominada también MRP-8/14, calgranulina A/B y S100A8/A9) es una proteína fijadora de calcio y zinc que pertenece a la familia de proteínas S100. La calprotectina fija el calcio en condiciones fisiológicas, lo que la convierte en una proteína estable y extremadamente resistente al calor y a la proteólisis.

La calprotectina es producida por los neutrófilos (granulocitos neutrófilos) y los monocitos. En los neutrófilos, la concentración de calprotectina en el citosol varía de 5 a 15 mg/l, que corresponde aproximadamente al 60 % de la fracción proteica soluble del citosol y al 5 % de la fracción proteica total de estas células.

La función biológica de la calprotectina no está dilucidada por completo. Se supone que ejerce una función protectora de las células contra proteasas leucocitarias y bacterianas. También se supone que la calprotectina tiene propiedades antibacterianas gracias a su capacidad de fijar el zinc. Asimismo, la calprotectina presenta funciones regulatorias, tanto intracelulares como extracelulares, en procesos inflamatorios.

La existencia de una enfermedad inflamatoria intestinal provoca que los granulocitos migren hacia la luz intestinal y liberen calprotectina, que posteriormente se excreta en las heces. La concentración de calprotectina en las heces se correlaciona con el número de granulocitos neutrofílicos que migraron a la luz intestinal y liberaron calprotectina. En consecuencia, la concentración de calprotectina fecal puede utilizarse como medida del número de granulocitos en la luz intestinal y como indicador de la gravedad de la inflamación intestinal.

La medición de la calprotectina fecal tiene relevancia clínica especial, ya que permite el diagnóstico confiable de inflamación en el tracto gastrointestinal. En muchos casos, la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EIIc) genera síntomas que son muy difíciles de distinguir de los del síndrome del intestino irritable (SII). La medida de calprotectina fecal proporciona un indicador fiable de la existencia de inflamación en el intestino. El uso de este biomarcador evitará colonoscopias innecesarias a muchos pacientes con síndrome de intestino irritable.

En numerosas publicaciones se ha demostrado la existencia de una correlación estrecha entre las concentraciones de calprotectina fecal y los parámetros histológicos y endoscópicos de actividad patológica en pacientes con EIIc. Por tanto, la medición de la calprotectina fecal es un modo de evaluar objetivamente

la respuesta al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica y de realizar un seguimiento de estos pacientes durante la remisión clínica para propiciar la detección y el tratamiento precoz de recidivas.

La calprotectina fecal se mide:

- Para la diferenciación fiable entre enfermedad inflamatoria intestinal crónica y síndrome de intestino irritable
- Para la detección precoz de brotes de enfermedad inflamatoria intestinal
- Para la documentación objetiva de la gravedad de la inflamación para controlar la respuesta durante el tratamiento
- Como marcador de inflamación intestinal aguda

### **3. Principio del ensayo**

En el ensayo RIDASCREEN® Calprotectin se emplean anticuerpos específicos con un método tipo sándwich. La superficie de los pocillos de la placa de microtitulación está recubierta de anticuerpos monoclonales contra la calprotectina humana. Se pipetea una suspensión de la muestra de heces objeto del ensayo en un pocillo de la placa de microtitulación y se incuba. A continuación, se realiza un paso de lavado y una segunda incubación con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano. En presencia de calprotectina, el anticuerpo inmovilizado, la calprotectina y el anticuerpo conjugado forman un complejo tipo sándwich. Los anticuerpos marcados con enzima no unidos se eliminan durante el siguiente paso de lavado. En muestras positivas, la adición de un substrato hace que la enzima unida cambie la coloración de la solución de incolora a azul en los pocillos de la placa de microtitulación. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La absorbancia medida es proporcional a la concentración de calprotectina presente en la muestra.

#### 4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96 ensayos	Placa de microtitulación; 12 tiras de microtitulación (desprendibles) en un portatiras; recubiertas con anticuerpos monoclonales (de ratón) anti-calprotectina humana
Extract	2 x 100 ml	Búfer de extracción (conc. 3x); Búfer Tris, contiene NaN <sub>3</sub> al 0,05 %
Diluent   3	100 ml	Búfer de dilución de muestras 3 (para dilución final), solución de NaCl tamponada con proteínas; contiene NaN <sub>3</sub> al 0,1 %; listo para usar; color rojo
Wash buffer	100 ml	Búfer de lavado 10x (concentración 10x); solución de NaCl tamponada con fosfato; contiene timerosal al 0,1 %
Calibrator	1 ml	Calibrador (procedimiento de calibración de 1 punto); contiene NaN <sub>3</sub> al 0,1 %; listo para usar
Standard 1 a Standard 5	1 ml	5 estándares (procedimiento de curva estándar); concentraciones de calprotectina de los estándares 1 a 5: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; contiene NaN <sub>3</sub> al 0,1 %; listo para usar
Control   +	1 ml	Control positivo; contiene NaN <sub>3</sub> al 0,1 %; listo para usar
Low control   +	1 ml	Control positivo bajo; contiene NaN <sub>3</sub> al 0,1 %; listo para usar
Conjugate	12 ml	Anticuerpo monoclonal (de ratón) conjugado con peroxidasa en solución proteica estabilizada; listo para usar
SeroSC	12 ml	Substrato; peróxido de hidrógeno/tetrametilbenzidina (TMB); listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N; listo para usar

Las sustancias peligrosas se indican de acuerdo a las obligaciones de etiquetado. Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## **5. Instrucciones de almacenamiento**

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C y se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta correspondiente. Si se almacena a 2 - 8 °C, el búfer de lavado diluido puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. El búfer de extracción diluido puede utilizarse hasta durante 6 meses si se conserva a 2 - 8 °C y, como máximo, hasta la fecha de caducidad del concentrado. Se debe evitar la contaminación microbiana. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida. Utilice tijeras para abrir la bolsa de aluminio que contiene las tiras de microtitulación, cuide que no se rompa el precinto de seguridad. Las tiras de microtitulación que no se vayan a utilizar deben retornarse inmediatamente a la bolsa de aluminio y almacenarse a 2 - 8 °C. El sustrato incoloro también debe protegerse de la luz directa para evitar que se descomponga o se vuelva azul debido a la autooxidación. No utilice el sustrato si ha virado a color azul.

## **6. Reactivos necesarios no suministrados**

### **6.1. Reactivos**

- Agua destilada o desionizada

### **6.2. Equipo**

- microbalanza o RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin (ref. GZ3016)
- mezclador de vórtice (opcional, consulte 9.4.)
- micropipeta para volúmenes de 20 - 100 µl y 1 ml
- probeta graduada (1000 ml)
- cronómetro
- dispositivo de lavado de placas de microtitulación o pipeta multicanal (300 µl)
- fotómetro para placas de microtitulación (450 nm, filtro de referencia de 620 nm)
- papel de filtro (toallitas de laboratorio)
- recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito al 0,5 %

## 7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.

Las muestras de heces deben manejarse como potencialmente infecciosas, según los requerimientos de seguridad nacionales.

No pipetee las muestras y los reactivos con la boca y evite el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Utilice guantes desechables para manipular las muestras y lávese las manos al terminar el ensayo. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se procesan las muestras o los reactivos del ensayo.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

El búfer de lavado contiene timerosal al 0,1 % como conservador. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel ni con las membranas mucosas.

El calibrador, los estándares, el control positivo, el control positivo bajo y el búfer de extracción y dilución de muestras contienen  $\text{NaN}_3$  al 0,05 % y 0,1 % como conservador. El búfer de extracción también contiene cloruro de guanidinio como agente de renaturalización y desnaturalización. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel ni con las membranas mucosas.

El peróxido de hidrógeno (substrato) puede causar quemaduras. Manipule con cuidado.

El reactivo de parada contiene ácido sulfúrico 1 N. Evite el contacto con la piel y la ropa. Si el reactivo entra en contacto con la piel, lave con agua.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o esterilizarse en autoclave a 121 °C durante una hora como mínimo. PRECAUCIÓN: Con el fin de evitar la formación de gases venenosos, todos los residuos líquidos que contengan reactivo de parada se deben neutralizar antes de agregarlos a la solución de hipoclorito.

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de heces deben transportarse congeladas de ser posible y almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes del ensayo. Si no se usan inmediatamente después de su recepción (en un plazo de 3 días), se recomienda conservarlas como mínimo a -20 °C o más frío. Cuando las muestras de heces se congelan, los granulocitos neutrofílicos pueden reventarse y liberar calprotectina. Esto puede aumentar ligeramente la concentración de calprotectina en muestras congeladas, en comparación con muestras frescas. Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra. No recolecte las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan materiales con conservadores, sueros animales, iones

metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Calprotectin.

## **9. Ejecución de la prueba**

### **9.1. Información general**

Todos los reactivos y la placa de microtitulación **Plate** deben alcanzar la temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes del uso. Una vez que hayan alcanzado la temperatura ambiente, extraiga las tiras de microtitulación de la bolsa de aluminio. Mezcle bien los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después del uso, las tiras de microtitulación (colocadas en bolsas selladas) y los reactivos deben almacenarse de nuevo a 2 - 8 °C. Una vez usadas, las tiras de microtitulación no pueden volver a usarse. No utilice reactivos ni tiras de microtitulación si el envase está dañado o los recipientes no están cerrados herméticamente. Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit. No realice el ensayo bajo la luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de microtitulación o sellarla con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

### **9.2. Preparación del búfer de lavado**

Mezcle 1 parte de búfer de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada (1:10 AM). Para este paso, añada 100 ml de concentrado a una probeta graduada de 1000 ml y llene hasta 1000 ml con agua destilada. Caliente previamente el concentrado (baño maría a 37 °C) para disolver los posibles cristales presentes.

### **9.3. Preparación del búfer de extracción**

Mezcle 1 parte de búfer de extracción **Extract** (100 ml) con 2 partes de agua destilada (200 ml) (1:3).

### **9.4. Preparación de muestras**

Las muestras de heces deben conservarse continuamente si es posible a 2 - 8°C antes de usarlas. Para un almacenamiento más prolongado (> 3 días), manténgalas a una temperatura de -20 °C o más baja. Las muestras congeladas se deben templar lentamente a temperatura ambiente.

#### **9.4.1. Preparación y suspensión de muestras mediante pesaje**

Pese 100 mg de muestra de heces en un tubo de ensayo etiquetado y, a continuación, añada 5 ml de búfer de extracción diluido con una pipeta (dilución 1:50).

Alternativamente, introduzca de 80 a 130 mg de heces en el tubo de ensayo y suspenda en un volumen proporcionalmente menor o mayor de búfer de extracción diluido (consulte la tabla 1) para mantener constante la relación de dilución (1:50).

**Tabla 1:** Datos sobre las cantidades necesarias de búfer de extracción diluido según la cantidad de heces pesadas

Peso de la muestra [mg]	Volumen [ml]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Durante la resuspensión en un volumen constante de 5 ml de búfer de extracción, se debe considerar el factor de dilución variable para hacer el cálculo (consulte la tabla 2).

**Tabla 2:** Datos del factor de dilución con la adición constante de búfer de extracción diluido (5 ml) según la cantidad de heces pesadas

Peso de la muestra [mg]	Volumen [ml]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

La suspensión de heces se homogeneiza a conciencia mezclándola con un mezclador de vórtice, independientemente del método utilizado para pesar la muestra de heces. Si las heces están en forma líquida, utilice una pipeta

para extraer exactamente 100 µl y suspéndalos en exactamente 5 ml de búfer de extracción diluido.

Las muestras deben incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente luego de añadir el búfer de extracción y enseguida se deben homogeneizar nuevamente a conciencia en el mezclador de vórtex. Enseguida, la suspensión homogeneizada se debe centrifugar durante 10 minutos a por lo menos 3000 x g para que se asienten las partículas de heces gruesas. Se recomienda diluir aún más el sobrenadante del extracto para usarlo en el ensayo.

#### **a. Dilución manual de muestras**

Diluya 20 µl del sobrenadante clarificado en 980 µl de búfer de dilución de muestras [Diluent | 3] de RIDASCREEN® (1:50). Enseguida, se usan 100 µl de la muestra de heces final diluida en el ensayo.

Alternativamente, se pueden preparar muestras y homogeneizarlas con RIDASCREEN®TUBE Calprotectin (ref. GZ3016, consulte 9.4.2.).

#### **b. Dilución de muestras en un sistema automático**

Si el ensayo se va a realizar en el sistema automático de ELISA DSX (Dynex Technologies, Inc.), se debe solicitar el protocolo de ensayo específico necesario a R-Biopharm AG y aplicarlo al sistema. La muestra se diluirá automáticamente según se describe a continuación.

El sistema ELISA automático pipetea 20 µl del sobrenadante clarificado en una placa de pocillos profundos y los diluye con 980 µl de [Diluent | 3] diluido (1:50). Siguen dos ciclos de mezclado.

El número requerido de tiras de microtitulación se coloca en el portatiras de la placa de microtitulación [Plate] de RIDASCREEN® Calprotectin. De la placa de pocillos profundos, se transfieren 100 µl del diluyente de la muestra a la placa de microtitulación [Plate] RIDASCREEN® Calprotectin (dilución final 1:2500).

Para obtener las instrucciones sobre cómo realizar el ensayo con otros sistemas de pipeteado automático para ELISA, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

### **9.4.2. Preparación y suspensión de muestras con RIDA®TUBE Calprotectin (ref. GZ3016)**

RIDA®TUBE Calprotectin (ref. GZ3016) es una alternativa rápida y limpia para pesar muestras de heces para preparación y suspensión, como se describe en el párrafo 9.4.1. Se ofrece como accesorio de RIDASCREEN® Calprotectin y simplifica considerablemente la preparación de muestras.

Se agregan 10 mg de muestra de heces a un RIDA®TUBE Calprotectin al que se agregaron previamente 2.5 ml de búfer de extracción listo para usar. Si la muestra de heces es líquida, se pueden tomar 10 µl de la muestra de heces con la pipeta y agregarlos directamente al búfer de extracción.

El procedimiento de recolección y extracción de las muestras se describe con detalle en las instrucciones incluidas con el RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin y también se puede descargar de [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Se recomienda usar los extractos de heces en el ensayo inmediatamente después de la dilución.

#### **a. Dilución manual de muestras**

Como se describió en el punto 8 de las instrucciones de uso de GZ3016, se diluyen 100 µl de la suspensión de heces obtenida con RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin (ref. GZ3016) en 900 µl de búfer de dilución de muestras [Diluent | 3] de RIDASCREEN<sup>®</sup>. Enseguida, se usan 100 µl de la muestra de heces final diluida en el ensayo.

#### **b. Dilución de muestras en un sistema automático**

Si el ensayo se va a realizar en el sistema automático de ELISA DSX (Dyner Technologies, Inc.), se debe solicitar el protocolo de ensayo específico necesario a R-Biopharm AG y aplicarlo al sistema.

El número requerido de tiras de microtitulación se coloca en el portatiras de la placa de microtitulación [Plate] de RIDASCREEN<sup>®</sup> Calprotectin. La suspensión de heces extraída con el tubo para heces se diluye automáticamente 1:10 en el sistema de ELISA en la placa de microtitulación [Plate] (dilución final 1:2500). Se pipetea 10 µl de la suspensión de heces del RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin (ref. GZ3016) directamente en la placa de microtitulación de calprotectina y se diluyen de nuevo con 90 µl de [Diluent | 3].

Para obtener las instrucciones sobre cómo realizar el ensayo con otros sistemas de pipeteado automático para ELISA, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

### **9.5. Primera incubación**

Tras colocar un número suficiente de pocillos en el soporte, añada 100 µl de calibrador [Calibrator] (procedimiento de calibración de 1 punto, recomendado por duplicado) o 100 µl de los estándares 1 a 5 [Standard 1] a [Standard 5] (procedimiento de curva estándar, recomendado por duplicado), y 100 µl de búfer de dilución de muestras [Diluent | 3] (= control negativo) de RIDASCREEN<sup>®</sup>, control positivo [Control | +] y la dilución de la muestra de heces final a los pocillos correspondientes. Si se utiliza un control positivo bajo [Low control | +], añada también 100 µl al ensayo. A continuación, incuba la placa durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

## 9.6. Primer lavado

Para obtener resultados correctos es fundamental realizar un lavado exhaustivo y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente las etapas de lavado especificadas en las instrucciones. Las sustancias incubadas en los pocillos se deben vaciar en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. A continuación, golpee la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad residual. Enseguida, lave la placa 5 veces con 300 µl de búfer de lavado diluido cada vez (consulte 9.2.). Después de cada paso de lavado, sacuda los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que estén completamente vacíos.

**Nota: Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas, asegúrese de que la máquina esté ajustada correctamente al tipo de placa de microtitulación utilizado. Además, una suspensión de heces que presente partículas antes del primer lavado deberá eliminarse manualmente mediante centrifugado para evitar que se bloqueen las boquillas de lavado.**

**Nota: Verifique asimismo que se haya aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado. Tras el último paso de lavado, golpee la placa minuciosamente sobre papel absorbente seco y limpio o toallitas de laboratorio para eliminar cualquier resto de humedad.**

## 9.7. Segunda incubación

Agregue 100 µl de conjugado **Conjugate** a cada pocillo. A continuación, incube la placa durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

## 9.8. Segundo lavado

Una vez transcurrido el periodo de incubación, vacíe el conjugado de los pocillos en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. Enseguida, golpee la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad residual. A continuación, lave la placa cinco veces con 300 µl de búfer de lavado diluido cada vez. Después de cada paso de lavado, sacuda los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que estén completamente vacíos.

## 9.9. Tercera incubación

Agregue 100 µl de sustrato **SeroSC** a cada pocillo. Luego incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. Después, pare la reacción agregando 50 µl de reactivo de parada **Stop** a cada pocillo.

Después de mezclar con cuidado (golpeando ligeramente en el lateral de la placa), mida la absorbancia a 450 nm y a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

**Nota: En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro. Estas muestras deben diluirse 1:10 y usarse nuevamente en el ensayo (consulte 9.5.) (dilución final de la muestra de heces: 1:25000).**

## **10. Control de calidad: indicación de deterioro de los reactivos**

Para efectos de control de calidad, el calibrador **Calibrator** (calibración de 1 punto, recomendada por duplicado) o los estándares 1 a 5 **Standard 1** a **Standard 5** (curva estándar, recomendada por duplicado), el búfer de dilución de muestras **Diluent | 3** de RIDASCREEN® como control negativo, y el control positivo **Control | +** se deben usar cada vez que se realice el ensayo para asegurar la estabilidad de los reactivos y la ejecución correcta del ensayo. El uso del control positivo bajo es opcional.

El ensayo se realizó correctamente si la extinción media (DO) del control negativo a 450 nm/620 nm es menor que 0,05 y la extinción media (DO) promediada del calibrador (si se utilizó la calibración de 1 punto) está dentro del rango que se indica en la hoja de datos específica del lote. Cuando se usan el calibrador y los cinco estándares, el control positivo proporciona información sobre la validez del ensayo. El rango de concentración deberá estar dentro del rango específico del lote indicado en la hoja de datos.

Cuando se procesa RIDASCREEN® Calprotectin en sistemas de ELISA abiertos totalmente automáticos, la DO medida del calibrador **Calibrator** (cuando se usa calibración de 1 punto) puede desviarse del rango indicado en el certificado específico del lote, dependiendo del sistema. Aún en los sistemas de ELISA totalmente automáticos, el control positivo **Control | +** es decisivo para la validez de los resultados del ensayo y, por lo tanto, debe probarse siempre. No es absolutamente indispensable usar el control positivo bajo **Low control | +**.

Las desviaciones de los valores requeridos, la turbidez del reactivo o la coloración azul del sustrato incoloro antes de añadirlo a los pocillos pueden indicar que los reactivos han caducado. Si no se alcanzan los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
  - Desempeño funcional de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
  - Ejecución correcta de la prueba
  - Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas.
- No deben usarse soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si las condiciones siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

## **11. Evaluación e interpretación**

La concentración de calprotectina en mg/kg heces se determina con el ensayo de ELISA RIDASCREEN® Calprotectin mediante el procedimiento de calibración de 1 punto (consulte 11.1.) conforme al modelo log-logístico de 4 parámetros (4PL) o mediante el procedimiento de curva estándar (consulte 11.2.).

Es necesario disponer del software de evaluación RIDA®SOFT Win.NET para calcular los resultados. El software RIDA®SOFT Win.NET o las actualizaciones se pueden obtener poniéndose en contacto con R-Biopharm AG o con el distribuidor local de R-Biopharm.

También se puede utilizar otro programa de evaluación que proporcione el modelo log-logístico de 4 parámetros en lugar de RIDA®SOFT Win.net.

### **11.1. Cuantificación de punto único según el modelo log-logístico de 4 parámetros**

Los parámetros (A - D) necesarios para el cálculo de 4PL de la curva estándar y del valor objetivo para el calibrador, el control positivo y el control positivo bajo se pueden encontrar en la hoja de datos específica del lote incluida con el kit del ensayo, y se deben comparar con los valores del software de evaluación antes de la medición.

En el control de calidad final, R-Biopharm AG calcula la curva estándar (incluidos los parámetros A - D) en las condiciones óptimas del ensayo para cada lote del kit, así como un valor objetivo y el rango de concentración admitido para la DO del calibrador, el control positivo y el control positivo bajo. El calibrador también se prueba para compensar las fluctuaciones del ensayo y comprobar la calidad de la ejecución de la prueba. El control positivo proporciona información sobre la validez del ensayo.

RIDA®SOFT Win.net calcula internamente un factor de corrección F a partir de la media del análisis por duplicado del calibrador y su valor objetivo. Este factor de corrección se concilia enseguida con las absorbancias de las muestras de heces. Los resultados del ensayo se pueden evaluar de manera confiable dentro de los límites de la curva estándar.

### **11.2. Cuantificación mediante la curva estándar**

RIDASCREEN® Calprotectin se evalúa mediante una curva estándar que debe incluirse en cada análisis. Se puede tomar un ejemplo de una curva estándar de la hoja de datos específica del lote incluida.

En el control de calidad final, R-Biopharm AG determina un valor de referencia en condiciones de ensayo óptimas para cada lote del kit y un rango de concentración permitido para el control positivo y el control positivo bajo. Para la cuantificación mediante la curva estándar, el control positivo proporciona información sobre la validez del ensayo. El control positivo debe alcanzar el rango de concentración especificado.

### **11.3. Resultados del ensayo**

A partir de un valor de corte > 50 mg/kg de calprotectina humana en las heces, el resultado se debe considerar positivo. Si los resultados están por debajo del valor de corte, las muestras se deben considerar negativas.

El valor de corte de 50 mg/kg sugerido para adultos también se puede aplicar a menores de 4 a 17 años.

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores estándar.

**Nota: Se recomienda volver a diluir (proporción 1:5 en Diluent 3) y analizar en el ensayo las muestras con concentraciones de calprotectina de más de 600 mg/kg cuando se aplica la calibración de un punto o la curva estándar.**

**Nota: Se recomienda volver a diluir (proporción 1:5 en Diluent 3) y analizar en el ensayo las muestras que presenten valores de DO mayores que 3,0 cuando se cuantifican con la calibración de un punto.**

### **12. Limitaciones del método**

RIDASCREEN® Calprotectin detecta epítomos de calprotectina humana en muestras de heces. El diagnóstico no debe basarse únicamente en las concentraciones determinadas de calprotectina, sino que siempre debe tenerse en cuenta la historia clínica del paciente.

### **13. Características de rendimiento**

#### **13.1. Precisión**

##### **13.1.1. Precisión intraensayo**

La precisión intraensayo se determinó en un solo análisis usando 4 referencias en 40 réplicas cada una. Se utilizaron los valores de DO de estas mediciones para determinar las concentraciones de calprotectina mediante el calibrador o la curva estándar, a partir de las cuales se calculó el valor medio (VM), la desviación estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de las mediciones de cada muestra.

**Tabla 3:** Precisión intraensayo de RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibrador			Curva estándar		
	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)
<b>Referencia A</b>	53,8	2,9	<b>5,4</b>	56,6	3,0	<b>5,3</b>
<b>Referencia B</b>	96,6	5,5	<b>5,7</b>	102,4	6,3	<b>6,2</b>
<b>Referencia C</b>	136,5	5,6	<b>4,1</b>	130,5	5,2	<b>4,0</b>
<b>Referencia D</b>	246,7	14,1	<b>5,7</b>	267,6	15,0	<b>5,6</b>

### 13.1.2. Precisión interensayo

La precisión interensayo se determinó con 3 técnicos que realizaron por duplicado 20 análisis (2 por día) con 4 referencias en días diferentes. Se utilizaron los valores de DO de estas mediciones para determinar las concentraciones de calprotectina mediante el calibrador o la curva estándar, a partir de las cuales se calculó el valor medio (VM), la desviación estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de las mediciones de cada muestra.

**Tabla 4:** Precisión interensayo de RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibrador			Curva estándar		
	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)
<b>Referencia A</b>	55,7	4,3	<b>7,7</b>	57,5	4,1	<b>7,1</b>
<b>Referencia B</b>	106,5	7,2	<b>6,8</b>	112,8	8,3	<b>7,3</b>
<b>Referencia C</b>	129,6	7,8	<b>6,0</b>	138,5	7,6	<b>5,5</b>
<b>Referencia D</b>	260,9	28,3	<b>10,9</b>	284,7	22,7	<b>8,0</b>

### 13.2. Precisión de extracción

La precisión de extracción se determinó con 2 técnicos que realizaron por duplicado 10 análisis (en 5 días, 2 análisis por día) en días diferentes con 3 muestras de heces con valores superiores al límite de corte. Antes de cada análisis, las muestras se extrajeron y se diluyeron según fuera necesario. Se utilizaron los valores de DO de estas mediciones para determinar las concentraciones de calprotectina mediante el calibrador o la curva estándar, a partir de las cuales se calculó el valor medio (VM), la desviación estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de las mediciones de cada muestra.

**Tabla 5:** Precisión de extracción interensayo

	Calibrador			Curva estándar		
	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	DE (mg/kg)	CV (%)
Referencia A	64,0	5,0	<b>7,9</b>	67,4	5,0	<b>7,5</b>
Referencia B	114,1	10,3	<b>9,0</b>	123,2	10,7	<b>8,7</b>
Referencia C	264,0	33,3	<b>12,6</b>	284,8	22,1	<b>7,8</b>

#### 14. Historial de versiones

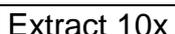
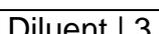
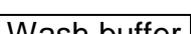
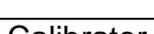
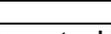
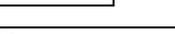
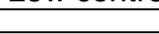
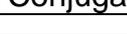
Número de versión	Capítulo y designación
2019-07-01	Revisión general 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos de prueba

	Placa de microtitulación
	Búfer de extracción y dilución
	Búfer de dilución de muestras
	Búfer de lavado 10x
	Calibrador
	Control alto
	Control bajo
	Conjugado
	Substrato
	Reactivo de parada

## 16. Bibliografia

1. Arndt et al., 1993, *Crohn; Clin. Lab.* 11: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. *Post-graduiertenkurs der DGVS*
3. Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces; Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H.; *Lancet.* 1992 Oct 24; 340(8826):1037.
4. Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal alpha 1-antitrypsin clearance; Karbach U, Ewe K.; *Z Gastroenterol.* 1989 Jul; 27(7):362-5.
5. Detection of increased permeability of the intestinal mucosa in chronic inflammatory bowel diseases; Karbach U.; *Z Gastroenterol Verh.* 1989 Jul; 24:40-4.
6. Alpha 1-antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders; Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS.; *Gastroenterology.* 1990 Nov; 99(5):1380-7.
7. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells; Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J.; *Clin Exp Immunol.* 2002 May; 128(2):279-84.