

RIDASCREEN® Calprotectin

REF G09036



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDASCREEN® Calprotectin è un dosaggio immunoenzimatico per la rilevazione quantitativa della calprotectina umana in campioni fecali.

2. Sintesi e spiegazione del test

La calprotectina, una proteina legante il calcio prodotta in cellule come ad esempio i neutrofili, viene rilasciata durante i processi infiammatori.

La calprotectina fecale agisce come biomarcatore dell'infiammazione gastrointestinale e delle neoplasie del tratto gastrointestinale.

La calprotectina (nota anche come MRP-8/14, calgranulina A/B e S100A8/A9) è una proteina legante il calcio e lo zinco e appartiene alla famiglia delle proteine S100.

La calprotectina lega il calcio in condizioni fisiologiche, rendendola stabile ed estremamente resistente al calore e alla proteolisi.

La calprotectina è prodotta dai neutrofili (granulociti neutrofili) e anche dai monociti. Nei neutrofili, la concentrazione di calprotectina nel citosol varia da 5 a 15 mg/l, ovvero circa il 60 % della frazione proteica citosolica solubile e il 5 % della frazione proteica totale di queste cellule.

La funzione biologica della calprotectina non è del tutto chiara. Si presume che la calprotectina svolga una funzione biologica nel proteggere le cellule dalle proteasi leucocitarie e batteriche. Si presume inoltre che la calprotectina abbia anche proprietà antibatteriche grazie alla sua capacità di legare lo zinco. Inoltre, la calprotectina presenta funzioni regolatorie sia intracellulari che extracellulari nei processi infiammatori.

In presenza di una malattia intestinale infiammatoria, i granulociti migrano nel lume intestinale e rilasciano calprotectina, che viene escreta nelle feci. La concentrazione di calprotectina nelle feci è correlata al numero di granulociti neutrofili che sono migrati nel lume intestinale e hanno rilasciato calprotectina. Di conseguenza, la concentrazione di calprotectina fecale può essere utilizzata per misurare il numero di granulociti nel lume intestinale e come indicatore della gravità dell'infiammazione intestinale.

La misurazione della calprotectina fecale è di particolare rilevanza clinica, perché permette una diagnosi affidabile dei processi infiammatori a carico del tratto intestinale. In molti casi, la malattia intestinale infiammatoria cronica (CIBD) produce sintomi che sono molto difficili da distinguere da quelli della sindrome dell'intestino irritabile (IBS). La misurazione della calprotectina fecale fornisce un'indicazione affidabile della presenza di infiammazione intestinale. Attraverso l'uso di questo biomarcatore, molti pazienti con sindrome dell'intestino irritabile possono quindi evitare la colonscopia.

In diverse pubblicazioni è stato dimostrato che le concentrazioni di calprotectina fecale sono fortemente correlate ai parametri istologici ed endoscopici relativi all'attività della malattia nei pazienti affetti da CIBD. Pertanto, la misurazione della

calprotectina fecale fornisce un mezzo per valutare obiettivamente la risposta al trattamento della malattia intestinale infiammatoria cronica e per monitorare questi pazienti durante la remissione clinica, consentendo così la diagnosi precoce e il trattamento delle ricadute.

La calprotectina fecale viene misurata per:

- Differenziare in modo affidabile la malattia intestinale infiammatoria cronica e la sindrome dell'intestino irritabile.
- Rilevare precocemente le riacutizzazioni della malattia intestinale infiammatoria
- Documentare obiettivamente la gravità dell'infiammazione per il monitoraggio della risposta durante il ciclo di trattamento.
- Fornire un marcatore dell'infiammazione intestinale acuta

3. Principio del test

RIDASCREEN® Calprotectin utilizza anticorpi specifici in un metodo a sandwich. La superficie dei pozzetti della piastra da microtitolazione viene rivestita con anticorpi monoclonali diretti contro la calprotectina umana. Una sospensione del campione fecale da analizzare viene pipettata nel pozzetto della piastra da microtitolazione, quindi incubata. Questa procedura è seguita da una fase di lavaggio e da una seconda fase di incubazione con un anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi di rafano. In presenza di calprotectina, l'anticorpo immobilizzato, la calprotectina, e l'anticorpo coniugato formano un complesso a sandwich. Gli anticorpi non legati marcati con l'enzima vengono rimossi in un'ulteriore fase di lavaggio. Nei campioni positivi, dopo l'aggiunta di un substrato, l'enzima legato converte la soluzione incolore nei pozzetti della piastra da microtitolazione in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'assorbanza misurata è proporzionale alla concentrazione di calprotectina presente nel campione.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.

Plate	96 test	Piastra da microtitolazione; 12 strisce da microtitolazione (frazionabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con anticorpi monoclonali (da topo) diretti contro la calprotectina umana
Extract	2 x 100 ml	Tampone di estrazione (conc. 3x); tampone Tris; contiene lo 0,05 % di NaN ₃
Diluent 3	100 ml	Tampone di diluizione del campione 3 (per la diluizione finale), soluzione di NaCl tamponata con proteine; contiene lo 0,1 % di NaN ₃ ; pronto per l'uso, colorato di rosso
Wash buffer	100 ml	Tampone di lavaggio 10x (concentrazione 10 volte), soluzione di NaCl tamponata con fosfato; contiene lo 0,1 % di timerosal
Calibrator	1 ml	Calibratore (procedura di calibrazione a 1 punto); contiene 0,1 % di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Da Standard 1 a Standard 5	1 ml	5 standard (procedura per curva standard); concentrazioni di calprotectina degli standard da 1 a 5: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; contiene lo 0,1 % di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Control +	1 ml	Controllo positivo; contiene lo 0,1 % di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Low Control +	1 ml	Controllo positivo basso; contiene lo 0,1 % di NaN ₃ ; pronto per l'uso
Conjugate	12 ml	Anticorpo monoclonale (topo) coniugato con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso
SeroSC	12 ml	Substrato; perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 ml	Reagente bloccante; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

Le sostanze pericolose sono indicate in base ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli, consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

5. Istruzioni di conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è utilizzabile per quattro settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Il tampone di estrazione diluito può essere utilizzato per 6 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, e al massimo fino alla data di scadenza del concentrato. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida. Utilizzare le forbici per aprire la busta in alluminio contenente le strisce da microtitolazione, ma fare attenzione a non strappare la chiusura a clip. Le strisce da microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a 2 - 8 °C. Il substrato incolore deve essere protetto dalla luce diretta per evitare che si decomponga o diventi blu per effetto dell'auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata

6.2. Attrezzatura

- Microbilancia o RIDA[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016)
- Vorticatore (facoltativo, vedere punto 9.4.)
- Micropipetta da 20-100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre da microtitolazione o pipetta multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastra da microtitolazione (450 nm; filtro di riferimento 620 nm)
- Carta da filtro (salviette da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

I campioni fecali devono essere gestiti come potenzialmente infetti, in conformità con i requisiti di sicurezza nazionali.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavarsi le mani dopo aver terminato il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni o con i reagenti del test.

Per ulteriori dettagli consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

Il tampone di lavaggio contiene lo 0,1 % di timerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose.

Il calibratore, gli standard, il controllo positivo, il controllo positivo basso, il tampone di estrazione e il tampone di diluizione del campione contengono lo 0,05% o lo 0,1% di NaN₃ come conservante. Il tampone di estrazione contiene anche cloruro di guanidinio come agente di rinaturazione e denaturazione. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose.

Il perossido di idrogeno (substrato) può causare ustioni chimiche. Maneggiare con cautela.

Il reagente bloccante contiene acido solforico 1 N. Evitare il contatto con la cute e con gli indumenti. Se il reagente entra in contatto con la cute, sciacquare con acqua. Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con adeguati disinfettanti o messi in autoclave per almeno un'ora a 121 °C. ATTENZIONE: Per evitare la formazione di gas velenosi, i residui liquidi contenenti reagente bloccante devono essere neutralizzati prima di essere aggiunti a una soluzione di ipoclorito.

8. Raccolta e conservazione di campioni

I campioni fecali devono essere trasportati possibilmente refrigerati e conservati a 2-8 °C prima dell'analisi. Se i campioni non vengono utilizzati immediatamente dopo il ricevimento (entro 3 giorni), si consiglia di conservarli a -20 °C o meno. Quando i campioni fecali sono congelati, i granulociti neutrofili possono frammentarsi e rilasciare calprotectina. Questo può aumentare leggermente la concentrazione di calprotectina nei campioni congelati rispetto ai campioni freschi. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione. I campioni fecali non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengano terreni di trasporto con conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti, perché potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Esecuzione del test

9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce da microtitolazione devono essere rimosse dalla busta di alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare bene i reagenti immediatamente prima dell'uso. Dopo l'uso, le strisce da microtitolazione (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura di 2 - 8 °C. Una volta usate, le strisce da microtitolazione non devono essere riutilizzate. Non utilizzare reagenti o strisce da microtitolazione se la confezione è danneggiata o i contenitori non sono sigillati ermeticamente. Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione crociata. Il test non deve essere eseguito in presenza di luce solare diretta. Si raccomanda di coprire o sigillare con una pellicola in plastica la piastra da microtitolazione per evitare la perdita per evaporazione.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata (1:10 AM). In questa fase, versare 100 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1.000 ml e aggiungere acqua distillata fino a raggiungere il livello di 1.000 ml. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere prima sciolti attraverso il riscaldamento (bagnomaria a 37 °C).

9.3. Preparazione del tampone di estrazione

Miscelare 1 parte di tampone di estrazione **Extract** (100 ml) con 2 parti di acqua distillata (200 ml) (1:3).

9.4. Preparazione dei campioni

I campioni fecali devono essere conservati in modo continuo, se possibile, a 2 - 8 °C prima dell'uso. Per uno stoccaggio più lungo (>3 giorni), conservarli a -20 °C o meno. I campioni congelati devono essere lentamente adattati alla temperatura ambiente.

9.4.1 Preparazione del campione e sospensione mediante pesata

Pesare 100 mg di campione fecale in una provetta etichettata, quindi aggiungere 5 ml di tampone di estrazione diluito usando una pipetta (diluizione 1:50). In alternativa, collocare tra 80 e 130 mg di feci nella provetta e sospenderli in un volume proporzionalmente più o meno ampio di tampone di estrazione diluito (vedere Tabella 1) per mantenere un rapporto di diluizione costante (1:50).

Tabella 1: Dati sulle quantità necessarie di tampone di estrazione diluito in funzione della quantità di feci pesate

Peso del campione [mg].	Volume [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 risospensione in un volume di tampone di estrazione costante di 5 ml, nel calcolo deve essere preso in considerazione il fattore di diluizione variabile (vedere Tabella 2).

Tabella 2: Dati sul fattore di diluizione con aggiunta costante di tampone di estrazione diluito (5 ml), a seconda della quantità di feci pesata.

Peso del campione [mg].	Volume [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 sospensione fecale viene omogeneizzata miscelandola accuratamente con un miscelatore a vortice, indipendentemente dal metodo utilizzato per pesare il campione fecale. Se le feci sono in forma liquida, utilizzare una pipetta per prelevare esattamente 100 µl e sospenderli esattamente in 5 ml di tampone di estrazione diluito.

I campioni devono essere incubati per 5 minuti a temperatura ambiente dopo l'aggiunta del tampone di estrazione e poi accuratamente vorticati di nuovo.

Quindi la sospensione omogeneizzata deve essere centrifugata per 10 minuti per almeno 3.000xg per depositare le particelle di feci grossolane. Si consiglia di diluire ulteriormente il surnatante dell'estratto immediatamente per l'uso nel test.

a. Diluizione manuale del campione

20 µl del surnatante chiarificato sono ulteriormente diluiti in 980 µl di tampone di diluizione del campione [®]RIDASCREEN Diluent | 3 (1:50). Nel test vengono quindi utilizzati 100 µl del campione fecale finale diluito.

In alternativa, i campioni possono essere preparati e omogeneizzati utilizzando RIDASCREEN[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016, vedere 9.4.2.).

b. Diluizione del campione in un sistema automatizzato

Se il test deve essere eseguito sul sistema ELISA automatizzato DSX (Dynex Technologies, Inc.), il protocollo di test specifico richiesto a tal fine deve essere richiesto a R-Biopharm AG e applicato al sistema. Il campione viene quindi diluito automaticamente come descritto di seguito.

20 µl del surnatante chiarificato sono pipettati dal sistema automatico ELISA in una piastra a pozzetti profondi e diluiti con 980 µl di Diluent | 3 diluito (1:50). Seguono due cicli di miscelazione.

Il numero necessario di strisce da microtitolazione viene inserito nel telaio di fissaggio per la piastra da microtitolazione RIDASCREEN[®] Calprotectin Plate. Dalla piastra a pozzetti profondi, 100 µl di diluente del campione vengono trasferiti alla piastra da microtitolazione di RIDASCREEN[®] Calprotectin Plate (diluizione finale 1:2.500).

Per istruzioni sulle modalità di esecuzione del test con altri sistemi di pipettaggio automatizzati per ELISA contattare R-Biopharm AG.

9.4.2 Preparazione e sospensione del campione con RIDA[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016)

RIDA[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016) è un'alternativa rapida e pulita alla pesatura dei campioni fecali per la preparazione e la sospensione come descritto al punto 9.4.1. Questo è offerto come accessorio per RIDASCREEN[®] Calprotectin e semplifica notevolmente la preparazione del campione.

10 mg di campione fecale sono aggiunti a RIDA[®]TUBE Calprotectin precedentemente riempito con 2,5 ml di tampone di estrazione pronto per l'uso. Se il campione fecale è liquido, è possibile prelevarne 10 µl con la pipetta e pipettarli direttamente nel tampone di estrazione.

La procedura di prelievo e di estrazione del campione è descritta in dettaglio nelle istruzioni allegate a RIDA[®]TUBE Calprotectin, e può anche essere scaricata da www.r-biopharm.com.

Si consiglia di utilizzare gli estratti fecali nel test subito dopo la diluizione.

a. Diluizione manuale del campione

Come descritto al punto 8 delle istruzioni per l'uso di GZ3016, 100 µl della sospensione fecale ottenuta con RIDA[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016) sono ulteriormente diluiti con 900 µl di tampone di diluizione del campione RIDASCREEN[®] **Diluent | 3**. Nel test vengono utilizzati immediatamente 100 µl del campione fecale finale diluito.

b. Diluizione del campione in un sistema automatizzato

Se il test deve essere eseguito sul sistema ELISA automatizzato DSX (Dynex Technologies, Inc.), il protocollo di test specifico richiesto a tal fine deve essere richiesto a R-Biopharm AG e applicato al sistema.

Il numero necessario di strisce da microtitolazione viene inserito nel telaio di fissaggio per la piastra da microtitolazione RIDASCREEN[®] Calprotectin **Plate**. La sospensione fecale estratta con la provetta del campione fecale viene automaticamente diluita 1:10 nel sistema ELISA sulla piastra da microtitolazione **Plate** (diluizione finale 1:2.500). 10 µl della sospensione fecale estratta da RIDA[®]TUBE Calprotectin (art. n. GZ3016) vengono pipettati direttamente nella piastra da microtitolazione e ulteriormente diluiti con 90 µl di **Diluent | 3**. Per istruzioni sulle modalità di esecuzione del test con altri sistemi di pipettaggio automatizzati per ELISA contattare R-Biopharm AG.

9.5. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel supporto, aggiungere 100 µl di calibratore **Calibrator** (procedura di calibrazione a 1 punto, raccomandata in duplicato), o 100 µl da Standard 1 a Standard 5 **Standard 1** – **Standard 5** (procedura per la curva standard, raccomandata in duplicato), e 100 µl di tampone di diluizione del campione RIDASCREEN[®] **Diluent | 3** (= controllo negativo), del controllo positivo **Control | +**, e della diluizione del campione fecale finale da analizzare nei rispettivi pozzetti. Se utilizzato, aggiungere 100 µl del controllo positivo basso **Low control | +** al test. Quindi incubare la piastra per un'ora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.6. Primo lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere risultati corretti e deve pertanto essere effettuato attenendosi rigorosamente alle istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti contenente soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi picchiettare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità residua. Lavare poi la piastra 5 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio diluito (vedere 9.2). Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Avvertenze: Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio per micropiastre, accertarsi che la macchina sia regolata correttamente sul tipo di piastra da microtitolazione impiegato. Oltre a ciò, l'eventuale sospensione fecale non completamente priva di particelle prima del primo lavaggio deve essere rimossa manualmente mediante centrifugazione per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio.

Avvertenze: Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio. Dopo l'ultimo lavaggio, picchiettare accuratamente la piastra su carta assorbente pulita o su carta da laboratorio al fine di eliminare l'eventuale umidità residua.

9.7. Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato **Conjugate** in ogni pozzetto. Quindi incubare la piastra per un'ora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.8. Secondo lavaggio

Dopo il periodo di incubazione, svuotare il coniugato dei pozzetti in un contenitore per rifiuti contenente una soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi picchiettare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità residua. Lavare poi la piastra cinque volte, utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio diluito. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

9.9. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **SeroSC** a ogni pozzetto. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Successivamente, arrestare la reazione aggiungendo 50 µl di reagente bloccante **Stop** a ogni pozzetto.

Dopo avere miscelato con cura (picchiettando leggermente il lato della piastra), misurare l'assorbanza a 450 nm alla lunghezza d'onda di riferimento di 620 nm.

Avvertenze: I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati neri del substrato. Questi campioni devono essere diluiti 1:10 e utilizzati nuovamente nel test (vedere 9.5.). (diluizione finale del campione fecale: 1:25.000).

10. Controllo di qualità - Indicazione di deterioramento dei reagenti

Ai fini del controllo di qualità, il calibratore **Calibrator** (calibrazione a 1 punto, raccomandata in duplicato), o da Standard 1 a Standard 5 **Standard 1** – **Standard 5** (curva standard, raccomandata in duplicato), il tampone di diluizione del campione RIDASCREEN® **Diluent | 3** come controllo negativo, e il controllo positivo **Control | +** devono essere utilizzati ogni volta che si effettua il test per garantire la stabilità dei reagenti e le prestazioni corrette del test. L'uso del controllo positivo basso è facoltativo.

Il test è stato eseguito correttamente quando la media di estinzione (OD) del controllo negativo a 450 nm/620 nm è inferiore a 0,05, e la media di estinzione (OD) mediata del calibratore (se si utilizza la calibrazione a 1 punto) rientra nell'intervallo indicato nella scheda tecnica specifica del lotto. Quando si utilizzano il calibratore e i cinque standard, il controllo positivo fornisce informazioni sulla validità del test. L'intervallo di concentrazione deve rientrare nell'intervallo specifico del lotto indicato nella scheda tecnica.

Quando RIDASCREEN® Calprotectin viene analizzato su sistemi ELISA aperti e completamente automatizzati, e a seconda del sistema, la OD misurata del calibratore **Calibrator** (quando si usa la calibrazione a 1 punto) può differire dall'intervallo indicato sul certificato specifico del lotto. Anche sui sistemi ELISA completamente automatizzati, il controllo positivo **Control | +** è decisivo per la validità dei risultati del test e deve quindi essere sempre testato. L'utilizzo del controllo positivo basso **Low control | +** non è indispensabile.

Uno scostamento dai valori richiesti, una torbidità del reagente, o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti può indicare che i reagenti sono scaduti. Se i valori fissati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Prestazioni funzionali dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite; non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

La concentrazione di calprotectina in mg/kg di feci viene determinata con ELISA RIDASCREEN® Calprotectin tramite la procedura di calibrazione a 1 punto (vedere 11.1.) secondo il modello logaritmico logistico a 4 parametri (4PL) o tramite una procedura per curva standard (vedere 11.2.).

Per calcolare i risultati è necessario utilizzare il software di valutazione RIDA®SOFT Win.NET. Il software RIDA®SOFT Win.NET o i relativi aggiornamenti possono essere ottenuti su richiesta contattando R-Biopharm AG o il distributore R-Biopharm locale. Al posto di RIDA®SOFT Win.net si possono utilizzare anche altri software di valutazione che forniscono il modello logaritmico logistico a 4 parametri.

11.1. Quantificazione a punto singolo conformemente al modello logaritmico logistico a 4 parametri

I parametri (A - D) necessari per il calcolo del 4PL della curva standard e del valore target per il calibratore, il controllo positivo e il controllo positivo basso sono riportati sulla scheda tecnica specifica del lotto fornita con il kit del test, e devono essere confrontati con i valori nel software di valutazione prima della misurazione.

Nel controllo di qualità finale, R-Biopharm AG calcola la curva standard (compresi i parametri A - D) in condizioni di test ottimali per ogni lotto di kit, così come un valore target e un intervallo di concentrazione consentito per la OD del calibratore, il controllo positivo e il controllo positivo basso. Il calibratore viene testato anche per compensare le fluttuazioni del test e controllare la qualità della procedura di test. Il controllo positivo fornisce informazioni sulla validità del test.

RIDA®SOFT Win.net calcola internamente il fattore di correzione F dalla media dell'analisi in duplicato del calibratore e del suo valore target. Questo fattore di correzione viene poi riconciliato con le assorbanze per i campioni fecali. I risultati del test possono essere valutati in modo sicuro e affidabile entro i limiti della curva standard.

11.2. Quantificazione mediante curva standard

RIDASCREEN® Calprotectin viene valutato con una curva standard che deve essere inclusa in ogni esecuzione. Un esempio di curva standard può essere preso dalla scheda tecnica specifica del lotto inclusa.

Nella fase finale del controllo di qualità, R-Biopharm AG determina un valore di riferimento in condizioni di test ottimali per ogni lotto di kit e determina una gamma di concentrazione consentita per il controllo positivo e il controllo positivo basso. Per la quantificazione attraverso la curva standard, il controllo positivo fornisce informazioni sulla validità del test. Il controllo positivo deve raggiungere l'intervallo di concentrazione specificato.

11.3. Risultato del test

A partire da un valore di cut-off >50 mg/kg per la calprotectina umana nelle feci, il risultato deve essere considerato positivo. Se i risultati sono inferiori al valore di cut-off, i campioni devono essere considerati negativi.

Il valore di cut-off di 50 mg/kg proposto per gli adulti può essere utilizzato anche per i bambini di età compresa tra i 4 e i 17 anni.

Consigliamo a ogni laboratorio di stabilire la propria gamma di valori standard.

Avvertenze: Quando si utilizza la calibrazione a 1 punto o la curva standard, si raccomanda di diluire ulteriormente (1:5 in Diluent 3) i campioni che mostrano concentrazioni di calprotectina superiori a 600 mg/kg, e rianalizzarli nel test.

Avvertenze: Se quantificati tramite calibrazione a 1 punto (1:5 in Diluent 3), si raccomanda di diluire ulteriormente i campioni che mostrano valori di OD superiori a 3,0 e rianalizzarli nel test.

12. Limiti del metodo

RIDASCREEN® Calprotectin rileva epitopi di calprotectina umana in campioni fecali. La diagnosi non dovrebbe basarsi esclusivamente sulle concentrazioni di calprotectina determinate, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi del paziente.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1. Precisione

13.1.1 Precisione intra-analisi

La precisione intra-test è stata testata in un'unica esecuzione utilizzando 4 riferimenti in 40 replicati ciascuno. I valori di OD derivanti da queste misurazioni sono stati utilizzati per determinare le concentrazioni di calprotectina tramite il calibratore o la curva standard, calcolando per ciascun campione il valore medio (MV), le deviazioni standard (SD) e i coefficienti di variazione (CV) delle misurazioni.

Tabella 3: Precisione intra-test di RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Riferimento A	53,8	2,9	5,4	56,6	3,0	5,3
Riferimento B	96,6	5,5	5,7	102,4	6,3	6,2
Riferimento C	136,5	5,6	4,1	130,5	5,2	4,0
Riferimento D	246,7	14,1	5,7	267,6	15,0	5,6

13.1.2 Precisione inter-test

La precisione inter-test è stata determinata in duplicato in 20 esecuzioni (2 esecuzioni al giorno) utilizzando 4 riferimenti in giorni diversi da parte di 3 tecnici. I valori di OD derivanti da queste misurazioni sono stati utilizzati per determinare le concentrazioni di calprotectina tramite il calibratore o la curva standard, calcolando per ciascun campione il valore medio (MV), le deviazioni standard (SD) e i coefficienti di variazione (CV) delle misurazioni.

Tabella 4: Precisione inter-test di RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Riferimento A	55,7	4,3	7,7	57,5	4,1	7,1
Riferimento B	106,5	7,2	6,8	112,8	8,3	7,3
Riferimento C	129,6	7,8	6,0	138,5	7,6	5,5
Riferimento D	260,9	28,3	10,9	284,7	22,7	8,0

13.2. Precisione di estrazione

La precisione di estrazione è stata determinata in duplicato in 10 esecuzioni (5 giorni, 2 esecuzioni al giorno) in giorni diversi da parte di 2 tecnici utilizzando 3 campioni fecali al di sopra del cut-off. I campioni sono stati estratti e diluiti come richiesto prima di ogni esecuzione. I valori di OD derivanti da queste misurazioni sono stati utilizzati per determinare le concentrazioni di calprotectina tramite il calibratore o la curva standard, calcolando per ciascun campione il valore medio (MV), le deviazioni standard (SD) e i coefficienti di variazione (CV) delle misurazioni.

Tabella 5: Precisione di estrazione inter-test

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Riferimento A	64,0	5,0	7,9	67,4	5,0	7,5
Riferimento B	114,1	10,3	9,0	123,2	10,7	8,7
Riferimento C	264,0	33,3	12,6	284,8	22,1	7,8

14. Cronologia delle versioni

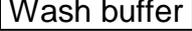
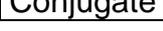
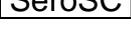
Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-07-01	Revisione generale 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

	Piastra da microtitolazione
	Tampone di estrazione e di diluizione
	Tampone di diluizione del campione
	Tampone di lavaggio 10x
	Calibratore
	Controllo positivo
	Controllo positivo basso
	Coniugato
	Substrato
	Reagente bloccante

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.