

RIDASCREEN[®] Calprotectin

Ref.: G09036



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para diagnósticos *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.

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 calcio en condiciones fisiológicas. Debido a sus propiedades fijadoras de calcio, la calprotectina es una proteína estable y extremadamente resistente al calor y a la proteólisis.

La calprotectina es producida por los neutrófilos (granulocitos neutrófilos) y 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. Aunque la función biológica de la calprotectina no está completamente dilucidada, se supone que ejerce una función protectora de las células contra procesos leucocitarios y bacterianos. La capacidad fijadora de zinc parece conferir asimismo propiedades antibacterianas a la calprotectina que, además, desempeña funciones reguladoras de los procesos inflamatorios a nivel intracelular y extracelular.

La existencia de una enfermedad inflamatoria intestinal provoca que los neutrófilos migren hacia el lumen intestinal y liberen calprotectina, que posteriormente es excretada en las heces. La concentración de calprotectina en las heces está correlacionada con el número de neutrófilos que migran y liberan calprotectina al lumen intestinal. En consecuencia, la concentración de calprotectina fecal puede utilizarse como medida del número de neutrófilos en el lumen intestinal y como indicador de la gravedad de la inflamación intestinal.

A nivel clínico, la relevancia especial de la medida de calprotectina fecal reside en la posibilidad de proporcionar un diagnóstico fiable de enfermedad inflamatoria intestinal. En muchos casos, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) genera síntomas que son muy difíciles de distinguir del síndrome del intestino irritable (IBS). La medida de calprotectina fecal proporciona un indicador fiable de la existencia de enfermedad inflamatoria intestinal. 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 parámetros histológicos y endoscópicos de actividad patológica en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Por tanto, la medida de la calprotectina fecal es un modo de evaluar objetivamente la respuesta al tratamiento de 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 de EII.

Razones para evaluar la calprotectina fecal:

- Diferenciación fiable entre enfermedad inflamatoria intestinal crónica y síndrome de intestino irritable.
- Detección precoz de brotes de enfermedad inflamatoria intestinal.
- Documentación objetiva de la gravedad de la inflamación para controlar la respuesta durante el tratamiento.
- Como marcador de inflamación intestinal aguda.

3. Principio de ensayo

En RIDASCREEN® Calprotectin se usan anticuerpos específicos con un método tipo sándwich. Los anticuerpos monoclonales contra epitopos de calprotectina humana se aplican a la superficie de los pocillos de la placa. Se pipetea en los pocillos de la placa una suspensión de la muestra de heces del paciente objeto del ensayo, y se incuba. Tras el paso de lavado, se realiza una segunda fase de incubación junto con un anticuerpo monoclonal que se conjuga con peroxidasa de rábano picante. En presencia de calprotectina, se forma un complejo sándwich compuesto de los anticuerpos inmovilizados, calprotectina y anticuerpos conjugados. Los anticuerpos marcados con enzima no unidos se eliminan durante una siguiente fase de lavado. Tras añadir el sustrato, la enzima unida cambia el color de la solución (incolora hasta ese momento) en los pocillos de la placa de pocillos, tornándose azul si el ensayo es positivo. Al añadir el reactivo de parada, el color cambia de azul a amarillo. La absorbancia es proporcional a la concentración de calprotectina presente en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Un kit es suficiente para 96 determinaciones.

Plate	96 determinaciones	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales (de ratón) contra calprotectina humana.
Extract	2 x 100 ml	Tampón de extracción (concentración 3 x); tampón Tris; contiene NaN_3 0,05%
Diluent 3	100 ml	Tampón de dilución de muestra; solución salina tamponada con proteína; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar; color rojo
Wash	100 ml	Tampón de lavado (concentración 10 x); solución salina tamponada con fosfato; contiene timerosal 0,1% y 0,1% detergente
Calibrator <i>tapa transparente</i>	1 ml	Calibrador (procedimiento de calibración de un punto); contiene NaN_3 0,1%; listo para usar
Standard 1 a	1 ml	5 estándares (procedimiento de curva estándar); concentraciones de calprotectina de los estándares 1 a 5:
Standard 5 <i>tapa blanca</i>		19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar
Control + <i>tapa roja</i>	1 ml	Control positivo; contiene NaN_3 0,1%; listo para usar
Low control + <i>tapa verde</i>	1 ml	Control positivo bajo; contiene NaN_3 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	Sustrato; peróxido de hidrógeno / tetrametilbencidina (TMB); listo para usar.
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. El tampón de lavado diluido puede utilizarse hasta 4 semanas como máximo si se conserva a 2 - 8 °C. El tampón de extracción diluido puede

utilizarse hasta 6 meses si se conserva a 2 – 8 °C y, como máximo, hasta la fecha de caducidad del concentrado. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad. Debe abrirse la bolsa de aluminio que contiene las tiras de pocillos sin que se rompa el precinto de seguridad. Cualquier tira de pocillos que no vaya a utilizarse deberá retornarse inmediatamente a la bolsa de aluminio y almacenarse a 2 - 8 °C. El sustrato incoloro debe protegerse también de la luz directa para evitar que se descomponga o se vuelva azul debido a la oxidación automática. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Microbalanza o RIDA[®]TUBE Calprotectin (ref. GZ3016)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.4.)
- Micropipetas de 20 - 100 µl y 1 ml
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Equipo de limpieza de microplacas o pipeta multicanal (300 µl)
- Lector de microplacas (450 nm, longitud de onda de referencia ≥ 620 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5%

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Deberán seguirse de forma estricta las directrices para el trabajo en laboratorios médicos y las instrucciones para la realización del ensayo.

Las muestras de heces deben tratarse como potencialmente infecciosas y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales.

No pipetear las muestras ni los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Al manipular las muestras, lleve guantes desechables y, una vez finalizado el ensayo, lávese las manos. No fumar, comer o beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos de los ensayos.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1% como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

El calibrador, los estándares, el control positivo, el control positivo bajo y el tampón de dilución de muestras contienen NaN_3 al 0,05% y 0,1% como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel ni con la membrana mucosa.

El peróxido de hidrógeno puede causar quemaduras. Manejar con precaución.

El reactivo de parada contiene ácido sulfúrico 1 N. Evitar el contacto con piel y ropa. Si se contamina la piel con el reactivo, aclarar con agua.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o esterilizarse a 121 °C en el autoclave durante por lo menos una hora. PRECAUCIÓN: para evitar la formación de gases tóxicos, neutralizar cualquier residuo líquido que contenga reactivo de parada antes de eliminarlo en solución de hipoclorito.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de heces deben transportarse refrigeradas siempre que sea posible y conservarse a 2 - 8 °C antes de realizar el ensayo. Si no se usan inmediatamente después de llegar (hasta 3 días después de la llegada), recomendamos conservarlas a -20 °C o menos. La congelación de muestras de heces naturales puede provocar que los granulocitos revienten y liberen calprotectina. Como consecuencia, las muestras congeladas pueden presentar concentraciones de calprotectina ligeramente mayores que las muestras frescas. Evitar congelar y descongelar la muestra innecesariamente. No guardar las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Procedimiento de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y la placa de pocillos deben adquirir temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de la utilización. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Tras su uso, las tiras de pocillos (en bolsas selladas) y los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C. Una vez usadas, las tiras de pocillos no podrán usarse de nuevo. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas. Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit. No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o colocar encima una película plástica para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada (1:10). Vierta 100 ml de concentrado en una probeta de 1000 ml y rellene el resto con agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

9.3. Preparación del tampón de extracción

Mezclar 1 parte de tampón de extracción **Extract** con 2 partes de agua destilada (1:3).

9.4. Preparación de las muestras

Las muestras de heces deben conservarse continuamente a 2 - 8 °C antes de usarlas. Si no se usan inmediatamente después de llegar (hasta 3 días después de la llegada), recomendamos conservarlas como mínimo a -20 °C. Dejar que las muestras congeladas adquieran paulatinamente temperatura ambiente.

9.4.1. Preparación y suspensión de las muestras mediante pesaje

Pesar exactamente 100 mg de muestra de heces en un tubo de ensayo etiquetado y añadir con pipeta exactamente 5 ml de tampón de extracción diluido (dilución 1:50).

Alternativamente es posible pesar 80 a 130 mg de muestra de heces y suspenderla en un volumen proporcionalmente menor o mayor (ver tab. 1) de tampón de extracción diluido (para garantizar que se mantiene la proporción (1:50)).

Tab. 1: Datos sobre las cantidades requeridas de tampón de extracción diluido en función de la cantidad de heces pesada

Peso [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

Si la muestra de heces se suspende nuevamente en un volumen constante de 5 ml de tampón de extracción, debe tenerse en cuenta el factor de dilución variable en la evaluación (ver tab. 2).

Tabla 2: Especificación del factor de dilución para adición de un volumen constante de tampón de extracción diluido (5 ml) en función de la cantidad de heces pesada

Peso [mg]	Factor de dilución [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

Independientemente del método utilizado para pesar la muestra de heces, la suspensión de heces se homogeneiza enérgicamente en un mezclador de vórtice. Si las heces tienen consistencia líquida, utilizar una pipeta para extraer exactamente 100 µl y suspender la muestra en exactamente 5 ml de tampón de extracción diluido.

A continuación, incubar las muestras durante 5 min. a temperatura ambiente y volver a homogeneizarlas enérgicamente en el vórtice.

La suspensión homogeneizada debe centrifugarse a más de 3000 g durante 10 minutos para que sedimenten las partículas fecales gruesas. El sobrenadante del extracto debe volver a diluirse para utilizarlo inmediatamente en el ensayo.

a. Dilución manual de muestras

Diluir 20 µl del sobrenadante clarificado en 980 µl del tampón de dilución de muestras

Diluent | 3 (1:50). Utilizar 100 µl de la última dilución de la muestra de heces para el ensayo.

Como método alternativo para la preparación y homogeneización de muestras puede utilizarse RIDA[®]TUBE Calprotectin(ref. GZ3016; ver 9.4.2.), un tubo de recogida de muestras.

b. Dilución de muestras en un sistema automático

Si el ensayo se realiza en el sistema de ELISA automático DSX™ (Dynex Technologies, Inc.), deberá solicitarse el protocolo de ensayo específico a R-Biopharm AG y aplicarlo en el sistema. El sistema ejecuta automáticamente la dilución de las muestras según se describe a continuación.

En un primer paso, el sistema ELISA automático pipetea 20 µl de sobrenadante clarificado en una placa DeepWell y lo diluye en 980 µl de tampón de dilución de muestras **Diluent | 3** (1:50). A continuación se ejecutan dos ciclos de mezclado.

El número requerido de pocillos recubiertos se introduce en el soporte de pocillos de la placa de microtitulación **Plate** RIDASCREEN® Calprotectin.

Se extraen alícuotas de 100 µl de la muestra diluida de la placa DeepWell y se transfieren a la placa de pocillos **Plate** RIDASCREEN® Calprotectin (dilución final: 1:2500).

Consultar a R-Biopharm AG para instrucciones relativas a la realización del ensayo con otros sistemas ELISA de pipeteo automático.

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 al procedimiento de preparación y suspensión de muestras descrito en el apartado 9.4.1, que requiere el pesaje de las muestras de heces. Estos tubos, disponibles como accesorios del ensayo RIDASCREEN® Calprotectin, simplifican considerablemente la preparación.

Cada tubo RIDA®TUBE Calprotectin se suministra con un volumen inicial de 2,5 ml de tampón de extracción listo para usar y tiene cabida para 10 mg de muestra de heces. En caso de procesar muestras de heces líquidas, pueden pipetarse directamente 10 µl de la muestra de heces en el tubo con el tampón de extracción.

La obtención de muestras y el procedimiento de extracción se describen detalladamente en el prospecto de instrucciones incluido en cada envase de RIDA®TUBE Calprotectin que puede descargarse también en www.r-biopharm.de.

Los extractos de heces no deben conservarse y han de analizarse directamente después de diluirlos.

a. Dilución manual de muestras

100 µl de la suspensión de heces obtenida mediante RIDA®TUBE Calprotectin (ref. GZ3016), según se describe en el capítulo 8 de las instrucciones del producto GZ3016, se diluyen en 900 µl de tampón de dilución de muestras **Diluent | 3** RIDASCREEN®. 100 µl de esta dilución final de la muestra de heces se utilizan directamente en el ensayo.

b. Dilución automática de muestras

Si el ensayo se realiza en el sistema de ELISA automático DSX™ (Dynex Technologies, Inc.), deberá solicitarse el protocolo de ensayo específico a R-Biopharm AG y aplicarlo en el sistema.

El número requerido de pocillos recubiertos se sitúa en el soporte de pocillos de la placa de microtitulación **Plate** RIDASCREEN® Calprotectin.

Si se utiliza el sistema ELISA automático, la suspensión de heces extraída con un RIDA®TUBE Calprotectin se diluye automáticamente en proporción 1:10 (dilución final: 1:2500) en la placa de pocillos **Plate**. Para esto se pipetea 10 µl de la suspensión de heces directamente del tubo RIDA®TUBE Calprotectin (ref. GZ3016) a la placa de pocillos RIDASCREEN® Calprotectin y se diluyen con 90 µl de tampón de dilución de muestras **Diluent | 3**.

Consultar a R-Biopharm AG para instrucciones relativas a la realización del ensayo con otros sistemas ELISA de pipeteo automático.

9.5. Primera incubación

Después de colocar una cantidad suficiente de pocillos en el soporte, añadir 100 µl de calibrador **Calibrator** (procedimiento de calibración de un punto, recomendado por duplicado) o 100 µl de estándar 1 a estándar 5 (procedimiento de curva estándar, recomendado por duplicado), de tampón de dilución de muestras **Diluent | 3** (= control negativo), de control positivo **Control | +** y de las suspensiones de heces analizadas en los pocillos correspondientes. En caso de utilizarlo, añadir asimismo 100 µl del control positivo bajo **Low control | +** en los pocillos correspondientes. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 1 hora.

9.6. Primer lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. Golpear la placa (volteada) enérgicamente sobre papel absorbente para garantizar la total eliminación de líquido en los pocillos. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado diluido cada vez. (véase 9.2). Golpear la placa (volteada) enérgicamente sobre papel absorbente para garantizar la total eliminación de líquido en los pocillos.

Al usar un equipo de limpieza de microplacas, asegúrese de que la máquina esté ajustada correctamente al tipo de placa de pocillos que se use. Además, una suspensión de heces que presente alguna partícula antes del primer lavado debería eliminarse manualmente mediante centrifugación para evitar que se bloqueen las boquillas de lavado. Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada fase de lavado. Tras el último lavado, golpear la placa (volteada) enérgicamente sobre papel absorbente para garantizar la total eliminación de líquido en los pocillos.

9.7. Segunda incubación

Añada 100 µl de conjugado **Conjugate** en cada pocillo. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 1 hora.

9.8. Segundo lavado

Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. Golpear la placa (volteada) enérgicamente sobre papel absorbente para garantizar la total eliminación de líquido en los pocillos. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado diluido cada vez. Golpear la placa (volteada) enérgicamente sobre papel absorbente para garantizar la total eliminación de líquido en los pocillos.

9.9. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **SeroSC** en cada pocillo. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 hora en condiciones de oscuridad. Después, frenar la reacción añadiendo 50 µl de reactivo de parada **Stop** en cada pocillo.

Tras mezclar con cuidado (golpeando ligeramente en el lateral de la placa), medir la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia \geq 620 nm) en un lector de placas.

Atención: muestras de pacientes con positivo alto pueden inducir la formación de un precipitado de sustrato de color negro. Estas muestras deberán volver a diluirse en proporción 1:10 (dilución final de la muestra de heces: 1:25000) y analizarse de nuevo.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

Para fines de control de la calidad, deberá utilizarse el calibrador **Calibrator** (procedimiento de calibración de un punto, recomendado por duplicado) o cada uno de los estándares 1 a 5 **Standard 1** – **Standard 5** (procedimiento de curva estándar, recomendado por duplicado), el tampón de dilución de muestras **Diluent | 3** así como un control negativo y un control positivo **Control | +** cada vez que se realice el ensayo.

El ensayo se habrá realizado correctamente si la extinción (DO) del control negativo a 450 nm/620 nm es menor que 0.05 y la extinción (OD) determinada del calibrador (procedimiento de calibración de un punto) está dentro del rango de lote específico indicado en la hoja de datos suministrada. El control positivo es determinante para la validez de los resultados del ensayo cuando se utiliza el calibrador o los cinco estándares y debe estar dentro del rango de concentración específico de lote indicado en la hoja de datos.

En caso de que el test RIDASCREEN® Calprotectin se ejecute con procesadores ELISA, el valor DO medido para el calibrador **Calibrator** (procedimiento de calibración de un punto) puede diferir, según el instrumento utilizado, del valor indicado en la hoja de datos específica del lote.

En consecuencia, el control positivo es decisivo para la validez de los resultados y en procesadores ELISA. No es obligatorio utilizar el control positivo bajo Low control | +.

Si los valores difieren de los requeridos, si el sustrato está turbio o se ha puesto azul antes de añadirlo en lo pocillos, puede que los reactivos hayan caducado. Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, póngase en contacto con el fabricante o el distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

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

Para determinar los resultados se precisa el software de evaluación RIDA®SOFT Win.net. Solicitar RIDA®SOFT Win.net o una versión actualizada a R-Biopharm AG o al distribuidor local R-Biopharm.

En lugar de RIDA®SOFT Win.net puede utilizarse otro software que trabaje con el modelo logístico de cuatro parámetros.

11.1. Cuantificación mediante el procedimiento de calibración de un punto (modelo logístico de 4 parámetros)

Los parámetros (A - D) de la curva estándar necesarios para el cálculo 4PL y el valor nominal del calibrador, control positivo y control positivo bajo figuran en la hoja de datos de lote específica que se suministra con el kit y deben compararse con los valores del software de evaluación antes de cada medición utilizando la información pertinente de esta hoja de datos.

R-Biopharm AG ha determinado la curva estándar (incluidos los parámetros A - D), los valores nominales y el rango DO admisible del calibrador o rango de concentración del control positivo y positivo en condiciones óptimas bajo para cada lote del kit en el marco del control de calidad final.

El calibrados se analiza de forma rutinaria para compensar variaciones del ensayo y comprobar la calidad de cada pasada. El control positivo es decisivo para la validez de los resultados del ensayo.

RIDA®SOFT Win.net calcula internamente un factor de corrección F a partir del valor medio de la determinación por duplicado del control del calibrador y su valor nominal y lo concilia con la absorbancia de las muestras de heces. Dentro de los límites de la curva estándar puede realizarse una evaluación segura y fiable de los resultados del ensayo.

11.2. Cuantificación mediante el procedimiento de la curva estándar

El test RIDASCREEN Calprotectin puede evaluarse mediante una curva estándar que debe procesarse cada vez que se ejecute el ensayo. Para un ejemplo de progresión de curva estándar, consultar la hoja de datos de lote específica incluida.

En el control de calidad final, R-Biopharm AG ha determinado los valores objetivo y el rango de concentración admisible del control positivo y positivo bajo en condiciones de ensayo óptimas para cada lote del kit. El control positivo es decisivo para la validez de los resultados del ensayo en las cuantificaciones mediante el procedimiento de curva estándar. Es necesario alcanzar el rango de concentración predefinido para el control positivo.

11.3. Resultados del ensayo

Para un valor de corte > 50 mg calprotectina/kg heces, el resultado debe considerarse positivo. Si el resultado está por debajo del valor de corte, las muestras deben considerarse negativas. El valor de corte sugerido para adultos (50 mg/kg) puede aplicarse también a niños y juveniles de 4 – 17 años.

Recomendamos que cada laboratorio fije un rango de valores estándar propio.

Se recomienda volver a diluir (proporción 1:5 en diluyente 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 para la cuantificación.

Se recomienda volver a diluir (proporción 1:5 en diluyente 3) y analizar en el ensayo las muestras que presenten valores DO mayores que 3.0 cuando se utiliza la calibración de un punto para la cuantificación.

12. Limitaciones del método

RIDASCREEN® Calprotectin detecta epitopos de calprotectina humana en muestras de heces. El diagnóstico debe basarse no solo en la determinación de la concentración de calprotectina, sino también en la historia clínica y los síntomas.

13. Características de rendimiento

13.1. Precisión

13.1.1. Reproducibilidad intraensayo

La reproducibilidad intraensayo se determinó en una sola pasada midiendo 40 réplicas de 4 referencias. Los valores DO de estas medidas se utilizaron para determinar las concentraciones de calprotectina. Se calculó el valor medio (MV), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada muestra. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tab. 3: Reproducibilidad intraensayo RIDASCREEN® Calprotectin

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

13.1.2. Reproducibilidad interensayo

Tres técnicos determinaron la reproducibilidad interensayo por duplicado realizando 20 pasadas (2 por día) sobre cuatro referencias. Los valores DO de estas medidas se utilizaron para determinar las concentraciones de calprotectina. Se calculó el valor medio (MV), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada muestra. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tab. 4: Reproducibilidad interensayo RIDASCREEN® Calprotectin

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

13.2. Precisión de extracción

La precisión de extracción se determinó por duplicado en 10 pasadas (5 días, 2 por día) en días diferentes con 3 muestras de heces (concentraciones > 50 mg/kg). Las muestras se extraen antes de cada pasada y se diluyen según sea necesario. Los valores DO de estas medidas se utilizaron para determinar las concentraciones de calprotectina. Se calculó el valor medio (MV), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada muestra. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tab. 5: Precisión de extracción

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

14. Literatura

- Johne B et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1997; 50: 113-123.
- Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 268: 353-363.
- Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.
- Tibble J et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
- Summerton CB et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 841: 841-845.
- Striz I, Trebichavski I. Calprotectin – a pleiotropic molecular in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004; 53: 245-253.
- Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohns disease. *Gut* 2005; 54: 364–368.
- Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 450-455.
- Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(6): 524-534.
- Schopfer AM et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 162–169.
- Van Rheenen PF et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010; 341:c3369.