

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Calprotectin

Art. Nr. G09036



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



## 1. Scopo

Per diagnostica *in vitro*. RIDASCREEN® Calprotectin è un test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di calprotectina umana in campioni fecali.

## 2. Riassunto e spiegazione del test

La calprotectina, una proteina di legame del calcio prodotta in cellule quali i neutrofili, è rilasciata durante una infiammazione. La calprotectina fecale serve come marcatore di infiammazione gastrointestinale e neoplasie.

La calprotectina (conosciuta anche come MRP-8/14, calgranulina A/B e S100A8/A9) è una proteina di legame del calcio e dello zinco appartenente alla famiglia delle proteine S100. In condizioni fisiologiche la calprotectina lega il calcio. A causa delle sue proprietà di legame con il calcio, la calprotectina è una proteina stabile, altamente resistente al calore e alla proteolisi.

La calprotectina è prodotta sia dai neutrofili (granulociti neutrofili) sia dai monociti. Nei neutrofili, la concentrazione di calprotectina nel citosol è in un intervallo compreso tra 5 e 15 mg / l e rappresenta circa il 60% della frazione proteica solubile citoplasmatica e il 5% delle frazioni proteiche totali di queste cellule. La funzione biologica della calprotectina non è completamente conosciuta. Si suppone che la calprotectina abbia un'utile funzione biologica nella protezione delle cellule dalle proteasi leucocitarie e batteriche. Si presume inoltre che la calprotectina abbia proprietà antibatteriche in virtù della sua capacità di legame con lo zinco. Inoltre, la calprotectina mostra funzioni di regolazione sia intra che extracellulare durante i processi infiammatori.

In presenza di una malattia infiammatoria intestinale, i neutrofili affluiscono nel lume intestinale e rilasciano calprotectina, che viene escreta con le feci. La concentrazione di calprotectina nei campioni fecali è correlata al numero di neutrofili che hanno migrato e hanno rilasciato calprotectina nel lume intestinale. Di conseguenza, la concentrazione di calprotectina fecale può essere utilizzata come misura del numero di neutrofili nel lume intestinale e come indicatore della gravità di una infezione intestinale.

Clinicamente, la particolare rilevanza della determinazione di calprotectina fecale risiede nella sua affidabilità diagnostica della malattia infiammatoria intestinale. In molti casi, la malattia infiammatoria cronica dell'intestino (IBD) produce sintomi molto difficili da distinguere da quelli della sindrome del colon irritabile (IBS). La determinazione di calprotectina fecale fornisce un'indicazione attendibile della presenza di una malattia infiammatoria intestinale. Attraverso l'uso di questo marcatore, molti pazienti con la sindrome del colon irritabile possono così evitare di eseguire inutilmente la colonscopia. In un certo numero di pubblicazioni, si è dimostrato che le concentrazioni di calprotectina fecale sono fortemente correlate con i parametri di attività istologica ed endoscopica della malattia nei pazienti con malattia infiammatoria cronica dell'intestino. Pertanto, la determinazione della calprotectina fecale fornisce un mezzo per valutare oggettivamente la risposta al trattamento della malattia infiammatoria cronica dell'intestino e per

monitorare questi pazienti durante la remissione clinica per consentire la diagnosi precoce e il trattamento delle recidive di IBD.

La calprotectina fecale dovrebbe essere valutata:

- Per la differenziazione affidabile tra malattia infiammatoria cronica e sindrome dell'intestino irritabile
- Per la diagnosi precoce delle riacutizzazioni della malattia infiammatoria intestinale
- Per la documentazione oggettiva della gravità dell'infiammazione per il monitoraggio della risposta durante il corso del trattamento
- Come marker di infiammazione acuta intestinale

### 3. Principio del test

Nel kit RIDASCREEN® Calprotectin sono utilizzati anticorpi specifici in un metodo di analisi a sandwich. Gli anticorpi monoclonali contro gli epitopi della calprotectina umana sono applicati sulla superficie dei pozzetti della micropiastra. Una sospensione dei campioni fecali da analizzare è aggiunta nei pozzetti ed incubata. Dopo una fase di lavaggio segue una seconda incubazione con anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi di rafano. In presenza di calprotectina, si forma un complesso a sandwich costituito da anticorpi immobilizzati, calprotectina e anticorpi coniugati. Gli anticorpi legati all'enzima che non si sono legati vengono rimossi durante una successiva fase di lavaggio. Dopo l'aggiunta del substrato, in caso di test positivo, l'enzima legato trasforma la soluzione presente nei pozzetti della micropiastra, da incolore a blu. Con l'aggiunta della soluzione di stop, il colore vira da blu a giallo. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di Calprotectina presente nel campione.

### 4. Reagenti forniti

Un kit è sufficiente per 96 determinazioni.

Micropiastra: <b>Plate</b>	96 det	Micropiastra, 12 strip (divisibili) rivestite con anticorpi monoclonali (topo) contro calprotectina umana
Estrazione: <b>Extract</b>	2 x 100 ml	Tampone di estrazione (concentrato 3X); Tris buffer; contiene 0.05% di NaN <sub>3</sub>
Diluyente 3: <b>Diluent   3</b>	100 ml	Tampone di diluizione del campione, soluzione- NaCl proteica a tampone; contiene 0.1% di NaN <sub>3</sub> , pronta all'uso, di colore rosso
Lavaggio: <b>Wash</b>	100 ml	Tampone di lavaggio (concentrato 10X), soluzione tampone fosfato-NaCl, contiene 0.1% Thimerosal e 0.1% di detergente

Calibratore 1 ml Calibratore (per la calibrazione a 1 punto); contiene RIDASCREEN® Calprotectin 17-03-30

<b>Calibrator</b> <i>Tappo trasparente</i>		0.1% di NaN <sub>3</sub> ; pronto all'uso
<b>Standard 1</b> a <b>Standard 5</b> <i>Tappo bianco</i>	1 ml	5 standard (per la curva standard). concentrazione degli standard di calprotectina da 1 a 5: 19.5/ 56/ 95/ 275/ 800 mg/kg; contiene 0.1% di NaN <sub>3</sub> . pronti all'uso
<b>Controllo +</b> <b>Control   +</b> <i>Tappo rosso</i>	1 ml	Controllo positivo; contiene 0.1% ml di NaN <sub>3</sub> ; pronto all'uso
<b>Basso controllo +</b> <b>Low control   +</b> <i>Tappo verde</i>	1 ml	Basso controllo positivo; contiene 0.1% ml di NaN <sub>3</sub> ; pronto all'uso
<b>Coniugato</b> <b>Conjugate</b>	12 ml	Coniugato con perossidasi, anticorpo monoclonale (topo) in soluzione proteica stabilizzata, pronto per l'uso
<b>SeroSC</b>	12 ml	Substrato; perossido di idrogeno / tetrametilbenzidina (TMB); pronto per l'uso
<b>Stop</b>	12 ml	Reagente di arresto, acido solforico 1N; pronto per l'uso

## 5. Conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C e devono essere utilizzati entro la data di scadenza stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito può essere utilizzato fino ad un massimo di 4 settimane se conservato a 2-8°C. Il tampone di estrazione concentrato deve essere completamente diluito dopo l'apertura del kit. Il tampone di estrazione diluito può essere utilizzato per 6 mesi se conservato a 2-8°C o al massimo fino alla data di scadenza del concentrato. Quando si conserva il tampone di estrazione diluito per qualche tempo, esso potrebbe diventare torbido. Tale torbidità non ha tuttavia alcun effetto sulla sua qualità. E' necessario evitare contaminazioni microbiologiche. Dopo la data di scadenza, non si fornisce alcuna garanzia sulla qualità del prodotto. La confezione di alluminio contenente la micropiastra deve essere aperta in modo tale da tenere integra la chiusura a clip. Le strip non utilizzate devono essere immediatamente riposte nella confezione di alluminio e conservate a 2-8°C. Il substrato incolore deve essere protetto dalla luce diretta per evitarne la decomposizione o il viraggio ad una colorazione blu, causata da auto-ossidazione. Una volta che il substrato è diventato blu, non deve più essere usato.

## 6. Reagenti aggiuntivi necessari – accessori richiesti

### 6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata

### 6.2. Accessori

- Microbilancia o provette di raccolta RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016)
- Miscelatore Vortex (opzionale, vedi 9.4)
- Micropipette da 20 -100 µl e da 1 ml
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Timer
- Lavatore per micropiastre o pipetta multicanale (300 µl)
- Lettore per micropiastre (450 nm, lunghezza d'onda di riferimento ≥ 620 nm)
- Carta da filtro (carta assorbente da laboratorio)
- Recipiente per rifiuti contenente una soluzione di ipoclorito allo 0.5%

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio specializzato. Le linee guida per lavorare in laboratori medici e le istruzioni d'uso del kit devono essere seguite scrupolosamente.

I campioni fecali devono essere trattati come potenzialmente infetti e trattati in conformità con le norme di sicurezza nazionali.

I campioni o i reagenti non devono essere dispensati con la bocca ed il contatto con la pelle lesa o con le membrane delle mucose deve essere evitato. Quando si maneggiano i campioni, indossare guanti monouso e lavarsi accuratamente le mani al termine dell'analisi. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui sono utilizzate le provette dei campioni o dei reagenti.

Il tampone di lavaggio contiene Thimerosal allo 0,1% come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la pelle e con le membrane delle mucose.

Il calibratore, il controllo positivo, il basso controllo positivo, il tampone di estrazione e il tampone di diluizione del campione contengono rispettivamente 0.05% e 0.1% di NaN<sub>3</sub> come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la pelle e con le membrane delle mucose.

Il perossido di idrogeno può provocare ustioni. Maneggiare con cura.

Il reagente di arresto contiene acido solforico 1 N. Evitare il contatto con la pelle e gli indumenti. Se la pelle viene a contatto con il reagente, sciacquare con acqua.

Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con i campioni potenzialmente infetti devono essere trattati con idonei disinfettanti o autoclavati a 121°C per almeno 1 ora. **ATTENZIONE:** per evitare la formazione di gas velenosi, qualsiasi rifiuto liquido contenente il reagente di arresto deve essere prima neutralizzato aggiungendo la soluzione di ipoclorito.

## **8. Raccolta del campione e conservazione**

I campioni fecali devono essere trasportati refrigerati, ove possibile, e conservati a 2-8 °C prima del test. Se non vengono utilizzati immediatamente dopo l'arrivo (entro 3 giorni dopo l'arrivo), si consiglia di conservarli a -20°C o a temperatura inferiore. Congelando i nativi campioni fecali, i granulociti neutrofili possono scoppiare e rilasciare calprotectina. Ciò può comportare un lieve aumento delle concentrazioni di calprotectina nei campioni congelati rispetto ai campioni freschi. Evitare di congelare e scongelare il campione più volte. I campioni fecali non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengono altri contenitori con conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti in quanto possono interferire con il kit RIDASCREEN® Calprotectin.

## **9. Esecuzione del test**

### 9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la micropiastra devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25°C) prima dell'uso. Le strip della micropiastra non devono essere rimosse dal sacchetto di alluminio prima di aver raggiunto la temperatura ambiente. I reagenti devono essere accuratamente miscelati prima dell'uso. Dopo l'uso, le strip (in sacchetti sigillati) e i reagenti devono essere conservati a 2-8 °C. Una volta utilizzate, le strip non devono essere nuovamente utilizzate. I reagenti e le strip non devono essere utilizzati se la confezione è danneggiata o le fiale mostrano delle perdite. Al fine di evitare cross-contaminazioni, i campioni non devono entrare in contatto diretto con i componenti del kit. L'analisi non deve essere eseguita alla luce solare diretta. Si consiglia di coprire la micropiastra o di porre del film sopra di essa per evitare perdite per evaporazione.

### 9.2 Preparazione del tampone di lavaggio

Mescolare 1 parte di tampone di lavaggio concentrato **Wash** con 9 parti di acqua distillata (1:10). Introdurre 100 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1000 ml e riempire con acqua distillata fino a 1000 ml. Ogni cristallo presente nel concentrato deve essere preventivamente sciolto mediante riscaldamento in acqua a 37 °C.

### 9.3. Preparazione del tampone di estrazione

Mescolare 1 parte di tampone di estrazione **Extract** con 2 parti di acqua distillata (1:3).

### 9.4. Preparazione del campione

I campioni fecali devono essere conservati costantemente, se possibile, a 2-8°C prima dell'uso. Se non vengono utilizzati immediatamente dopo l'arrivo (entro 3 giorni), si raccomanda di conservarli a -20°C o a temperature inferiori. I campioni congelati devono essere riportati lentamente a temperatura ambiente.

#### 9.4.1 Pesata del campione e sospensione

Pesare esattamente 100 mg di campione fecale in una provetta etichettata, e poi aggiungere con una pipetta esattamente 5 ml di tampone di estrazione diluito (diluizione 1:50).

In alternativa, è possibile pesare 80-130 mg di feci e sospenderle in un corrispondentemente volume ridotto o aumentato (vedi tab. 1) di tampone di estrazione diluito (per assicurarsi che il rapporto di diluizione (1:50) sia mantenuto costante).

Tab. 1: dati sulle quantità necessarie di tampone di estrazione diluito a seconda della quantità di campione fecale utilizzato

Peso (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

Quando si risospende il campione fecale in un volume fisso di 5 ml di tampone di estrazione, il fattore di diluizione variabile deve essere tenuto in considerazione nella valutazione dei risultati (vedi tab. 2).

Tab. 2: Specifica del fattore di diluizione in funzione ad un volume fisso di tampone di estrazione diluito (5 ml), a seconda della quantità di feci pesata

Peso (mg)	Fattore di diluizione (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 deve essere omogeneizzata accuratamente miscelando in un vortex, indipendentemente dal metodo utilizzato per pesare il campione. Se le feci sono in forma liquida, con una pipetta prendere esattamente 100 µl e sospenderli in esattamente 5 ml di tampone di estrazione diluito.

Successivamente, i campioni devono essere incubati a temperatura ambiente per 5 minuti e miscelati nuovamente tramite vortex.

La sospensione omogeneizzata deve essere centrifugata a 3000 g per 10 minuti al fine di far sedimentare le particelle fecali più grandi. Il surnatante dell'estratto deve essere ulteriormente diluito per un immediato utilizzo nel saggio.

#### a) Diluizione manuale del campione

Diluire ulteriormente 20 µl di surnatante chiarificato in 980 µl di tampone di diluizione del campione Diluent | 3 (1:50). Successivamente utilizzare 100 µl di campione fecale diluito nel test.

In alternativa, come metodo di preparazione del campione ed omogeneizzazione, può essere utilizzato il kit RIDA<sup>®</sup>TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016; vedi 9.4.2), ovvero provette di raccolta delle feci.

#### b) Diluizione del campione con sistema automatico

Se il test è eseguito con il sistema automatico ELISA DSX<sup>™</sup> (Dynex Technologies, Inc.) è necessario richiedere a R-Biopharm AG il protocollo specifico da utilizzare. Questo sistema esegue in modo automatico la diluizione del campione, come descritto di seguito.

Per prima cosa, 20 µl di surnatante chiarificato vengono pipettati sul fondo dei pozzetti della piastra dal sistema automatico ELISA e poi vengono aggiunti 980 µl di tampone di



diluizione del campione **Diluent 3** (1 :50). Successivamente vengono eseguiti due cicli di miscelazione.

Il numero di pozzetti necessari per l'analisi viene poi inserito nel supporto della micropiastra **Plate** del kit RIDASCREEN® Calprotectin.

Aliquote da 100 µl del campione diluito sono successivamente rimosse dal fondo dei pozzetti e trasferite nella micropiastra **Plate** del kit RIDASCREEN® Calprotectin (diluizione finale 1:2500).

Per protocolli operativi con altri sistemi ELISA automatici contattare R-Biopharm AG.

#### 9.4.2 Preparazione e sospensione del campione utilizzando le provette di raccolta RIDA®TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016)

Le provette di raccolta RIDA®TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016) possono essere utilizzate per una rapida e semplice procedura di preparazione e sospensione del campione in alternativa a quella indicata nel paragrafo 9.4.1, che richiede la pesata dei campioni fecali. Queste provette, che sono fornite come accessori a parte rispetto al kit RIDASCREEN® Calprotectin, semplificano notevolmente la preparazione del campione.

Ciascuna provetta di raccolta RIDA®TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016) è pre-riempita con 2,5 ml di tampone di estrazione pronto all'uso e può contenere un campione fecale da 10 mg. Quando si devono analizzare campioni fecali liquidi, 10 ml di campione possono essere misurati utilizzando la pipetta ed aggiunti direttamente nel tampone di estrazione.

La raccolta del campione e la procedura di estrazione è descritta in dettaglio nel foglietto di istruzioni, che è contenuto in ogni confezione del kit RIDA®TUBE Calprotectin può essere scaricato dal sito [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Gli estratti fecali non devono essere conservati ma devono essere analizzati subito dopo la diluizione.

##### a) diluizione manuale del campione

Diluire 100 µl della sospensione fecale ottenuta utilizzando RIDA®TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016) - come descritto nella sezione 8 delle istruzioni del kit GZ3016 – in 900 µl del tampone di diluizione del kit **Diluent 3**.

Utilizzare 100 µl di questa diluizione finale direttamente nel saggio.

## b) diluizione automatica del campione

Se il test deve essere eseguito con il sistema ELISA automatico DSX™ (Dynerx Technologies, Inc.), è necessario richiedere il protocollo specifico a R-Biopharm AG.

Il numero di pozzetti necessari per l'analisi devono essere inseriti nel supporto della micropiastra **Plate** del kit RIDASCREEN® Calprotectin.

Quando si utilizza il sistema automatico ELISA, la sospensione fecale estratta con le provette di raccolta RIDA®TUBE Calprotectin viene automaticamente diluita 1:10 (diluizione finale: 1:2500) sulla micropiastra **Plate**.

Per questo scopo, 10 µl della sospensione fecale vengono pipettati dalle provette di raccolta RIDA®TUBE Calprotectin (Art. No. GZ3016) nella piastra del kit RIDASCREEN® Calprotectin e diluiti con 90 µl di tampone di diluizione del campione **Diluent | 3**.

Per protocolli operativi con altri sistemi ELISA automatici contattare R-Biopharm AG.

## 9.5. Prima incubazione

Dopo aver posizionato un numero sufficiente di pozzetti nel supporto, aggiungere 100 µl di calibratore **Calibrator** (procedura di calibrazione a 1 punto, si consiglia in doppio) **oppure** 100 µl di **Standard** da 1 a 5 (procedura con la curva di calibrazione standard, ognuno si consiglia in doppio), di tampone di diluizione del campione **Diluent | 3** (= controllo negativo), di controllo positivo **Control | +** e delle sospensioni fecali da analizzare nei pozzetti corrispondenti. Se utilizzato, aggiungere anche 100 µl del basso controllo positivo **Low control | +** nei pozzetti corrispondenti. Incubare successivamente la piastra a temperatura ambiente (20-25°C) per 1 ora.

## 9.6. Primo lavaggio

Per ottenere risultati corretti è necessario eseguire un accurato lavaggio, che deve pertanto essere eseguito rispettando rigorosamente le istruzioni per l'uso. I reagenti incubati nei pozzetti devono essere eliminati in un contenitore per rifiuti contenente una soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Picchiettare vigorosamente la micropiastra capovolta su carta assorbente per garantire la completa rimozione del liquido dai pozzetti. Successivamente, lavare la piastra 5 volte utilizzando 300 µl di tampone di lavaggio diluito ogni volta (vedi 9.2). Picchiettare vigorosamente la micropiastra capovolta su carta assorbente per garantire la completa rimozione del liquido dai pozzetti.

**Quando si utilizza un lavatore per micropiastre, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata al tipo di micropiastra utilizzata. Inoltre, una sospensione fecale che non è completamente priva di particelle prima della fase di lavaggio deve essere rimossa manualmente mediante centrifugazione al fine di evitare il blocco degli aghi di lavaggio. Assicurarsi inoltre che tutto il liquido venga aspirato durante ogni fase di lavaggio. Dopo l'ultima fase di lavaggio, picchiettare vigorosamente la**

**micropiastra capovolta su carta assorbente per garantire la completa rimozione del liquido dai pozzetti.**

#### 9.7. Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato **Conjugate** in ogni pozzetto. Incubare la piastra a temperatura ambiente (20-25 °C) per 1 ora.

#### 9.8. Secondo lavaggio

I reagenti incubati nei pozzetti devono essere eliminati in un contenitore per rifiuti contenente una soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Picchiettare vigorosamente la micropiastra capovolta su carta assorbente per garantire la completa rimozione del liquido dai pozzetti. Successivamente, lavare la piastra 5 volte utilizzando 300 µl di tampone di lavaggio diluito ogni volta. Picchiettare vigorosamente la micropiastra capovolta su carta assorbente per garantire la completa rimozione del liquido dai pozzetti.

#### 9.9. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **SeroSC** in ogni pozzetto. Incubare la piastra a temperatura ambiente (20-25°C) al buio per 15 minuti. Successivamente, fermare la reazione aggiungendo 50 µl della soluzione di stop **Stop** in ogni pozzetto.

Dopo avere mescolato accuratamente (scuotendo leggermente il lato della piastra) misurare l'assorbanza a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento ≥ 620 nm) mediante lettore per micropiastre.

Attenzione: i campioni altamente positivi possono indurre la precipitazione nera del substrato. Questi campioni devono essere ulteriormente diluiti 1:10 (diluizione finale del campione fecale: 1:25000) ed analizzati nuovamente.

### 10. Controllo della qualità - Segni di scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità utilizzare il calibratore **Calibrator** (per la procedura di calibrazione ad 1 punto, si consiglia in doppio) oppure ciascuno standard da 1 a 5 **Standard 1** – **Standard 5** (per la calibrazione con la curva standard, si consiglia in doppio) ed il tampone di diluizione del campione **Diluent | 3** come controllo negativo ed il controllo positivo **Control | +** ad ogni esecuzione del test.

Il test è stato eseguito correttamente quando il valore di estinzione (O.D.) del controllo negativo a 450nm-620nm è inferiore a 0.05 e il valore misurato del calibratore **Calibrator** (per la procedura di calibrazione ad un punto) è all'interno dell' intervallo specifico del lotto, indicato nella scheda allegata al kit. Il controllo positivo deve essere all'interno dell' intervallo di concentrazione specifico del lotto che è riportato sulla scheda tecnica.

Se si esegue il test RIDASCREEN® Calprotectin con un processatore ELISA, il valore di OD misurato per il calibratore **Calibrator** (per la procedura di calibrazione ad un punto) può

essere diverso dal valore fornito, specifico di un determinato lotto, in base allo strumento utilizzato. Pertanto, il controllo positivo è decisivo per la validità dei risultati e deve essere sempre eseguito quando si effettua l'analisi con un processore ELISA. L'utilizzo del basso controllo positivo Low control | + non è necessario.

Una discordanza rispetto ai valori richiesti può manifestarsi, come segno di scadenza dei reagenti, con l'opacizzazione o con la colorazione blu del substrato incolore prima dell'aggiunta nei pozzetti. In caso di non conformità con i valori indicati, prima della ripetizione del test verificare quanto segue:

- periodo di conservazione dei reagenti utilizzati
- funzionalità dei dispositivi utilizzati (ad es. calibratura)
- corretta esecuzione del test
- controllo visivo dei componenti del kit per contaminazione o mancanza di ermeticità; non utilizzare una soluzione di substrato di colore blu.

In caso di non conformità con tali condizioni dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al distributore locale R-Biopharm AG.

## **11. Valutazione ed interpretazione**

La concentrazione di calprotectina in mg/kg di feci è determinata con il kit RIDASCREEN® Calprotectin mediante la procedura di calibrazione ad un punto (vedi 11.1) secondo il modello logistic-log a 4 parametri (4PL) oppure mediante la procedura della curva standard (vedi 11.2).

Il software di valutazione RIDA®SOFT Win.net è necessario per la determinazione dei risultati. Il software RIDA®SOFT Win.net oppure l'aggiornamento possono essere richiesti direttamente a R-Biopharm AG o al distributore locale R-Biopharm.

In alternativa a RIDA®SOFT Win.net è possibile utilizzare un altro software che fornisce il modello logistic-log a 4 parametri.

### **11.1 Quantificazione mediante la calibrazione ad 1 punto (modello logistic-log a 4 parametri)**

I parametri (A - D) della curva standard richiesta per il calcolo a 4PL e il valore di riferimento del calibratore, del controllo positivo e del basso controllo positivo sono elencati nella scheda tecnica fornita con il kit in base al lotto specifico e devono essere confrontati con i valori del software di valutazione prima di ogni misurazione utilizzando le informazioni corrispondenti contenute sulla scheda.

R-Biopharm AG ha determinato la curva standard (compresi i parametri A - D), nonché il valore di riferimento e l'intervallo consentito del calibratore, del controllo positivo e del basso controllo positivo in condizioni ottimali per ciascun lotto nel controllo di qualità finale.

Il calibratore viene testato nella routine al fine di compensare le fluttuazioni dell'analisi e controllare la qualità di ogni prova. Il controllo positivo è determinante per la validità dei risultati dei test.

Un fattore di correzione F viene calcolato internamente dal RIDA®SOFT Win.net dal valore medio della doppia determinazione del calibratore e dal suo valore di riferimento e si riconcilia con l'assorbanza per i campioni fecali. Una valutazione sicura ed affidabile dei risultati del test può essere eseguita entro i limiti della curva standard.

### 11.2 Quantificazione mediante la procedura della curva standard

La valutazione del kit RIDASCREEN® Calprotectin può essere eseguita con la curva standard, che deve essere elaborata durante l'esecuzione del test. Per un esempio di andamento corretto della curva standard se prega di far riferimento alla scheda specifica del lotto ricevuto.

Nel controllo qualità finale, R-Biopharm AG ha determinato i valori di riferimento e l'intervallo consentito di concentrazione per il controllo positivo e il basso controllo positivo per ciascun lotto in condizioni ottimali. Nelle quantificazioni mediante la procedura della curva standard il controllo positivo è determinante per la validità dei risultati del test. L'intervallo predefinito di concentrazione per il controllo positivo deve essere raggiunto.

### 11.3. Risultati del test

Per un valore di cut-off > 50 mg calprotectina/ kg feci, il risultato deve essere considerato positivo. Se i risultati si trovano al di sotto del cut-off, i campioni devono essere considerati negativi. Il valore di cut-off suggerito per gli adulti (50 mg/kg) può anche essere utilizzato per bambini dai 4 ai 17 anni.

Si consiglia di stabilire un intervallo separato del valore standard per ciascun laboratorio.

**Si consiglia di diluire ulteriormente (1:5 in Diluente 3) i campioni che alla valutazione sono risultati con una calibrazione superiore a 1 punto o con concentrazioni di calprotectina nella curva standard superiori a 600 mg/kg e di eseguire nuovamente un test di misurazione.**

**Si consiglia inoltre di diluire ulteriormente (1:5 in Diluente 3) i campioni che alla valutazione sono risultati con una calibrazione superiore a 1 punto o con valori superiori a 3,0 e di eseguire nuovamente un test di misurazione.**

## 12. Limiti del metodo

RIDASCREEN® Calprotectin rileva gli epitopi di calprotectina umana in campioni di feci. La diagnosi non deve essere fatta solo sulla determinazione della concentrazione della calprotectina ma dovrebbe prendere in considerazione anche la storia clinica e i sintomi.

## 13. Caratteristiche delle prestazioni

### 13.1. Precisione

#### 13.1.1 Riproducibilità intra-analisi

La riproducibilità intra-analisi è stata determinata in un'unica seduta di analisi utilizzando 4 campioni di feci in 40 repliche ciascuno. Dai valori di OD di queste misurazioni sono state determinate le concentrazioni di calprotectina. Il valore medio (MV), la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV) sono stati calcolati per ciascun campione. I risultati sono elencati nella Tabella 3.

Tab. 3: Riproducibilità intra-analisi del kit RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Referenza A	53.8	2.9	<b>5.4</b>	56.6	3.0	<b>5.3</b>
Referenza B	96.6	5.5	<b>5.7</b>	102.4	6.3	<b>6.2</b>
Referenza C	136.5	5.6	<b>4.1</b>	130.5	5.2	<b>4.0</b>
Referenza D	246.7	14.1	<b>5.7</b>	267.6	15.0	<b>5.6</b>

#### 13.1.2 Riproducibilità inter-analisi

La riproducibilità inter-analisi è stata determinata in doppio in 20 sedute ( 2 corse al giorno) utilizzando 4 campioni di feci da parte di tre tecnici. Dai valori OD di questi misurazioni sono state determinate le concentrazioni di Calprotectina. Il valore medio (MV), la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV) sono stati calcolati per ogni campione. I risultati sono elencati nella Tabella 4.

Tab. 4: Riproducibilità inter-analisi del kit RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Referenza A	55.7	4.3	<b>7.7</b>	57.5	4.1	<b>7.1</b>
Referenza B	106.5	7.2	<b>6.8</b>	112.8	8.3	<b>7.3</b>
Referenza C	129.6	7.8	<b>6.0</b>	138.5	7.6	<b>5.5</b>
Referenza D	260.9	28.3	<b>10.9</b>	284.7	22.7	<b>8.0</b>

### 13.2. Precisione di estrazione

La precisione di estrazione è stata determinata in duplicato in 10 prove (5 giorni, 2 analisi al giorno) in giorni diversi e da due tecnici con 3 campioni fecali (concentrazioni > 50 mg / kg). I campioni sono stati estratti prima di ogni seduta e diluiti come richiesto. Dai valori di OD di queste misurazioni sono state determinate le concentrazioni di calprotectina. Il valore medio (MV), la deviazione standard (SD) ed il coefficiente di variazione (CV) sono stati calcolati per ogni campione. I risultati sono elencati nella Tabella 5.

Tab. 5: Precisione di estrazione

	Calibratore			Curva standard		
	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)	MV (mg/kg)	SD (mg/kg)	CV (%)
Referenza A	64.0	5.0	<b>7.9</b>	67.4	5.0	<b>7.5</b>
Referenza B	114.1	10.3	<b>9.0</b>	123.2	10.7	<b>8.7</b>
Referenza C	264.0	33.3	<b>12.6</b>	284.8	22.1	<b>7.8</b>

## 14. Letteratura

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 Crohn's 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