
CERTEST Calprotectin 50+200

ONE STEP Calprotectin 50+200
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.





CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest Calprotectin one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay (cut-off qualitative test) for the simultaneous qualitative determination of human calprotectin (hCp) in stool samples, to the following cut-off values: A: 50µg/g faeces and B: 200µg/g faeces.

CerTest Calprotectin 50+200 combo card test offers a simple, a highly sensitive and non-invasive screening assay to determine inflammatory disease, to monitor treatment response in these patients, to predict risk of relapse and to monitor small bowel transplantation or graft rejection.

INTRODUCTION

Calprotectin is a neutrophil cytosolic protein with antimicrobial properties, which is present at increased concentration in stool samples during bowel inflammation. The stability of the protein to degradation keeps it stable in faeces for up to 7 days at room temperature, making it an ideal analyte. Calprotectin is released by activation of leukocytes, giving increased levels in plasma, cerebral spinal fluid, synovial fluid, urine or stools as a consequence of disease in the relevant organ(s). Calprotectin inhibits zinc-dependent enzyme systems, as a result kills microbes and induces apoptosis in normal and cancer cells. In the presence of calcium, calprotectin is a remarkably resistant to proteolytic degradation, and so is stable in stools kept at room temperature for 7 days.

This is a non-invasive marker of intestinal inflammation (for example in Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD)).

PRINCIPLE OF THE TEST

CerTest Calprotectin 50+200 is based on the principle of a cut-off qualitative immunochromatographic assay for the determination of human calprotectin in stool samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against human calprotectin and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-human calprotectin) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against human calprotectin and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-human calprotectin) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is human calprotectin positive (concentration $\geq 50\mu\text{g/g}$), the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugates complex (anti-human calprotectin monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is human calprotectin positive (concentration $\geq 200\mu\text{g/g}$), the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugated complex (anti-human calprotectin monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane, by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-human calprotectin antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-human calprotectin antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no human calprotectin presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the cut off value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-human calprotectin antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.



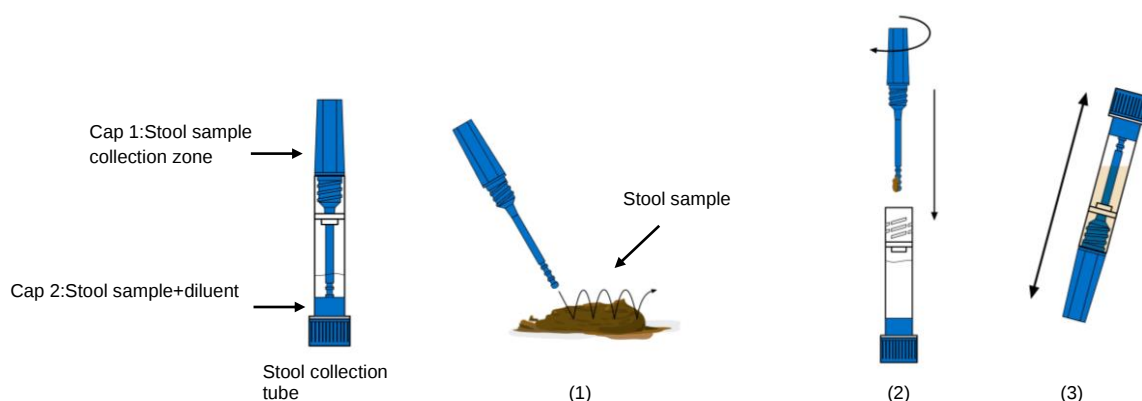
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest Calprotectin 50+200 test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 7 days prior to testing. For longer storage, maximum 6 months, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap 1 of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (1); making sure that, in each insertion, the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of stool. Then, introduce the sample in the stool collection tube (2). For liquid samples, add approx. 20µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample (2). Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3). The stool collection tube with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest Calprotectin 50+200 combo card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

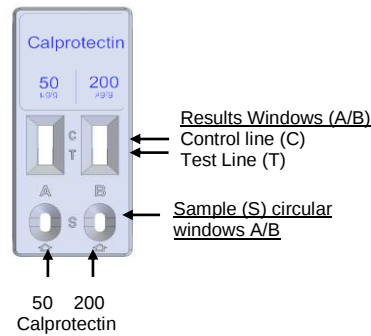
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove the CerTest Calprotectin 50+200 combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, open the cap 2 (4) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 3 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of extraction buffer until seeing the liquid running through the reaction zone.

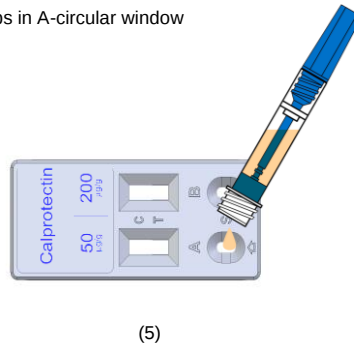
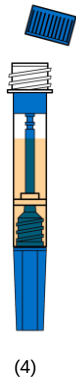
CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
 Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette



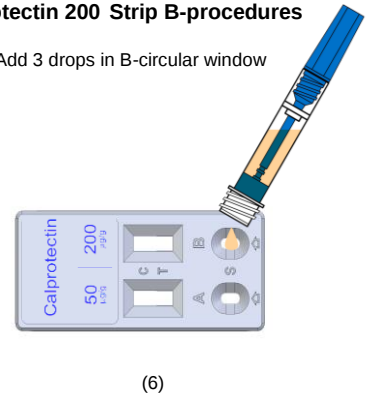
Calprotectin 50 Strip A-procedures

Add 3 drops in A-circular window

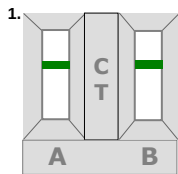


Calprotectin 200 Strip B-procedures

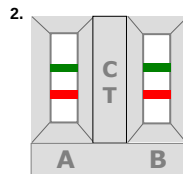
Add 3 drops in B-circular window



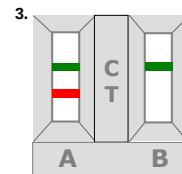
INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)



A: Green → Negative Calprotectin 50
 B: Green → Negative Calprotectin 200

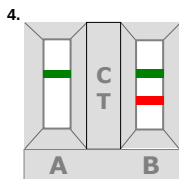


A: Green-Red → Positive Calprotectin 50
 B: Green-Red → Positive Calprotectin 200

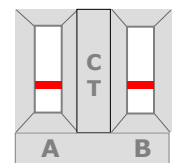
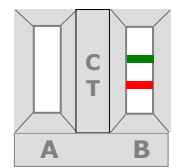
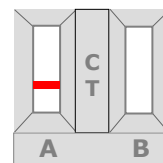
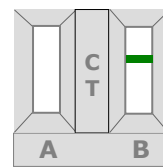
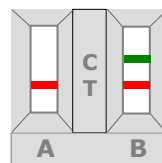
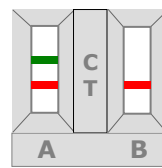
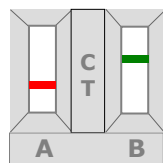
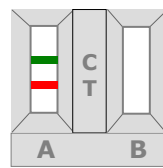
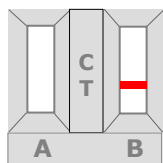
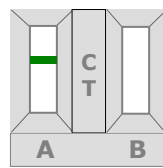
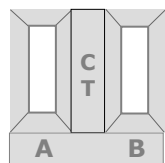
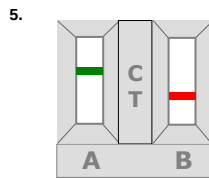


A: Green-Red → Positive Calprotectin 50
 B: Green → Negative Calprotectin 200

INVALID RESULTS



A: Green → Negative Calprotectin 50
 B: Green-Red → Positive Calprotectin 200



CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette

	A (Calprotectin 50 (concentration ≥ 50µg/g))	B (Calprotectin 200 (concentration ≥ 200µg/g))	Interpretation of the results
1.	-	-	Calprotectin marker is not present in patient sample (<50µg/g), which might mean neither active gastrointestinal inflammation, nor risk of relapse (CD or UC relapse), nor graft or transplantation rejection.
	GREEN	GREEN	
2.	+	+	High quantity of calprotectin marker (≥200µg/g) is present in patient sample, which might mean active gastrointestinal inflammation, risk of relapse in clinical remission, graft rejection or transplantation rejection.
	GREEN-RED	GREEN-RED	
3.	+	-	Calprotectin marker is present in patient sample (≥50µg/g and <200µg/g), which might mean active gastrointestinal inflammation.
	GREEN-RED	GREEN	
4.	-	+	Invalid result. If B is positive, A has to be also positive.
	GREEN	GREEN-RED	
5.	Any other result	Any other result	Invalid result, either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the tests lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay using a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of human calprotectin present in the specimen.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening of the sealed bag.
2. An excess of stool sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high human calprotectin concentration to faint when the human calprotectin concentration is close to cut-off value of the test.
4. CerTest Calprotectin 50+200 should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of human calprotectin in faecal samples; nevertheless, it can be due to several causes (Inflammatory Bowel Disease, colorectal cancer and some other enteropathies). A positive result should be followed up with additional diagnostic invasive procedures, colonoscopy and biopsy in order to confirm the diagnosis and to establish the inflammation extent.
6. A negative result is not meaningful because of it is possible the human calprotectin concentration in the stool sample is lower than the cut-off values. If symptoms or situation still persist, calprotectin determination should be carried out invasive techniques. Negative results do not exclude inflammation, some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps that mainly involve mononuclear inflammation.
7. Stool samples from patients with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) treatment might show positive result.
8. Neonatal faecal calprotectin levels have been reported higher than those in normal children with a mean of 167µg/g (range 22-860µg/g).
9. Stool from patients with active inflammatory bowel disease that usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, would be positive for faecal calprotectin. CerTest Calprotectin 50+200 could be sensitive for this diagnosis in patients with chronic diarrhoea.
10. Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
11. Mucous stool samples may cause non-specific reactions in the test. Every mucous stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.



CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette

EXPECTED VALUES

Some studies established equal or higher 50µg hCp/g faeces as cut-off value to allow detect adult patients with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

The clinical course of inflammatory bowel disease is characterized by a succession of relapses and remissions. Some studies established equal or higher 200µg hCp/g faeces as cut-off value to allow predict clinical relapse of disease activity in patients with Ulcerative Colitis and in Crohn's Disease and detect some neonatal patients (higher levels than normal children) with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

Faecal calprotectin level evolution in individuals showed that faecal calprotectin level can predict rejection days before histopathological diagnosis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Cut-off values of CerTest Calprotectin 50+200 are 500ng/mL (50µg hCp/g faeces) for strip A and 2000ng/mL (200µg hCp/g faeces) for strip B.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest Calprotectin 50+200, CerTest) and another commercial immunoassay (Calprest®, Eurospital). The results were as follows:

		ELISA test: Calprest®		
		+	-	Total
IC test: CerTest Calprotectin 50+200	+	34	2	36
	-	2	26	28
	Total	36	28	64

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest Calprotectin 50+200 vs ELISA test: Calprest®	>94%	93%	>94%	93%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect human calprotectin using CerTest Calprotectin 50+200.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest Calprotectin 50+200; no cross reactivity against other gastrointestinal pathogens, other organism, substances and/or faecal markers occasionally present in faeces:

Adenovirus	Clostridium perfringens	Human Lactoferrin	Salmonella typhi
Astrovirus	Cryptosporidium	Human Transferrin	Salmonella typhimurium
Bovine Haemoglobin	Entamoeba dispar	Legionella pneumophila	Shigella boydii
Bovine Lactoferrin	Entamoeba histolytica	Listeria monocytogenes	Shigella dysenteriae
Bovine Transferrin	Escherichia coli O111	Norovirus GI	Shigella flexneri
Campylobacter coli	Escherichia coli O26	Norovirus GII	Shigella sonnei
Campylobacter jejuni	Escherichia coli O157	Pig Haemoglobin	Streptococcus pneumococcal
Clostridium difficile antigen GDH	Giardia	Rotavirus	Streptococcus pyogenes
Clostridium difficile Toxin A	Helicobacter pylori	Salmonella enteritidis	Yersinia Enterocolitica O:3
Clostridium difficile Toxin B	Human Haemoglobin	Salmonella paratyphi A	Yersinia Enterocolitica O:9



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest Calprotectin 50+200 combo card es una prueba inmunocromatográfica (test cualitativo de cut-off) de un solo paso para la determinación cualitativa de calprotectina humana (hCp) en muestras de heces, presentando unos valores de cut-off para A: 50µg/g heces y para B: 200µg/g heces.

CerTest Calprotectin 50+200 combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo, de alta sensibilidad y no invasivo para detectar una posible actividad inflamatoria intestinal, como control de la respuesta a un tratamiento, para detectar posibles recaídas y como control de posibles rechazos tras injertos o transplantes del intestino delgado.

INTRODUCCIÓN

La calprotectina es una proteína del citosol de los neutrófilos con propiedades antimicrobianas, que se encuentra presente en las heces en una concentración muy elevada durante la inflamación intestinal. La proteína una vez liberada hasta su degradación se mantiene estable a temperatura ambiente durante 7 días en las heces, siendo por ello un analito ideal. La calprotectina se libera por activación de los leucocitos, lo que conlleva un aumento de su nivel en plasma, en líquido cerebro-espinal, en líquido sinovial, en orina y heces como consecuencia de una enfermedad asociada al órgano u órganos correspondientes. Esta proteína inhibe el sistema enzimático dependiente del zinc, ocasionando con ello la muerte de ciertos microbios e induciendo la apoptosis de células sanas y cancerígenas. La calprotectina en presencia de calcio es extremadamente resistente a la degradación proteolítica (proteólisis), y por ello es tan estable en las heces almacenadas a temperatura ambiente durante 7 días.

Este es un marcador no invasivo de la inflamación intestinal (por ejemplo, en la colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD)).

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest Calprotectin 50+200 combo card es una prueba cualitativa de cut-off, inmunocromatográfica para la determinación de calprotectina humana en muestras de heces.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a calprotectina humana en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a calprotectina humana) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a calprotectina humana en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a calprotectina humana) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es calprotectina humana positiva (concentración $\geq 50\mu\text{g/g}$), los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-calprotectina humana microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es calprotectina positiva (concentración $\geq 200\mu\text{g/g}$), los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-calprotectina humana microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-calprotectina humana presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-calprotectina humana presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de calprotectina humana o los antígenos están presentes en una concentración inferior al valor de cut-off y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-calprotectina humana presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30° C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

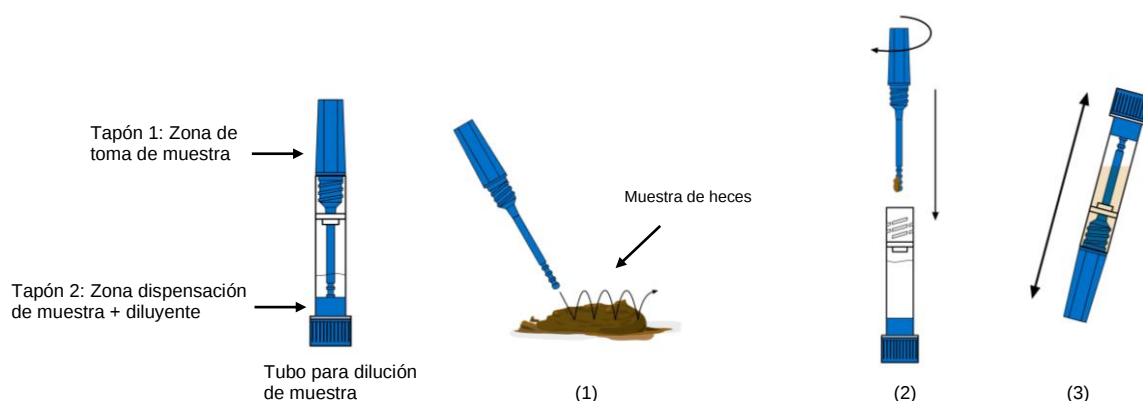
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest Calprotectin 50+200 test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- La presencia de líneas amarillentas en la ventana de resultados (zona línea de control y zona línea de test), antes de utilizar el test, es completamente normal y no supone fallo de funcionalidad del test.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), máximo durante 7 días hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tapón 1 del tubo para dilución de muestra y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se debe introducir el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (1), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces. A continuación, introducir la muestra en el tubo para dilución de muestra (2). Para muestras líquidas, añadir aprox. 20µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente (2). Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3). Este tubo que contiene la muestra diluida puede conservarse en frío (2-8°C) durante 7 días antes de realizar la prueba.



CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest Calprotectin 50+200 combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos de dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

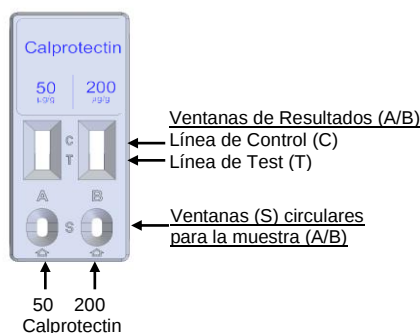
- Recipiente para la recogida de la muestra
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

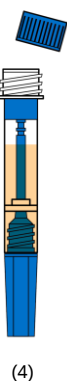
Previamente los test, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo de dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest Calprotectin 50+200 de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo de dilución de muestra, abrir el tapón 2 (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y añadir 3 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

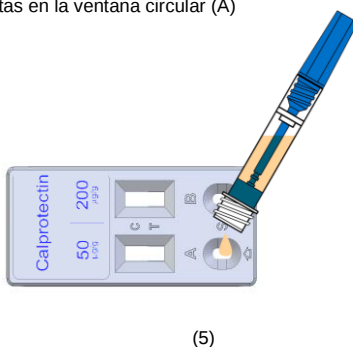
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Procedimiento para la tira A de Calprotectin 50

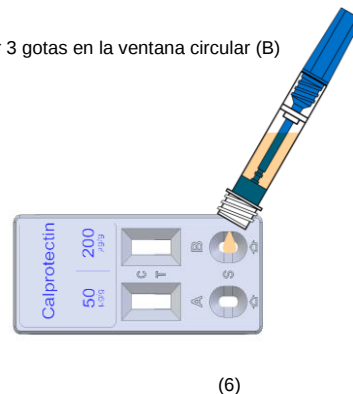


Añadir 3 gotas en la ventana circular (A)

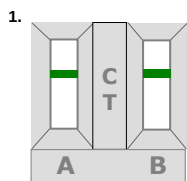


Procedimiento para la tira B de Calprotectin 200

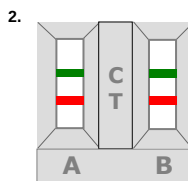
Añadir 3 gotas en la ventana circular (B)



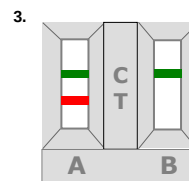
INTERPRETATION OF RESULTS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



A: Verde→Negativo Calprotectin 50
B: Verde→Negativo Calprotectin 200

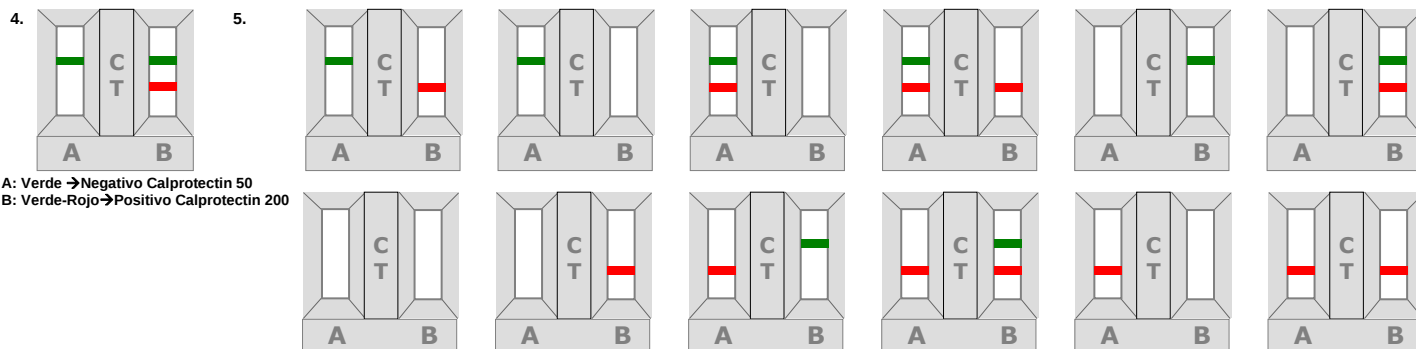


A: Verde→Negativo Calprotectin 50
B: Verde→Positivo Calprotectin 200



A: Verde→Positivo Calprotectin 50
B: Verde→Negativo Calprotectin 200

RESULTADOS INVÁLIDOS



A: Verde → Negativo Calprotectin 50
B: Verde-Rojo → Positivo Calprotectin 200

	A (Calprotectin 50 (concentration ≥ 50µg/g))	B (Calprotectin 200 (concentration ≥ 200µg/g))	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No existe presencia de calprotectina humana en la muestra (o en concentración <50µg/g), puede significar que no hay inflamación gastrointestinal activa, ni riesgo de recidiva (de CD o UC), ni rechazo del injerto o del trasplante.
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Cierta cantidad del marcador calprotectina humana (≥200µg/g) está presente en la muestra del paciente: podría significar que hay una inflamación gastrointestinal activa, o un riesgo de recidiva en la recuperación, o un rechazo del injerto o del trasplante.
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	El marcador calprotectina está presente en la muestra del paciente (≥50µg/g y <200µg/g), podría significar una inflamación gastrointestinal activa.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Resultado inválido: Si B es positivo, A tiene que ser positivo también.
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido, en A o en B, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persistiesen, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en la zona de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de calprotectina humana presente en la muestra.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- Una vez abierto el envase, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de calprotectina humana a débil cuando la concentración de calprotectina humana está cerca del valor de cut-off del test.
- CerTest Calprotectin 50+200 debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- Los resultados positivos determinan la presencia de calprotectina humana en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, cáncer colorrectal y algunas enteropatías). Un resultado positivo debería ser contrastado

con otras técnicas invasivas diagnósticas: la endoscopia y la biopsia son los métodos más adecuados para detectar y cuantificar la inflamación en el intestino.

6. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de calprotectina humana en la muestra de heces sea inferior a los valores de cut-off. Si los síntomas o la situación persisten, una determinación de calprotectina humana, se debería repetir la prueba con técnicas invasivas. Los resultados negativos no excluyen de la presencia de inflamación, algunas enfermedades como la enfermedad celiaca y los pólipos microscópicos de colitis pueden presentar una inflamación mononuclear.
7. Heces de pacientes que sigan un tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) podrían dar resultados positivos.
8. Se han descrito niveles más elevados de calprotectina fecal en neonatos comparado con los niveles normales en niños. Nivel medio de 167µg/g (en un rango entre 22-860µg/g).
9. Las muestras de heces de pacientes que presenten la enfermedad inflamatoria intestinal que normalmente lleva asociada una inflamación neutrofílica del intestino, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, deberían dar resultados positivos para calprotectina fecal. CerTest Calprotectin 50+200 puede ser sensible para el diagnóstico en pacientes con diarrea crónica.
10. Las muestras de heces sanguinolentas contienen componentes de la sangre. Estos componentes podrían causar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra sanguinolenta cuyo resultado es positivo debe confirmarse con otras técnicas.
11. Muestra de heces mucosas podrían provocar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra de heces mucosas cuyo resultado sea positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para confirmar el resultado.

VALORES ESPERADOS

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de calprotectina humana sea igual o superior a 50µg hCp/g en heces, para permitir detectar pacientes adultos con una patología inflamatoria gastrointestinal los cuales requerirán para su diagnóstico procedimientos adicionales invasivos.

El curso clínico de la enfermedad inflamatoria intestinal se caracteriza por una sucesión de recaídas y remisiones. Algunos estudios establecieron un valor de cut-off igual o superior a 200µg hCp/g de heces como valor de corte para permitir predecir la recaída clínica de la actividad de la enfermedad en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn y, también para detectar algunos pacientes neonatos (niveles más altos que los niños normales), con patología gastrointestinal inflamatoria que son requeridos para el diagnóstico adicional de otros procedimientos diagnósticos invasivos.

El nivel de calprotectina fecal en pacientes con enfermedades intestinales mostró que el nivel de calprotectina fecal puede predecir las recaídas incluso días antes del diagnóstico histopatológico.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica

Los valores de cut-off de CerTest Calprotectin 50+200 son 500ng/mL (50µg/g heces) para la tira A y 2000ng/mL (200µg/g heces) para la tira B.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevo a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest Calprotectin 50+200, CerTest) y otro inmunoensayo del mercado (Calprest®, Eurospital). Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest Calprotectin 50+200		ELISA test: Calprest®		
		+	-	Total
	+	34	2	36
	-	2	26	28
Total		36	28	64

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VNP
CerTest Calprotectin 50+200 vs ELISA test: Calprest®	>94%	93%	>94%	93%

Los resultados mostraron que CerTest Calprotectin 50+200 presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar calprotectina humana.



CERTEST Calprotectin 50+200

One step test to detect human calprotectin (50 µg/g and 200 µg/g) in card format/
Prueba de un solo paso para detección de calprotectina humana (50 µg/g y 200 µg/g) en formato cassette

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas del test CerTest Calprotectin 50+200; no se detectó reacción cruzada con otros patógenos gastrointestinales, otros organismos, sustancias y/o marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Lactoferrina humana</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli O111</i>	<i>Legionella pneumoniae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli O26</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli O157</i>	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile antigen GDH</i>	<i>Giardia</i>	<i>Norovirus GII</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile Toxin A</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile Toxin B</i>	<i>Hemoglobina bovina</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Transferrina bovina</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Hemoglobina de cerdo</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Transferrina humana</i>
<i>Cryptosporidium</i>	<i>Hemoglobina humana</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica O:3</i>
<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Lactoferrina bovina</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia Enterocolitica O:9</i>



REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta* 381 Feb 2007, p. 63-68
2. Quail, M.A. et al. Fecal Calprotectin Complements Routine Laboratory Investigations in Diagnosing Childhood Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, Vol 15 No 5; May 2009, p. 756-759
3. Gaya D.R., et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *Q J Med* 2005, Vol 98, May 2005, p. 435-441.
4. Langhorst, M.D. et al. Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices. *Am. J. Gastroenterol.* 2008; Vol 103, p. 162-169.
5. Tibble JA., et al., "Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease". *Gastroenterology*, Vol 119 (1), Jul 2000, p. 15-22.
6. Gisbert J.P. et al. "Utilidad de la calprotectina y lactoferrina fecal en la predicción de la recidiva de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)". *Gastroenterología y Hepatología*, Vol. 32, Issue 3, March 2009, p. 226-227.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

 IVD	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	 LOT	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		DIL Sample diluent Diluyente de muestra	 REF	Catalogue number Número de referencia
	Do not re-use No reutilizar		CE marking/ Marcado CE						



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es



F-368 rev00