

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico per la rilevazione rapida e semiquantitativa della calprotectina in campioni di feci umane

Esclusivamente per uso diagnostico professionale in vitro.

SOMMARIO e CONSIDERAZIONI CLINICHE

La *Calprotectina*, descritta inizialmente nel 1980¹, è una proteina presente nel citosol dei granulociti neutrofili e nei macrofagi e, chimicamente, è costituita da 2 subunità (S100A8 e S100A9).

Viene rilasciata all'esterno della cellula in risposta a situazioni di stress o danno cellulare e può essere rilevata in campioni di feci umane, rappresentando un sensibile marcatore di infiammazione intestinale.

Risulta stabile in campioni di feci fino a 7 giorni dopo l'emissione, anche a temperatura ambiente e si presenta distribuita uniformemente nel campione², proprietà che la rende idonea ad essere testata in campioni "spot" di feci.

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI i.e. *IBD, inflammatory bowel diseases*)³, la malattia di Crohn⁴ e la colite ulcerosa sono patologie recidive croniche e disturbi remissivi. La diagnosi, insieme alla valutazione dello stato di attività della malattia e della prognosi, si presentano particolarmente complesse per la gestione clinica del paziente: i biomarcatori fecali, quali la calprotectina fecale, sono analiti determinabili con metodiche non invasive e, pertanto, possono essere di ausilio diagnostico in tali situazioni. La calprotectina fecale si è rivelata particolarmente utile nella diagnosi di *IBD*, correlando con lo stato di attività della patologia e potendo fornire un ausilio nel predire una risposta al trattamento terapeutico o una ricaduta. Con sempre maggiori evidenze di notevole utilità diagnostica nella determinazione della calprotectina, negli ultimi decenni questo biomarcatore fecale ha cambiato in modo significativo il modo di gestire clinicamente le *IBD*⁵.

PRINCIPIO DEL METODO

Calprotectin Semi-Quantitative Rapid Test è un immunodosaggio semiquantitativo rapido su card in grado di rilevare la presenza di calprotectina attraverso l'interpretazione visiva dello sviluppo o meno di linee colorate su membrana immunocromatografica. Anticorpi anti-calprotectina sono immobilizzati nella regione del test (linea T) presente sulla membrana. Durante l'esecuzione dell'analisi il campione reagisce con anticorpi anti-calprotectina coniugati a microparticelle colorate e pre-adese alla membrana nella zona del campione S. La miscela migra cromatograficamente, per azione capillare, lungo la membrana ed interagisce con il sistema di reagenti. Qualora si sviluppi la colorazione in corrispondenza della linea 1 (T1) questo indicherà una concentrazione di calprotectina nel campione inferiore a 15 µg/g. Qualora si sviluppi la colorazione in corrispondenza delle linee 1 e 2 (T1 e T2) questo indicherà una concentrazione di calprotectina nel campione compresa tra 15 e 60 µg/g. Qualora si sviluppi la colorazione in corrispondenza di tutte e tre le linee 1 (T1, T2 e T3) questo indicherà una concentrazione di calprotectina nel campione superiore a 60 µg/g. Come controllo procedurale, una linea colorata compare sempre nella regione del controllo (C) ad indicare che è stato utilizzato un volume di campione appropriato e che si è verificato l'assorbimento da parte della membrana.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI E DEL KIT

- Supporti di reazione (card): contengono particelle rivestite con anticorpi anti-calprotectina coniugati a oro colloidale ed anticorpi anti-calprotectina adesi alla membrana
- Tubi di raccolta del campione contenenti tampone di estrazione
- Manuale d'istruzione

PRECAUZIONI

- Esclusivamente per uso diagnostico professionale *in vitro*. Non utilizzare oltre la data di scadenza.
- I supporti di reazione (card) possono essere estratti dal proprio sacchetto sigillato **SOLO AL MOMENTO DELL'USO**.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui campioni o kit vengono maneggiati.
- Non utilizzare il supporto di reazione qualora il sacchetto risulti danneggiato.
- Manipolare tutti i campioni come contenenti agenti infettivi. Durante l'intera analisi, adottare le precauzioni indicate contro i pericoli microbiologici e attenersi alle procedure standard per un corretto smaltimento dei campioni.
- Durante l'analisi dei campioni, indossare abiti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

- I supporti di reazione (card) e tutto il materiale reagentario usato devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.
- Umidità e temperatura possono esercitare effetti negativi sui risultati.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare all'interno del suo sacchetto sigillato integro a temperatura ambiente o in frigorifero (2-30 °C). Il test è stabile fino alla data di scadenza indicata sul sacchetto sigillato. Il test deve rimanere nel sacchetto sigillato fino al momento dell'utilizzo. **NON CONGELARE**. Non utilizzare oltre la data di scadenza

ATTREZZATURA RICHIESTA (non a corredo)

- Contenitori sterili per coprologia
- Timer

RACCOLTA DEL CAMPIONE e PREPARAZIONE

- I campioni di feci devono essere raccolti negli specifici contenitori per coprologia (quindi non contenenti alcun tipo di liquido)
- **Seguire lo schema riportato in Figura 1**
- Svitare il tappo con asticella del tubo di raccolta del campione e inserire l'asticella in almeno in 3 punti distinti del campione di feci. Raccogliere soltanto quanto rimane adeso all'asticella e reinserirla nel tubo di raccolta del campione.
- Qualora il test non possa essere effettuato entro 24 ore dall' inoculo del campione nel relativo tubo di raccolta, quest'ultimo deve essere conservato a 2-8°C ma non oltre i 7 giorni.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Prima di eseguire l'analisi, riportare la card, il campione ed eventuali controlli a temperatura ambiente (15-30 °C).

1. Raccolta del campione di feci

Raccogliere una quantità di feci adeguata (1-2 ml o 1-2 gr.) nel contenitore sterile per coprocultura. Risultati analitici ottimali si ottengono su campioni raccolti da non oltre 6 ore: qualora ciò fosse impossibile, i campioni nel relativo contenitore possono essere conservati fino a 3 giorni refrigerati a 2-8°C. Per periodi superiori congelare i campioni a -20°C.

2. Analisi dei campioni di feci

Seguire lo schema riportato in Figura 1

- Svitare il tappo con asticella del tubo di raccolta del campione e inserire l'asticella in almeno in 3 punti distinti e casuali del campione di feci in modo da raccogliere circa 50 mg. Di feci (equivalenti approssimativamente a ¼ di pisello). Non scuotere l'asticella nel campione di feci. Reinserire l'asticella nel tubo di raccolta del campione e riavvitare il tappo.
- Agitare vigorosamente il tubo di raccolta per estrarre il campione nel tampone.
- Attendere 2 minuti per completare l'estrazione
- Capovolgere il tubo di raccolta del campione
- Portare il sacchetto sigillato contenente la card a temperatura ambiente prima dell'apertura. Estrarre la card ed utilizzarla al più presto, possibilmente entro un'ora per ottenere risultati ottimali
- Svitare il tappo di dispensazione e trasferire 2 gocce dell'estratto (circa 80 µl) nel pozzetto del campione (S) della card.
- Attendere lo sviluppo delle linee colorate. **I risultati dovrebbero essere registrati dopo 10 minuti dall'inoculo e comunque non oltre i 15 minuti dallo stesso**

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Facendo riferimento allo schema riportato in Figura 2, si potranno ottenere tre tipi di risultati:

POSITIVO: 3 combinazioni possibili

- a) Si sviluppa la colorazione in corrispondenza della linea 1 (T1) ad indicare una concentrazione di calprotectina nel campione inferiore a 15 µg/g.
- b) Si sviluppa la colorazione in corrispondenza delle linee 1 e 2 (T1 e T2) ad indicare una concentrazione di calprotectina nel campione compresa tra 15 e 60 µg/g.
- c) Si sviluppa la colorazione in corrispondenza di tutte e tre le linee 1 (T1, T2 e T3) ad indicare una concentrazione di calprotectina nel campione superiore a 60 µg/g.

Come controllo procedurale, una linea colorata compare sempre nella regione del controllo (C) ad indicare che è stato utilizzato un volume di campione appropriato e che si è verificato l'assorbimento da parte della membrana.

Linea del Test (T)	Risultato semiquantitativo	Interpretazione
Si sviluppa solo T1	Concentrazione della calprotectina inferiore a 15µg/g	Normale, minimo rischio di IBD
Si sviluppano sia T1 che T2	Concentrazione della calprotectina compresa tra 15µg/g-60µg/g	Normale, basso rischio di IBD
Si sviluppano T1, T2 e T3	Concentrazione della calprotectina superiore a 60µg/g	Alto rischio di IBD

NEGATIVO: compare una linea colorata nell'area di controllo (C). Non compare alcuna linea nella regione del test (T): non è presente calprotectina nel campione o il valore di quest'ultima è inferiore a 15µg/g

Linea del Test (T)	Risultato semiquantitativo	Interpretazione
Nessuno sviluppo di linee T	Concentrazione della calprotectina non rilevabile	Normale

NON VALIDO: non compare la linea di controllo. Le cause più probabili della mancata comparsa della linea di controllo sono rappresentate da un volume di campione insufficiente o da errori procedurali. Verificare la procedura e ripetere l'analisi con una nuova card. Se il problema persiste, interrompere immediatamente l'utilizzo del kit di test e contattare il distributore locale.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Nella card è incluso un controllo procedurale interno. La comparsa di una linea colorata nell'area di controllo (C) deve essere considerata una verifica procedurale interna di corretta esecuzione del test. Fornisce la conferma che è stato applicato un volume di campione sufficiente, che si è verificato un adeguato assorbimento da parte della membrana e che è stata utilizzata la tecnica procedurale corretta.

Campioni certificati di controllo non vengono forniti in questo kit; tuttavia, si consiglia di analizzare controlli negativi e positivi come buona prassi di laboratorio, per conferma della procedura di test e per verificare le corrette prestazioni del test.

LIMITAZIONI DEL METODO

1. *Calprotectin Semi-Quantitative Rapid Test* è destinato esclusivamente all'uso diagnostico professionale *in vitro*. Il test deve essere utilizzato esclusivamente per la rilevazione semiquantitativa della calprotectina in campioni di feci umane
2. *Calprotectin Semi-Quantitative Rapid Test* fornisce esclusivamente risultati semiquantitativi e non deve essere utilizzato come unico criterio per la diagnosi di malattie infiammatorie croniche intestinali
3. Come per tutti i test diagnostici, i risultati devono essere interpretati unitamente alle altre informazioni cliniche disponibili.
4. Concentrazioni di calprotectina vicini al cut-off. Linea T1 (T1: <15 µg/g), Linea T2 (T2: 15-60 µg/g) e Linea T3 (T3: >60 µg/g), dovrebbero essere valutati criticamente in quanto, in modo analogo ai test quantitativi, esistono sempre livelli di variazione. Pertanto, una Linea T (1 o 2) leggermente più intensa della Linea T3 potrebbe rappresentare un valore leggermente al di sotto di 60 µg/g. Considerazioni simili possono essere fatte anche per valori prossimi a 15 µg/g: in tutti questi casi è raccomandata la ripetizione completa della procedura analitica.
5. Qualora il test produca un risultato negativo ma i sintomi clinici permangano, è raccomandata l'esecuzione di ulteriori approfondimenti clinici.

VALORI ATTESI

Calprotectin Semi-Quantitative Rapid Test è stato confrontato con metodica per la determinazione della calprotectina di tipo immunoenzimatico (EIA), dimostrando una accuratezza complessiva del 95%

CARATTERISTICHE DEL METODO

N/A (non disponibili)

BIBLIOGRAFIA

1. Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. Bull Eur Physiopathol Respir 1980; 16 Suppl: 273-282.
2. Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. Scand J Gastroenterol 1992; 27: 793-798.
3. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol 2008; 8: 279-289.
4. Sipponen T, Björkstén CG, Färkkilä M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. Scand J Gastroenterol 2010; 45: 325-331.
5. Ricanek P, Brackmann S, Perminow G, Lyckander LG, Sponheim J, Holme O, Høie O, Rydning A, Vatn MH. Evaluation of disease activity in IBD at the time of diagnosis by the use of clinical, biochemical, and fecal markers. Scand J Gastroenterol 2011; 46: 1081-109

Figura 1

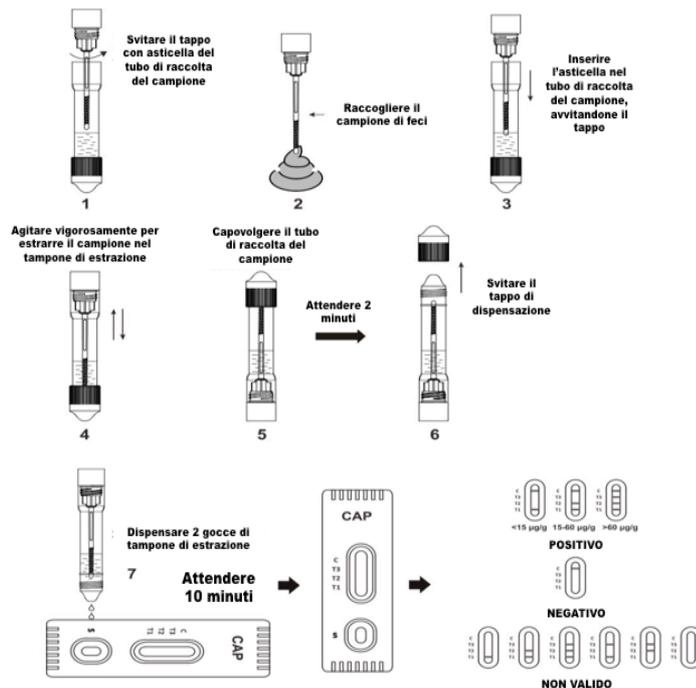
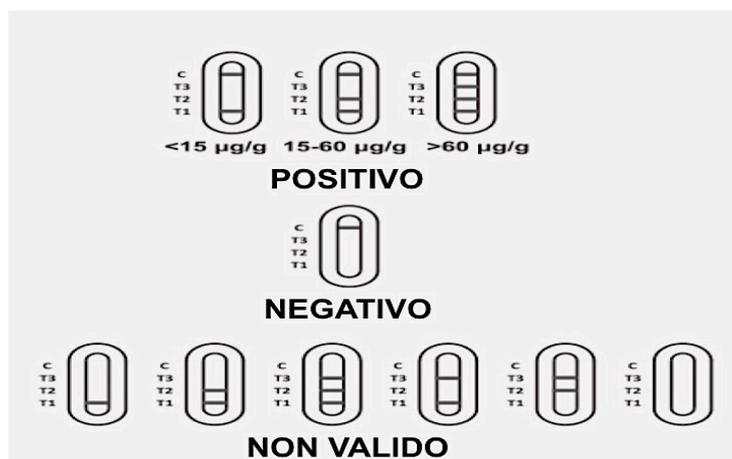


Figura 2



Indice dei simboli

	Consultare le istruzioni per l'uso		Test per kit		Rappresentante autorizzato
	Esclusivamente per uso diagnostico <i>in vitro</i>		Data di scadenza		Monouso
	Conservare a 2-30 °C		Numero lotto		N. catalogo

Codici di Riordino:

C1369 Calprotectin Semi-Quantitative Rapid Test 10 determinazioni



Bio Plastic Sas - 00100 Roma