

CalFast

Test rapido per la determinazione quantitativa della calprotectina nelle feci.

Per uso diagnostico in vitro.

Campo di applicazione

CalFast è un test immunocromatografico per la determinazione quantitativa della calprotectina nelle feci. L'estrazione dei campioni avviene tramite un dispositivo dedicato che permette di ridurre considerevolmente i tempi della fase pre-analitica.

Principio del test

CalFast è un test immunocromatografico che sfrutta l'uso di una miscela di anticorpi monoclonali e policlonali diretti contro la calprotectina. La calprotectina presente nel campione si lega all'anticorpo anti-calprotectina coniugato con oro colloidale.

Il complesso così formato migra e si lega all'anticorpo anti-calprotectina presente nella zona di reazione (zona T), mentre gli anticorpi coniugati non legati si legheranno nella zona di controllo (zona C).

La concentrazione di calprotectina presente nel campione viene calcolata per mezzo di una lettura effettuata con i lettori CalFast Reader.

Reagenti forniti e preparazione

Cassette di rilevazione	20 pezzi
Diluyente	1 fialcone
Dispositivi di raccolta ed estrazione feci	20 pezzi

Composizione dei materiali/reagenti forniti

Cassette di rilevazione

20 Cassette confezionate singolarmente in un sacchetto di alluminio contenente un dessiccante. Le cassette sono monouso.

Diluyente

Un fialcone contenente 50 ml di soluzione pronta all'uso.

Dispositivi di raccolta ed estrazione feci

20 Dispositivi contenenti la soluzione di estrazione pronta all'uso. Il dispositivo è monouso.

Materiali necessari ma non forniti

1. Provette in plastica per diluizione estratto fecale.

2. Miscelatore Vortex (o similare).

3. Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 μ l e 1 ml.

4. Centrifuga per microprovette.

5. Provette Eppendorf (o similari) per la diluizione degli estratti.

6. Timer.

7. Lettore CalFast.

Criteri di prestazione e limiti di del metodo

Variazione intra-saggio.

4 campioni di feci sono stati testati 12 volte nella stessa seduta. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4
Media mg/Kg	208,8	142,4	101,2	72,2
STD	25,5	15,6	8,5	8,2
CV%	12,2	10,9	8,4	11,3

Variazioni inter-saggio.

5 campioni di feci sono stati testati in doppio in tre sedute differenti. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4	5
Media mg/Kg	88,4	98,3	114,4	172,3	200,9
STD	7,6	9,3	7,9	16,7	23,6
CV%	8,7	9,4	6,9	9,7	11,8

Variazioni inter-lotto.

5 campioni di feci sono stati testati in doppio utilizzando tre lotti differenti. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	1	2	3	4	5
Media mg/Kg	84,4	101,0	121,9	104,6	221,7
STD	7,5	8,4	11,5	12,8	22,7
CV%	8,8	8,3	9,4	12,2	10,2

Sensibilità analitica.

Un campione positivo a concentrazione nota è stato analizzato in diluizione da 1150 a 9 mg/Kg.

Ogni diluizione è stata testata in dieci replicati. Nel range di concentrazione compreso tra 15 e 300 mg/Kg, sono stati ottenuti valori di CV% inferiori al limite imposto del 15%.

Sensibilità diagnostica.

Sono state testate feci provenienti da 20 soggetti con diagnosi clinica di IBD o malattia infiammatoria cronica intestinale. Il valore rilevato è stato del 90%

Specificità diagnostica.

Sono state testate feci provenienti da 102 pazienti con

diagnosi di IBS o comunque con diagnosi diverse dalla malattia infiammatoria cronica intestinale. Il valore rilevato è stato del 90,2%.

Concordanza tra metodi.

163 campioni di feci di soggetti con e senza diagnosi clinica di malattia infiammatoria cronica intestinale, sono stati testati con il test rapido CalFast ed i risultati, in termini di positività/negatività, sono stati confrontati con quelli ottenuti con il kit Calprest, che utilizza una metodica ELISA. I risultati di 150 campioni si sono dimostrati concordi tra i due metodi (Pos/Pos o Neg/Neg), mentre 13 campioni sono risultati discordanti (Pos/Neg o Neg/Pos).

La concordanza totale tra i due metodi è del 92%.

Conservazione e validità dei reagenti

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette.

Stabilità dopo la prima apertura

Il Diluente del campione è stabile per 60 giorni dalla prima apertura nel proprio contenitore primario se conservato a 2-8°C.

Stabilità al trasporto

In uno studio di stabilità accelerata tutti i componenti del dispositivo si sono dimostrati stabili dopo conservazione a 37°C per 96 ore.

Avvertenze e precauzioni

Trattare tutti i campioni dei pazienti come potenzialmente infettivi ed eliminare i rifiuti secondo la legislazione vigente.

Raccolta delle feci

La raccolta delle feci destinate all'uso con CalFast deve essere eseguita mediante il dispositivo di prelievo contenuto all'interno del kit.

Modalità di prelievo standard per feci di consistenza normale

1. Raccogliere un campione di feci in un contenitore sterile.
2. Estrarre l'astina sagomata del dispositivo ruotando il tappo a vite in senso antiorario.
3. Immergere la parte sagomata dell'astina nel campione di feci, precedentemente raccolto.
4. Ruotare ripetutamente l'astina nel campione di feci finché tutte le scanalature siano riempite di materiale fecale.
5. Prima di inserire l'asticella nel dispositivo, rimuovere l'eccesso grossolano di materiale ruotando l'asticella sulla parete interna del contenitore primario delle feci.

6. Inserire completamente l'astina sagomata, con materiale fecale, all'interno della provetta contenente il liquido di estrazione e ruotare il tappo in senso orario fino alla completa chiusura.

Modalità di prelievo per feci liquide o comunque di consistenza tale da non poter essere raccolte con il dispositivo

1. È necessario avere a disposizione una pipetta da laboratorio.
2. Questa modalità richiede che venga prelevato un campione di 60 μ l (microlitri) di feci liquide.
3. Estrarre l'astina sagomata del dispositivo ruotando il tappo a vite in senso antiorario.
4. Dispensare direttamente le feci liquide all'interno del dispositivo di raccolta.
5. Reinserrire completamente l'astina sagomata all'interno della provetta (che non conterrà le feci) e ruotare il tappo in senso orario fino alla completa chiusura.

Modalità di prelievo per feci dure (difficoltà ad introdurre l'astina sagomata nel campione)

1. Raccogliere un campione di feci in un contenitore sterile.
2. Trasferire 50-100 μ l di soluzione fisiologica salina all'interno del contenitore di feci.
3. Il contenitore con le feci e la soluzione fisiologica deve rimanere a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.
4. Procedere dal punto 2 secondo la "Modalità di prelievo standard per feci di consistenza normale".

Modalità di prelievo per feci in assenza del dispositivo

1. Se il centro non dispone temporaneamente del dispositivo di raccolta delle feci, raccogliere il campione in un contenitore sterile e mantenerlo per non oltre 7 giorni a 2-8°C. Se il periodo di conservazione a 2-8°C supera i 7 giorni, il campione e deve essere congelato a -20°C.
2. Quando il dispositivo è nuovamente disponibile, si potrà procedere al prelievo del campione secondo le modalità descritte precedentemente. Se il campione è stato congelato, lasciare che il campione raggiunga la temperatura ambiente prima di procedere al prelievo con il dispositivo.
3. Procedere dal punto 2 secondo la "Modalità di prelievo standard per feci di consistenza normale".

Conservazione dei campioni

1. Le feci possono essere conservate nel loro contenitore originale per un massimo di 7 giorni a 2-8°C. Per conservazioni più lunghe è necessario congelare le feci a -20°C.

- Una volta eseguito il prelievo delle feci mediante il dispositivo di raccolta, lo stesso deve essere conservato a 2-8°C per un massimo di 48 ore. Al termine delle 48 ore, è obbligatorio eseguire la procedura di estrazione: in caso contrario, il campione deve essere eliminato.

Conservazione degli estratti

Una volta eseguita la procedura di estrazione, l'estratto può essere utilizzato immediatamente oppure congelato a -20°C per un massimo di tre (3) mesi.

Avvertenze

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18-28°C) prima di iniziare l'analisi.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante centrifugare gli estratti prima di procedere alla diluizione degli stessi.
- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro 2 ore e non possono essere conservati più a lungo.
- Gli estratti non diluiti prelevati dal dispositivo di raccolta delle feci possono essere conservati a -20°C per un massimo di tre mesi.
- Si consiglia di trattare il materiale fecale come potenzialmente infetto.

Procedura di estrazione

- Agitare il dispositivo con un vortex per 30-60 secondi per omogeneizzare bene il contenuto prelevato.
- Mettere il dispositivo su un agitatore a rulli per provette ed agitare per 20 minuti.
- Ripetere i passaggi 1 e 2 per tutti i campioni da preparare.
- Alla fine dell'agitazione, centrifugare le provette per 5 minuti a 3000 rpm, posizionando il tappo-impugnatura in basso.
- Estrarre le provette dalla centrifuga, rompere la chiusura terminale in plastica e trasferire il contenuto in una provetta pulita.

Procedura di diluizione

- Diluire gli estratti fecali precedentemente preparati 1:50 (es. 20 µl campione + 980 µl di Tampone di diluizione). Mescolare bene (vortex per 10 sec)
- Il campione è pronto per il test.

Procedura del test

- Aprire il sacchetto contenente la cartuccia e metterla su un piano orizzontale.
- Prelevare 100 µl di estratto diluito e dispensarlo nell'apposito pozzetto circolare presente sulla cassetta.
- Incubare a temperatura ambiente per 20 minuti.

Letture dei risultati con lettore CalFast Reader (modello riportato nella foto sottostante)

- Premere il pulsante centrale del pad (5) per 1 secondo per accendere il lettore.
- Attendere che venga effettuato automaticamente il test di autoverifica e il controllo di taratura.
- Controllare che il metodo selezionato sia CALFAST, altrimenti selezionare <Metodo> (tipo di test) <CALFAST> e premere ENTER.
- Controllare che il numero di lotto indicato sia identico a quello riportato sull'etichetta del kit CalFast in uso, altrimenti eseguire l'aggiornamento dei parametri tramite il lettore di codici a barre 2D.
- Selezionare <ID Campione> ed inserire il riferimento del campione utilizzando i quattro pulsanti neri del pad. Premere ENTER.
- Inserire la cassetta nell'apposita slitta laterale con il pozzetto circolare per il caricamento del campione situato verso destra. Chiudere la slitta
- Selezionare <Misura> e premere ENTER.
- Il lettore CalFast eseguirà la lettura e riporterà il risultato espresso in mg/Kg.






Attenzione: per ogni lotto di CalFast modificare i parametri specifici del test servendosi del lettore di codici a barre 2D. I parametri del test sono riportati sull'etichetta con codice a barre 2D stampata sulla confezione del Kit. L'utilizzo di parametri relativi ad un diverso lotto di CalFast può portare a risultati inesatti.

Letture dei risultati con lettore CalFast Reader New (modello riportato nella foto sottostante)

- Verificare che il CalFast Reader sia collegato al personal computer (PC) tramite l'apposito cavo USB in dotazione. Accendere il PC e fare doppio clic sull'icona di avvio del programma Applicazione CalFast Client, quindi inserire User e Password.
- Controllare che il numero di lotto indicato sia identico a quello riportato sull'etichetta del kit CalFast in uso, in caso contrario eseguire l'aggiornamento dei parametri secondo la seguente procedura:
- Inserire nell'alloggiamento della cassetta il codice a barre



- bi-dimensionale contenuto nella confezione di CalFast.
- Controllare la corretta inquadratura del codice a barre servendosi dell'apposito riquadro.
 - Clickare su  per la lettura del codice a barre. Tutte le informazioni relative al nuovo lotto vengono automaticamente inserite in tutti i campi presenti nel riquadro Informazioni Lotto.
 - Memorizzare cliccando su .
 - Uscire cliccando su .
 - Le operazioni descritte precedentemente dovranno essere eseguite ogni volta che si utilizza un nuovo lotto di CalFast. Le informazioni memorizzate per un lotto di prodotto saranno mantenute fino alla utilizzazione di un nuovo lotto.




Compilazione anagrafica Paziente

- Inserire almeno una delle seguenti informazioni: Cognome, Nome, Data di Nascita o Codice paziente.
- Una volta compilati i dati relativi all'anagrafica del nuovo paziente, si accenderà il LED verde indicando che è possibile inserire la Cassetta nell'apposito alloggiamento e procedere alla lettura.
- Inserire la Cassetta, controllare il corretto posizionamento utilizzando il pulsante Controllo Strip (facoltativo).

Controllo Strip

- Codice Lotto: evidenzia il codice del lotto in uso.
- Nome Kit: descrizione identificativa del prodotto in uso.
- Pulsante Controllo Strip: può essere usato facoltativamente prima di avviare un esame. Quando attivato, compare l'immagine della Cassetta da analizzare e viene eseguito un controllo sulla presenza della Linea di Controllo. Se è presente ed è posizionata correttamente, il display della concentrazione riporterà "LEGGIBILE". In caso contrario (Linea di controllo assente o posizionamento errato della Cassetta), comparirà la scritta "ILLEGGIBILE".
- Immagine Controllo Strip: rappresentazione "reale" della Cassetta inserita nell'apposito alloggiamento.
- Immagine Analizzata: immagine della Cassetta effettivamente utilizzata per eseguire i calcoli.

Esecuzione del test

- Se la Cassetta risulta leggibile, avviare l'esame della Cassetta premendo l'icona . Durante la lettura della Cassetta si accende il LED giallo ed l'icona  viene sostituita dall'icona .

- Nel riquadro Controllo Strip è presente sia l'immagine "reale" della Cassetta che l'immagine Analizzata che viene utilizzata per eseguire i calcoli.
- Immagine Analizzata: è l'immagine sulla quale sono stati eseguiti i calcoli. Le linee rosse e blu delimitano il campo di lettura per il calcolo.
- Il lettore CalFast esegue la lettura e riporta il risultato espresso in mg/Kg o $\mu\text{g/g}$.
- Il Valore di Concentrazione letto viene salvato automaticamente ed associato ai dati anagrafici del paziente.
- Attenzione:** per ogni lotto di CalFast modificare i parametri specifici del test acquisendo il codice a barre 2D come indicato al punto 2. L'utilizzo di parametri relativi ad un diverso lotto di CalFast può portare a risultati inesatti.

Per una descrizione più dettagliata si rimanda al Manuale d'uso contenuto nella confezione di CalFast Reader New.

Accettazione dei risultati

- Affinché un risultato sia valido, la banda di controllo (C) deve essere sempre visibile. Questa banda rappresenta soltanto un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la banda di rilevazione (T).
- La quantità di calprotectina presente nel campione (Banda T) viene calcolata dai lettori CalFast Reader.
- Se compare solo la banda di rilevazione (T), il risultato non è valido e il dosaggio deve essere ripetuto con una cartuccia nuova.
- Se non compaiono né la banda di controllo (C) né la banda di rilevazione (T), il risultato non è valido e il dosaggio deve essere ripetuto con una nuova Cassetta.
- NB:** I lettori CalFast Reader New hanno la possibilità di effettuare un controllo Strip (facoltativo) per verificare che la cassetta sia leggibile.

Risultati forniti dai lettori CalFast

Il test CalFast è stato calibrato sulla base delle informazioni cliniche provenienti dai vari pazienti sottoposti al test e parallelamente sono stati eseguiti dosaggi con il test ELISA di riferimento (Calprest)

I Lettori CalFast utilizzano una curva standard lotto specifica per calcolare la concentrazione di calprotectina. Sebbene, come descritto in precedenza, l'intervallo rilevabile sia compreso tra 15 e 300 mg/kg, è stato deciso che i valori di concentrazione di Calprotectina ottenuti con i lettori CalFast verranno riportati come indicato nella tabella sottostante:

Valori di Calprotectina	Valori di Calprotectina riportati sul display dei lettori CalFast
0 - 50 mg/Kg	< 50 mg/Kg
51 - 300 mg/Kg	Valore calcolato
> 300 mg/Kg	> 300 mg/Kg

Intervallo di riferimento ed interpretazione dei risultati

Come buona norma, ogni laboratorio deve calcolare i propri valori di normalità. Per tale calcolo utilizzare un numero statisticamente significativo di campioni prima di assegnare un particolare significato clinico a questa determinazione. Un'analisi interna ha fornito i seguenti valori di cut-off:

Valori negativi: < 70,0 mg/kg (0 µg/g)

Valori positivi: ≥ 70,0 mg/kg (0 µg/g)

I campioni con una concentrazione superiore a 70 mg/kg devono essere considerati positivi al test CalFast ed essere sottoposti a ulteriori indagini cliniche per determinare la causa dell'aumentata concentrazione della calprotectina.

Negli adulti sani, il valore medio rilevabile è di circa 25 mg/kg. Questo valore, se ottenuto con il lettore CalFast verrebbe indicato come minore di 50 mg/kg (<50 mg/kg). Nelle popolazioni adulta e pediatrica i livelli di calprotectina fecale sono paragonabili, mentre i livelli riscontrati nei primi mesi di vita dei neonati possono essere superiori in modo significativo.

Valori clinici di riferimento

Studi clinici(2-5,10) hanno fornito i seguenti valori:

Valori di riferimento normali, mediana	< 50 mg/kg
Cancro Colon retto, mediana	350 mg/kg
MICI (IBD) (CD & UC), mediana	1722 mg/kg

Bibliografia

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol. 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal

- inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Campeotto F. et al.: Fecal calprotectin: cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009 Apr;48(4):507-10.
6. Sohnle PG. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
7. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
8. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
9. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
10. Johnne B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

CalFast

20 test, codice 9191



Data di revisione

2013.11.11

Eurospital[®]



Eurospital SpA

Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com - info@eurospital.com

CalFast

Rapid test for the quantitative detection of calprotectin in stools.

For in vitro diagnostic use.

Intended use

CalFast is an immunochromatographic assay for the quantitative detection of calprotectin in faeces. The calprotectin extraction occurs in a dedicated device, which allows to greatly reduce the time needed for the pre-analytical procedure.

Test Principle

CalFast is immunochromatographic assay which combines a mixture of anti-calprotectin polyclonal and monoclonal antibodies. Calprotectin present in the diluted sample is bound by the gold-conjugated antibody. The so formed complex moves along the reaction strip and binds to the anti-calprotectin antibodies present in the reaction area (T) while unbound antibodies will bind in the control area (C). The concentration of calprotectin in the sample is calculated by means of the CalFast reader.

Provided materials and preparation

Cassettes	20 pieces
Diluent	1 vial
Stool collection and extraction devices	20 pieces

Composition of provided materials/reagents

Cassettes

Twenty (20) Cassettes single-packed in a sealed aluminum foil containing a desiccant. Cassettes are disposable.

Diluent

One (1) Vial containing 50 ml. Ready to use.

Stool collection and extraction devices

Twenty (20) Devices containing a ready-to-use extraction solution. Devices are disposable.

Materials required but not provided

1. Plastic tubes for faecal extract dilution.
2. Vortex.
3. Precision pipettes with disposable tips (10-200 μ l, 1ml).
4. Centrifuge for microtubes.

5. Eppendorf tubes (or similar) for extract dilution.

6. Timer.

7. CalFast Reader.

Performance criteria and limits of the test

Intra-assay variation

Four (4) stool samples were tested twelve (12) times in the same run. The obtained results are as follows:

Sample	1	2	3	4
Mean mg/Kg	208,8	142,4	101,2	72,2
STD	25,5	15,6	8,5	8,2
CV%	12,2	10,9	8,4	11,3

Inter-assay variation

Five (5) stool samples were tested in duplicate in three (3) different series. The obtained results are as follows:

Sample	1	2	3	4	5
Mean mg/Kg	88,4	98,3	114,4	172,3	200,9
STD	7,6	9,3	7,9	16,7	23,6
CV%	8,7	9,4	6,9	9,7	11,8

Inter-lot variation

Five (5) stool samples were tested in duplicate using three (3) different batches of product. The obtained results are as follows:

Sample	1	2	3	4	5
Mean mg/Kg	84,4	101,0	121,9	104,6	221,7
STD	7,5	8,4	11,5	12,8	22,7
CV%	8,8	8,3	9,4	12,2	10,2

Analytical Sensitivity

A positive samples at a known calprotectin concentration was diluted from 1150 mg/kg to 9 mg/kg and tested accordingly. Each dilution has been tested ten (10) times. Within the assay range (15 -300 mg/kg), all CV% values were lower than the expected 15% value.

Diagnostic sensitivity

Stool samples from twenty (20) subjects affected by clinically diagnosed IBD (Inflammatory Bowel Disease) were tested. The obtained value was 90%.

Diagnostic specificity

Stool samples from hundred and two (102) subjects affected by either IBS (Irritable Bowel Syndrome) or with disease different than IBD were tested. The obtained value was 90,2%.

Concordance between methods

Hundred-sixty-three (163) stool samples from subjects with or without clinical diagnosis of IBD were tested with CalFast (immuno-chromatographic assay). The results, in terms of positive/negative response, were compared with those obtained with Calprest test (ELISA). Hundred-fifty (150) samples showed concordant results (Pos/Pos or Neg/Neg) between the two methods. Thirteen (13) samples showed discordant results (Pos/Neg or Neg/Pos). The overall concordance was 92%.

Storage and expiry date of reagents

All reagents must be stored at 2-8°C and used before expiration date printed on the label.

Stability after first opening

The Sample Diluent is stable for sixty (60) days after first opening, if stored at 2-8°C in its original container.

Transportation stability

An accelerate stability test proved that all components of the kit are stable after storage for 96 hours at 37°C.

Advices and precautions

All patient samples must be treated as potential biohazard, and shall be handled and disposed of according to local laboratory legislation.

Procedure for stool collection

The stool to be tested by CalFast must be collected by means of the Stool Collection Devices included in the kit package.

Sampling procedure for faeces of normal consistency

1. Collect a stool sample in a sterile container.
2. Pull out the shaped stick by turning the screw-cap counter-clockwise.
3. Dip the shaped stick in the previously collected stool sample.
4. Repeatedly rotate the stick in the stool sample until all grooves are filled with faecal material.
5. Before placing the stick into the device, remove the stool excess by rotating the stick on the internal wall of the stool container.
6. Fully insert the stick, with faecal material into the tube containing the extraction solution. Turn the cap clockwise until completely closed.

Sampling procedure for liquid faeces or anyhow having a consistence which does not allow the use of the shake stick

1. It is necessary to have a laboratory pipette.

2. By using the pipette, aspirate 60 µl of liquid stool.
3. Pull out the shaped stick by turning the screw-cap counter-clockwise.
4. Pipette the liquid stool sample into the tube containing the extraction solution.
5. Place the shaped stick back into tube containing the extraction solution. Turn the cap clockwise until completely closed.

Sampling procedure for faeces of hard consistency (the shaped stick can hardly be dipped into stool)

1. Collect a stool sample in a sterile container.
2. Pipette 50-100 µl of saline solution inside the stool container.
3. Let the container with stool and saline solution at room temperature for 60 minutes at least.
4. Proceed then from point 2 of the "Sampling procedure for faeces of normal consistency".

Sampling procedure in case of absence of the device

1. Should the laboratory temporarily not have the collection device, collect a stool sample in a sterile container and keep it at 2-8°C for no more than 7 days. Should the storage period exceed 7 days at 2-8°C, the sample must be frozen at -20°C.
2. Once the device is available again, proceed to the sampling procedure described above. If the sample was frozen, allow it to reach room temperature before to collect the stool sample by means of the device.
3. Proceed from point 2 of the "Sampling procedure for faeces of normal consistency".

Storage of samples

1. Stool can be stored into their original container at 2-8°C up to seven (7) days. For longer storage, it is necessary to store them frozen at -20°C.
2. Once the stool has been collected by means of the stool collection device, the device can be stored at 2-8°C for 48 hours at maximum. After 48 hours, it is mandatory to perform the extraction procedure. On the contrary, the sample must be eliminated.

Storage of the extracts

Once the extraction procedures has occurred, the extracted sample can be immediately used or frozen at -20°C and stored up to three (3) months.

Warnings

1. Wait until all reagents and stool samples reach room temperature (18-28°C) before starting the test.

- In order to obtain reliable quantitative results it is mandatory to centrifuge extracts before proceeding to their dilution.
- Diluted samples must be tested within two (2) hours and cannot be stored for a longer period of time.
- Undiluted extracts removed from the stool collection devices and transferred into clean tubes can be stored for no longer than three (3) months at -20°C.
- It is advised to handle stool as potentially infectious material.

Extraction procedure

- Shake each device by Vortex for 30-60 seconds in order to properly homogenate the content.
- Place the device on a roller shaker for tubes and shake for 20 minutes.
- Repeat steps 1 and 2 for all samples to be processed.
- Remove the devices from the shaker and place them upside-down into in a centrifuge. Centrifuge all devices for 5 minutes at 3000 rpm. Place the device upside down.
- Remove the devices from the centrifuge. Break the low-end and remove it. Transfer the supernatant into a clean tube.

Dilution Procedure

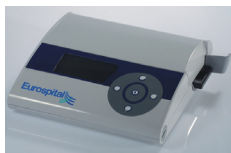
- Dilute the faecal extracts previously prepared 1:50 (e.g. 20µl Sample + 980 µl Diluent Buffer). Mix by vortex (10 sec).
- The Sample is ready to be tested.

Test Procedure

- Open the sealed aluminum foil containing the cassette. Take it and place onto a horizontal surface.
- Take 100 µl of faecal extract and transfer it into the round well of the cassette.
- Incubate at room temperature for 20 minutes.

Reading the results by means of CalFast Reder (same as the picture below)

- Press the "ENTER" key (5) for 1 second to switch on the reader.
- Wait until the reader performs the self-check procedures and calibration control.
- Check that the selected method is <CALFAST>. On the contrary, select <Method> (kind of test) and then <CALFAST>. Press <ENTER>.
- Check the lot number displayed on the reader screen is the same of that report in the CalFast package. On the






contrary, perform the update of the test parameters by means of the "D barcode reader.

- Select <ID Sample> and enter the sample reference number by using the pads on the instrument. Press <ENTER> to confirm.
- Place the processed cassette in the lateral drawer being sure that the round spot is located on the right hand side of the cassette. Close the drawer.
- Select <Measure> and press <ENTER>.
- The CalFast Reader will read the reaction and provide results expressed as mg/Kg.

Warning: For each lot of CalFast, please load the lot specific parameters by reading the 2D barcode located inside the kit package by means of the CalFast barcode reader.

Test parameters are reported in the 2D barcode label printed on the internal part of the cover of the kit: Use of parameters from a different lot number will cause wrong and unreliable results.

Reading of results by means of CalFast Reader New (same as the picture below)

- Check if the CalFast Reader New is connected to a PC or Laptop throughout the dedicated USB cable, included in the box. Turn on the computer, double-click on the icon of CalFast Reader program and enter User and Password.
- Check that all lot info is the same as those reported on the outer label of the CalFast kit. If the lot is different, please update it as described below.
- Place the two-dimensional barcode included in the package into the slot of the instrument.
- Check that the barcode is properly placed inside the Reader correctly.
- Click on this icon  for reading the barcode. All info of the lot will be automatically uploaded into the CalFast Reader New.
- Save the info by clicking on .
- Exit by clicking on this icon .
- This procedure must be repeated every time a new lot is used. All uploaded information for a given lot will be stored until a new batch is used.



Patient's data Input




- Enter at least one of the following data: Family Name, Name, Date of Birth or Patient code.

- Once completed, the green LED lights up, indicating that you can place the cassette inside the slot of the instrument.
- Place the cassette into the slot of the instrument: check if the position is correct by clicking on "Check the strip" (optional).

Check the strip

- Batch code: it indicates the lot currently in use
- Kit name: identification of the product in use.
- Check Strip: to be used before starting a test (optional). When activated, the image of the cassette appears and a check is made on the presence of the Control line. If the Control Line is present and correctly positioned, the screen will display "READABLE". On the contrary, if control line is missing or positioning of the cassette is incorrect, it will show "UNREADABLE".
- Control Strip Picture: it shows the cassette as it is inside the instrument
- Analyzed Image: image of the cassette actually used to perform the test.

Running the test

- If the cassette is readable, start the test by pressing the icon . While reading the cassette, the yellow led turns on and the icon  is replaced by .
- Control Strip box shows two different images: one is the "real" image of the cassette, while the other one is used to perform calculations.
- Analyzed image: it is the image used for calculations. The red and blue lines define the reading range for the calculation.
- CalFast Reader New performs the reading and reports the result in mg/kg or µg/g.
- The concentration value is automatically saved and associated to the specific patient information.
- Warning:** for each lot of CalFast, lot specific parameters must be used. Data can be uploaded by means of the 2D barcode described at step 2. The use of parameters related to a different batch of CalFast can lead to inaccurate results.

For more detailed information, please refer to CalFast Reader New User Manual

Result Validation

- To consider a test result valid, the Control line (C) must be always present. This line is just a functional control of the

test and cannot be used for the interpretation of the Test line (T).

- The amount of calprotectin in the stool sample (T) is calculated by the CalFast Reader.
- If only the line T appears, the test is not valid and must be repeated by using a new cassette.
- If neither the line (C) nor the line (T) show up, the result is not valid and the test must be repeated by using a new cassette.
- NB:** CalFast Reader New can check whether the strip can be read by means of the "Check the Strip".

Results obtained by CalFast Reader

CalFast has been calibrated using both the clinical information of the patients submitted to tests and, at the same time, the results of the same patient samples obtained by Calprest (ELISA).

The CalFast Reader uses a lot specific calibration curve to calculate the Calprotectin concentration. Nonetheless the detectable range of calprotectin is between 15 and 300 mg/kg, it has been decided that the calprotectin values obtained by CalFast reader will be expressed as reported in table below:

Calprotectin values	Calprotectin values on the CalFast reader display
0 - 50 mg/Kg	< 50 mg/Kg
51 - 300 mg/Kg	The real value will be shown
> 300 mg/Kg	> 300 mg/Kg

Reference range and interpretation of results

Good Laboratory Practice suggests that each laboratory should calculate its own normal range. For such calculation, it is requested to test a significant number of samples before assigning a clinical value to this test. An internal analysis provided with the following cut-off values:

Negative: < 70,0 mg/kg
Positive: ≥ 70,0 mg/kg

Samples having a concentration higher than 70 mg/kg must be considered positive to the CalFast test and should be submitted to further clinical investigation to define the reason for the increased Calprotectin concentration.

In healthy adult patients, the average value of Calprotectin is around 25 mg/kg. This value, if obtained by means of CalFast Readers, would be reported as <50 mg/kg. While in adult and pediatric samples, calprotectin values are similar, levels detected in newborns might be significantly higher.

Reference values

Clinical studies (2-5, 10) gave the following values:

Normal healthy reference, median	< 50 mg/kg
Colorectal cancers, median	350 mg/kg
IBD (CD & UC), median	1722 mg/kg

References

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
7. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
8. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
9. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
10. Johne B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

CalFast

20 tests, code 9191

Revision date

2013.11.11



Eurospital[®]



Eurospital SpA

Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italy
Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com

CalFast

Test rapide pour la détection de Calprotectine dans les selles

Usage in vitro

Utilisation prévue

CalFast est un dosage immunochromatographique pour la détection quantitative de Calprotectine dans les selles. L'extraction de Calprotectine à l'aide du tube collecteur (Device), permet de réduire considérablement le temps nécessaire à la procédure pré-analytique.

Principe du test

CalFast est un test immunochromatographique qui combine un mélange d'anticorps anti-Calprotectine monoclonaux et polyclonaux. La Calprotectine présente dans l'échantillon dilué, est liée par un anticorps conjugué à l'or (colloïdal). Les complexes ainsi formés migrent le long de la bande de réaction et se lient aux anticorps anti-Calprotectine présents dans la zone de réaction (T) alors que les anticorps non liés se lient dans la zone de contrôle (C). La concentration de Calprotectine dans l'échantillon est déterminée au moyen du lecteur CalFast.

Matériel fourni pour la préparation des échantillons

Cassettes	20 pièces
Diluant	1 Flaçon
Dispositifs de collecte et d'extraction des selles	20 pièces

Composition du matériel fourni et réactifs

Cassettes

20 Cassettes emballées à l'unité dans une feuille d'aluminium scellée contenant un déshydratant. Les cassettes sont à usage unique.

Diluant

1 flacon contenant 50 ml. Prêt à l'emploi.

Dispositifs de collecte et d'extraction des selles

20 dispositifs contenant une solution d'extraction prête à l'emploi. Les dispositifs sont à usage unique.

Matériel requis mais non fourni

1. Tubes en plastique pour la dilution de l'extraction fécale
2. Vortex
3. Pipettes de précision avec embouts jetables (10-200 μ l, 1ml)
4. Centrifugeuse pour microtubes

5. Tubes Eppendorf (comme les tubes pour la dilution de l'extraction)

6. Chronomètre

7. Lecteur CalFast (possibilité de mise à disposition par Eurobio)

Critères de performance et limite du test

Variation Intra Essai

4 échantillons de selles ont été testés 12 fois dans la même série. Les résultats obtenus sont les suivants:

Echantillon	1	2	3	4
Moyenne (mg/kg)	208,8	142,4	101,2	72,2
Ecart type	25,5	15,6	8,5	8,2
CV%	12,2	10,9	8,4	11,3

Variation inter Essai

5 échantillons de selles ont été testés en double dans 3 séries différentes. Les résultats obtenus sont les suivants:

Echantillon	1	2	3	4	5
Moyenne (mg/kg)	88,4	98,3	114,4	172,3	200,9
Ecart Type	7,6	9,3	7,9	16,7	23,6
CV%	8,7	9,4	6,9	9,7	11,8

Variation inter lot

5 échantillons de selles ont été testés en double en utilisant 3 lots différents de produit. Les résultats obtenus sont:

Echantillon	1	2	3	4	5
Moyenne (mg/kg)	84,4	101,00	121,9	104,6	221,7
Ecart Type	7,5	8,4	11,5	12,8	22,7
CV%	8,8	8,3	9,4	12,2	10,2

Sensibilité analytique

Les échantillons à une concentration de Calprotectine connue ont été dilués de 1150mg/kg à 9 mg/kg et testés en conséquence. Chaque dilution a été testée 10 fois. Dans le rang de l'essai compris entre 15 et 300 mg/kg de selles toutes les valeurs de cv étaient plus basses que les 15% de cv attendus.

Sensibilité du diagnostic

Les prélèvements de selles de 20 sujets atteints par une maladie intestinale inflammatoire ont été testés. La valeur obtenue était de 90%.

Spécificité du diagnostic

Les échantillons de selles de 102 patients atteints du syndrome de l'intestin irritable ou de différentes maladies

autres que la maladie intestinale inflammatoire ont été testés. La valeur obtenue était de 90,2%.

Concordance entre les méthodes

163 échantillons de selles de sujets avec ou sans diagnostic clinique de maladie inflammatoire de l'intestin ont été testés avec CalFast (test immunochromatographique). Les résultats en terme de réponse positive/ négative ont été comparés avec ceux obtenus avec le Calprest (test ELISA). 150 échantillons ont montré une concordance (Positif/Positif, Négatif/Négatif) entre les 2 méthodes. 13 échantillons ont montré des résultats discordants (Positif/ Négatif ou Négatif/Positif). La concordance globale était de 92 %.

Stockage et date de péremption des réactifs

Tous les réactifs doivent être conservés entre 2-8°C et utilisés avant la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Stabilité après première ouverture

Le diluant pour échantillon est stable pendant 60 jours après la première ouverture, s'il est conservé à 2-8°C dans son contenant original.

Stabilité des transports

Un test de stabilité accéléré a prouvé que tous les composants du kit sont stables après un stockage de 96 heures à 37°C.

Conseils et précautions

Tous les échantillons de patients doivent être traités comme des risques biologiques potentiels, et doivent être manipulés et éliminés conformément à la législation en vigueur du laboratoire.

Procédure pour la collecte des selles

La collecte des selles à tester avec le kit Calfast doit être effectuée avec le tube collecteur contenu dans le kit.

Méthode d'échantillonnage pour les matières fécales de consistance normale

1. Prélever un échantillon de selles dans un récipient stérile.
2. Retirer le bâton en dévissant le bouchon à vis dans le sens contraire des aiguilles d'une montre.
3. Tremper le bâton dans l'échantillon de selles recueilli antérieurement
4. À plusieurs reprises faire tourner le bâton jusqu'à ce que toutes les rainures soient remplies avec la matière fécale.
5. Avant de placer le bâton dans le tube collecteur, retirer l'excès de selles en tournant le bâton sur la paroi interne du tube contenant l'échantillon de selles

6. Insérer complètement le bâton, avec la matière fécale dans le tube contenant la solution d'extraction. Tourner le bouchon dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à sa fermeture complète.

Méthode d'échantillonnage pour les matières fécales liquides ou qui ont une consistance qui ne permet pas l'utilisation du bâton collecteur

1. Une pipette de laboratoire est nécessaire pour préparer l'échantillon.
2. A l'aide de la pipette, aspirer 60 µl de selles liquides.
3. Retirer le bâton en dévissant le bouchon à vis dans le sens contraire des aiguilles d'une montre
4. Pipeter l'échantillon de selles liquides dans le tube contenant la solution d'extraction.
5. Placer le dos du bâton dans le tube contenant la solution d'extraction. Visser le bouchon à vis jusqu'à fermeture complète.

Méthode d'échantillonnage pour les matières fécales de consistance dure (Le bâton peut difficilement être plongé dans les selles)

1. Prélever un échantillon de selles dans un récipient stérile.
2. Pipeter 50-100 µl de solution saline à l'intérieur du flacon de selles
3. Laisser reposer la solution saline dans les selles à température ambiante pendant 60 minutes au moins.
4. Ensuite procéder comme pour la méthode d'échantillonnage pour les matières fécales de consistance normale (reprendre au point 2 de la "Procédure pour la collecte des selles: Méthode d'échantillonnage pour les matières fécales de consistance normale")

Méthode d'échantillonnage en absence de l'appareil collecteur

1. Si le laboratoire n'a pas temporairement de dispositif collecteur: prélever un échantillon de selles dans un récipient stérile et conserver le entre 2 et 7°C sans dépasser 7 jours. Si la période de stockage devait excéder 7 jours, congeler les échantillons à -20°C.
2. Une fois le dispositif de nouveau disponible, suivre la méthode d'échantillonnage décrite auparavant. Si l'échantillon a été congelé attendre qu'il obtienne la température ambiante avant de recueillir l'échantillon de selles au moyen du dispositif.
3. Ensuite procéder comme pour la méthode d'échantillonnage pour les matières fécales de consistance normale (reprendre au point 2).

Stockage des échantillons

1. Les selles peuvent être stockées dans leur récipient d'origine à 2-8°C jusqu'à 7 jours. Pour une conservation plus longue, il est nécessaire de les stocker à -20°C.
2. Une fois les selles recueillies par l'intermédiaire du dispositif de collecte des selles, le dispositif peut être conservé à 2-8°C pendant 48 heures au maximum. Après 48 heures, il est obligatoire d'effectuer la procédure d'extraction. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être éliminé.

Stockage des extraits

Une fois la procédure d'extraction réalisée, l'échantillon peut être directement utilisé ou congelé à -20°C et stocké jusqu'à 3 mois.

Avertissements

1. Attendre que tous les réactifs et les échantillons de selles atteignent la température ambiante (18-28°C) avant de commencer le test.
2. Afin d'obtenir des résultats fiables quantitatifs, il est obligatoire de centrifuger les extraits avant de procéder à leur dilution.
3. Les échantillons dilués doivent être testés dans les 2 heures et ne peuvent pas être stockés pendant une longue période.
4. Les extraits non dilués retirés des dispositifs de collecte de selles et transférés dans des tubes propres peuvent être stockés pendant une durée n'excédant pas 3 mois à -20°C.
5. Il est recommandé de manipuler les selles comme du matériel potentiellement infectieux.

Méthode d'extraction

1. Agiter chaque tube à l'aide d'un Vortex pendant 30-60 secondes afin de bien homogénéiser le contenu.
2. Placer le tube sur un agitateur à rouleaux pour tubes et agiter pendant 20 minutes.
3. Répéter l'étape 1 et 2 pour tous les échantillons qui doivent être traités.
4. Retirer les tubes de l'agitateur et les placer à l'envers dans une centrifugeuse. Centrifuger tous les tubes pendant 5 minutes à 3000 tours par minute.
5. Retirer les tubes de la centrifugeuse. Briser l'extrémité du tube collecteur (Device) et le jeter. Transférer le surnageant dans un tube propre.

Méthode de dilution

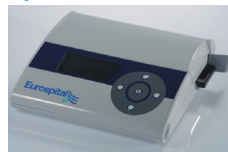
1. Diluer au 1:50 (ex 20 μ l d'échantillon + 980 μ l de diluant) les extraits fécaux préalablement préparés. Mélanger avec le vortex pendant 10 secondes.
2. L'échantillon est prêt pour être testé.

Procédure du test

1. Ouvrir la feuille d'aluminium scellée contenant la cassette. Prenez-la et placez-la sur une surface horizontale.
2. Prendre 100 μ l de l'extrait des matières fécales et le transférer dans le puits de la cassette.
3. Incuber à température ambiante pendant 20 minutes.

Lecture des résultats au moyen du lecteur CalFast

1. Appuyer sur la touche "ENTER" pendant 1 seconde pour allumer le lecteur.
2. Attendre que le lecteur effectue les procédures d'auto-vérification et de contrôle d'étalonnage.
3. Vérifier que la méthode choisie est < CALFAST >. Dans le cas contraire, sélectionner < Méthod > (Type de test) puis < CALFAST >. Appuyer sur "ENTER".
4. Vérifier que le numéro de lot affiché sur l'écran du lecteur est le même que celui inscrit sur le packaging CalFast. Dans le cas contraire, effectuer la mise à jour des paramètres de test du lecteur au moyen du "code-barres D".
5. Sélectionner > ID SAMPLE < et entrez le numéro de référence de l'échantillon en utilisant les touches de l'instrument. Appuyez sur < ENTER > pour confirmer.
6. Placer la cassette transformée dans le tiroir latéral en étant sûr que le puits soit situé sur le côté droit de la cassette. Fermez le tiroir.
7. Sélectionner < MEASURE > et < ENTER >.
8. Le lecteur CalFast lit la réaction et fournit des résultats exprimés en mg/kg.







Attention: A l'aide du lecteur de code-barres CalFast, pour chaque lot de CalFast, charger les paramètres spécifiques du lot grâce à la lecture du code-barres 2 D situé sur la partie interne du conditionnement du Kit.

Les paramètres de test sont rapportés dans l'étiquette code-barres 2D qui est située sur la partie interne de l'étui du kit. L'utilisation des paramètres à partir d'un numéro de lot différent, entraînerait des résultats erronés et non fiables.

Lecture des résultats à l'aide du nouveau lecteur CalFast

1. Vérifier si le nouveau lecteur CalFast est connecté à un PC ou à un ordinateur portable avec le câble USB dédié, inclus dans la boîte. Allumer l'ordinateur, double-cliquer sur l'icône "CalFast



- Reader" et entrez l'utilisateur et le mot de passe.
- Vérifier que toutes les informations du lot sont identiques à celles reportées sur l'étiquette du kit CalFast. Si le lot est différent, mettre à jour comme décrit ci-dessous:
 - Placer le code à barres à 2D dans la fente de l'instrument;
 - Vérifier que le code à barres est correctement placé à l'intérieur du Lecteur 
 - Cliquer sur cette icône  pour lire le code à barres. Toutes les infos du lot seront automatiquement transférées au lecteur CalFast.
 - Enregistrer les informations en cliquant sur 
 - Sortir en cliquant sur cette icône 
 - Cette procédure doit être répétée chaque fois qu'un nouveau lot est utilisé. Toutes les informations téléchargées pour un lot donné seront stockées jusqu'à ce qu'un nouveau lot soit utilisé.


Entrer les données du patient

- Entrer le nom ou la date de naissance ou le code du patient.
- Une fois terminé, les LED verte s'allument indiquant que vous pouvez placer la cassette dans la fente de l'instrument.
- Placer la cassette dans la fente de l'instrument: vérifier que la position est correcte en cliquant sur "Check the strip".

Vérifier la bande

- "Code du lot": il indique le lot en cours d'utilisation
- "Nom du kit": identification du produit en cours d'utilisation.
- "Vérifier la bande": pour être utilisé avant de commencer un test (facultatif).
- Lorsqu'il est activé, l'image de la cassette apparaît et une vérification de la présence de la ligne de contrôle est effectuée. Si la ligne de contrôle est présente et correctement positionnée, le lecteur affichera "LISIBLE". Au contraire, si la ligne de commande est manquante ou le positionnement de la cassette est incorrecte, il affichera "ILLISIBLE".
- Control strip picture: "Photo de la bande de Contrôle": elle montre la cassette à l'intérieur de l'instrument
- Analysed Picture: "Image analysée": l'image de la cassette actuellement utilisée pour effectuer le test

Exécution du test

- Si la cassette est lisible, lancer le test en appuyant sur l'icône . Lors de la lecture de la cassette, la led jaune s'allume et l'icône  est remplacée par .
- La case bande de contrôle montre deux images différentes: l'une est l'image "réelle" de la cassette, tandis que l'autre est utilisée pour effectuer les calculs.

- Analysed Picture ou Image analysée: il s'agit de l'image utilisée pour les calculs. Les lignes rouge et bleue définissent la plage de lecture pour le calcul.
- Le nouveau lecteur CalFast se lit et exprime un résultat en mg/kg ou $\mu\text{g/g}$.
- Les valeurs de concentrations sont automatiquement sauvegardées et associées à l'information spécifique du patient.
- Attention:** pour chaque lot de CalFast, les paramètres spécifiques de lot doivent être utilisés. Les données peuvent être téléchargées au moyen de code à barres 2D décrit à l'étape 2. L'utilisation de paramètres liés à un autre lot de CalFast peut conduire à des résultats inexacts.

Pour plus d'information, Veuillez consulter le manuel utilisateur du nouveau lecteur CalFast.

Validation des résultats

- Pour envisager un résultat de test valide, la bande de contrôle (C) doit toujours être présente. Cette bande est juste un contrôle fonctionnel de l'épreuve et ne peut pas être utilisée pour l'interprétation de la bande de test (T).
- La quantité de Calprotectine dans l'échantillon de selles (T) est calculée par le lecteur CalFast.
- Si seule la bande T apparaît, le test n'est pas valide et doit être répété en utilisant une nouvelle cassette.
- Si ni la bande (C) ni la bande (T) se présentent, le résultat n'est pas valide et le test doit être répété en utilisant une nouvelle cassette.
- NB:** Le nouveau lecteur CalFast peut vérifier si la bande est bien lue au moyen du "check the strip".

Les résultats obtenus par le lecteur CalFast

CalFast a été étalonné en utilisant à la fois l'information clinique des patients soumis à des essais et, les résultats de l'échantillon du même patient obtenus par Calprest (ELISA) réalisés au même moment.

Pour calculer la concentration de Calprotectine, le lecteur CalFast utilise une courbe d'étalonnage spécifique au lot. Néanmoins, la plage de détection de la Calprotectine est comprise entre 30 et 300mg/kg. Les valeurs de Calprotectine obtenues par le lecteur CalFast sont exprimées comme indiquées dans le tableau ci-dessous:

Valeurs de Calprotectine	Valeurs de Calprotectine lues sur le lecteur CalFast
0 - 50 mg/Kg	< 50 mg/Kg
51 - 300 mg/Kg	La valeur réelle s'affiche
> 300 mg/Kg	> 300 mg/Kg

L'intervalle de référence et d'interprétation des résultats

Les bonnes pratiques de laboratoires recommandent que chaque laboratoire calcule sa propre gamme normale. Pour ce calcul, il est demandé de tester un nombre significatif d'échantillons avant l'attribution d'une valeur clinique à ce test. Une analyse interne fournit les valeurs seuils suivantes:

Négatif: < 70,0 mg/kg

Positif: ≥ 70,0 mg/kg

Les échantillons ayant une concentration supérieure à 70 mg/kg avec le lecteur CalFast doivent être considérés comme positifs et doivent être soumis à un examen clinique plus approfondi pour définir la raison de l'augmentation de la concentration de Calprotectine.

Chez les adultes en bonne santé, la valeur moyenne détectée par la méthode ELISA (Calprest) est d'environ 25 mg/kg. (Remarque: cette valeur obtenue au moyen du lecteur CalFast serait signalée comme < 50 mg/kg). Alors que les valeurs de Calprotectine sont similaires dans des échantillons adultes et pédiatriques, les niveaux détectés dans les échantillons de nouveau-nés pourraient être sensiblement plus élevés.

Valeurs de référence

Les études cliniques (2-5, 10) donnent les valeurs suivantes:

Patient sain, médiane	< 50 mg/kg
Cancer Colorectal, médiane	350 mg/kg
IBD, médiane	1722 mg/kg

References

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity

of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.

7. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
8. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
9. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
10. John B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

CalFast

20 tests, code 9191



Date de révision

2013.11.11

Eurospital[®]



Eurospital SpA

Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italie

Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944

www.eurospital.com - info@eurospital.com

CalFast

Test rápido para la detección cualitativa de calprotectina en heces

Para uso diagnóstico in vitro

Intención de uso

CalFast es una prueba inmunocromatográfica para la detección cuantitativa de calprotectina en heces. La extracción de calprotectina se realiza en un dispositivo dedicado que permite reducir enormemente el tiempo necesario para el proceso pre-analítico.

Principio del Test

CalFast es una prueba inmunocromatográfica que combina una mezcla de anticuerpos policlonales y monoclonales anti-calprotectina. La calprotectina está presente en las muestras diluidas y se une al conjugado marcado con oro. Se forma un complejo que se desplaza a lo largo de la tira de reacción y se une a los anticuerpos anti-calprotectina presentes en la zona de reacción (T) mientras que los anticuerpos no unidos, se unirán al área de control (C). La concentración de calprotectina en la muestra se calcula mediante un lector dedicado CalFast.

Materiales suministrados y preparación

Cartuchos	20 tests
Diluyente	1 vial
Dispositivo de recogida y d'extracción de heces	20x

Composición de reactivos/materiales

Cartuchos

Veinte (20) cartuchos envasados individualmente en un sobre de aluminio con un desecante. Los cartuchos son desechables.

Diluyente

Un (1) vial con 50mL. Listo para el uso.

Dispositivos de recogida de heces

Veinte (20) dispositivos con una solución de extracción lista para el uso. Estos dispositivos son desechables.

Materiales necesarios, pero no suministrados

1. Tubos de plástico para la dilución del extracto
2. Vórtex.
3. Pipetas de precisión con puntas desechables (10-200 µl, 1ml).
4. Centrífuga para microtubos.
5. Tubos Eppendorf para la dilución del extracto.

6. Temporizador.

7. Lector CalFast.

Rendimiento y límites de la prueba

Variación intra-ensayo

Cuatro (4) muestras de heces fueron repetidas doce (12) veces en el mismo proceso. Estos son los resultados obtenidos:

Muestra	1	2	3	4
Media mg/Kg	208,8	142,4	101,2	72,2
STD	25,5	15,6	8,5	8,2
CV%	12,2	10,9	8,4	11,3

Variación inter-ensayo

Cinco (5) muestras de heces se probaron en duplicado en tres (3) series diferentes. Estos son los resultados obtenidos:

Muestra	1	2	3	4	5
Media mg/Kg	88,4	98,3	114,4	172,3	200,9
STD	7,6	9,3	7,9	16,7	23,6
CV%	8,7	9,4	6,9	9,7	11,8

Variación inter-lote

Cinco (5) muestras de heces se probaron en duplicado usando tres (3) lotes diferentes de product. Estos son los resultados obtenidos:

Muestra	1	2	3	4	5
Media mg/Kg	84,4	101,0	121,9	104,6	221,7
STD	7,5	8,4	11,5	12,8	22,7
CV%	8,8	8,3	9,4	12,2	10,2

Sensibilidad analítica

Una muestra positiva de concentración conocida de calprotectina se diluyó desde 1150 mg/kg a 9 mg/kg y se probó de acuerdo con estas concentraciones. Cada dilución se repitió diez (10) veces. Dentro del rango de la técnica (15 -300 mg/kg), todos los valores de CV% estuvieron por debajo del valor esperado del 15%.

Sensibilidad diagnóstica

Se probaron muestras de heces de veinte (20) individuos afectados por IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) clínicamente diagnosticada. El resultado obtenido fue del 90%.

Especificidad diagnóstica

Se probaron muestras de heces de ciento dos (102) individuos con IBS (*Irritable Bowel Syndrome*) o con una enfermedad

diferente a IBD. El resultado obtenido fue del 90,2%.

Concordancia entre métodos

Ciento sesenta y tres (163) muestras de heces de individuos con o sin diagnóstico clínico de IBD fueron comprobados con CalFast. Los resultados, referidos a positivo/negativo, se compararon con aquellos obtenidos por Calprest (ELISA). Ciento cincuenta (150) muestras mostraron resultados concordantes (Pos/Pos o Neg/Neg) entre los dos métodos. Trece (13) muestras mostraron resultados discordantes (Pos/Neg o Neg/Pos). La concordancia final fue del 92%.

Almacenamiento y caducidad de los reactivos

Todos los reactivos han de almacenarse a 2-8°C y usarse antes de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Estabilidad tras la abertura

El diluyente de muestra es estable durante sesenta (60) días tras su abertura almacenado a 2-8°C en el recipiente original.

Estabilidad de transporte

Una prueba de estabilidad acelerada probó que todos los componentes del kit fueron estables tras 96 hours a 37°C.

Consejos y precauciones

Todas las muestras de pacientes han de tratarse como potencialmente contaminadas y deberán ser eliminadas de acuerdo con la legislación local vigente.

Procedimiento para la recogida de heces

Las heces procesadas por CalFast tienen que ser obligatoriamente extraídas mediante el Dispositivo de Recolección de Heces incluido en el kit.

Recogida de muestra en heces de consistencia normal

1. Recoja las heces en el recipiente apropiado.
2. Retire el stick del tubo de recolección.
3. Sumerja el stick en la muestra recogida.
4. Frote repetidamente el stick en la muestra hasta que todas las rugosidades se llenen de materia fecal.
5. Antes de introducir el stick en el dispositivo, elimine el exceso de heces en las paredes internas del recipiente de las heces.
6. Inserte el stick en el dispositivo con la solución de extracción. Cierre el tubo adecuadamente.

Recogida de muestras líquidas (el stick no se puede utilizar)

1. Es necesario disponer de una pipeta de laboratorio.
2. Aspire 60µl de las heces líquidas.
3. Retire el stick del dispositivo de recogida de muestra.

4. Dispense las heces líquidas en el dispositivo de recogida de muestra.
5. Coloque nuevamente el stick y ciérrelo adecuadamente.

Recogida de muestras para heces con consistencia dura (el stick no se puede utilizar)

1. Recoja las heces en un recipiente estéril.
2. Pipete 50-100µl de solución salina en el recipiente.
3. Mantenga durante 1 hora a temperatura ambiente hasta la disolución de las heces (mínimo).
4. Proceda desde el paso 2 de la Recogida de muestra en heces de consistencia normal.

En caso de ausencia del dispositivo de recogida

1. Si no hay disponibilidad del dispositivo de recogida en el laboratorio, guarde la muestra en un recipiente estéril y manténgalo a 2-8°C durante máximo 7 días. Si este periodo va a superar los 7 días, es preferible congelar la muestra a -20°C.
2. Una vez se disponga de Nuevo del dispositivo, proceda como anteriormente. Si la muestra está congelada, permita que se descongele en su totalidad previamente a su uso.
3. Proceda desde el punto 2 de "Recogida de muestra en heces de consistencia normal"

Almacenaje de las muestras

1. Las heces pueden ser guardadas en el recipiente original durante no más de 7 días a 2-8°C. Para almacenajes más largos, es necesario guardar las muestras a -20°C.
2. Una vez las heces han sido extraídas mediante el dispositivo recomendado, los extractos pueden guardarse a 2-8°C durante máximo 48h. Tras las 48h, es necesario realizar la extracción. De lo contrario, el extracto ha de ser descartado.

Almacenaje del extracto

Una vez se ha realizado la extracción, la muestra extraída puede ser utilizada inmediatamente o congelada a -20°C y almacenada hasta tres (3) meses.

Precauciones

1. Todos los componentes se han de atemperar antes de realizar el test (20 25°C).
2. Es necesario centrifugar el extracto antes de realizar la dilución.
3. Si la muestra se diluye, se ha de utilizar en las dos horas siguientes.
4. Los extractos se pueden almacenar durante tres (3) meses a -20°C.

5. Se recomienda tratar las heces como una muestra potencialmente infecciosa

Procedimiento de extracción

1. Agite la muestra vigorosamente durante 30/60 segundos en un vórtex.
2. Homogenice la muestra durante 25 minutos en un agitador o roller. El stick interno hará de agitador.
3. Si no existe una buena homogeneización, repita el punto 1 y 2 para todas las muestras.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 3.000g a RT (ej. Heraeus Biofuge 13). El dispositivo se ha de invertir en la centrifuga.
5. Extraiga el dispositivo y rompa el final descartándolo. Transfiera el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf.

Procedimiento de dilución

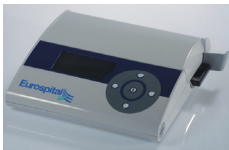
1. Diluya el extracto a 1:50 (ej. 20µl de muestra + 980µl diluyente). Para diluir muestras muy concentradas, se sugiere llegar hasta 1: 250 (20µl de dilución 1:50 + 800µl de solución).
2. Agite vigorosamente (vórtex durante 10 segundos). La muestra está lista para ser procesada.

Procedimiento de la prueba

1. Abra el sobre metálico y extraiga el dispositivo de test rápido atemperándolo.
2. Dispense 100 µl del extracto en la ventana de muestra del cartucho.
3. Mantenga a temperatura ambiente durante 20 minutos u un máximo de 30 minutos.

Lectura de resultados en el lector Calfast (mostrado en la imagen)




1. Pulse la tecla "ENTER" (5) durante 1 segundo para encender el lector.
2. Espere hasta que el dispositivo se inicialice y se autocalibre.
3. Compruebe que el método seleccionado sea <CALFAST>. Si no lo es, seleccione <Method> (tipo de test) y entonces <CALFAST>. Pulse <ENTER>.
4. Compruebe que el número de lote mostrado en la pantalla sea el mismo que en el kit de CalFast. Si no lo es, actualice los parámetros mediante el código de barras "D barcode"
5. Elija <ID Sample> e introduzca el número de muestra mediante las teclas del instrument. Pulse <ENTER> para confirmar.



6. Coloque el cartucho en el lateral asegurándose de que el punto redondo se localice en la parte derecha del cartucho. Cierre el dispositivo.
7. Elija <Measure> y pulse <ENTER>.
8. El lector CalFast leera la reacción y expresará el resultado en mg/Kg.

Aviso: Para cada lote de CalFast, por favour cargue los datos de lote específicos meidnate el código de barras 2D en el kit del lector CalFast. Los parámetros de la prueba están en el código 2D impresos en la parte interior del kit. No usar datos de lote diferentes ya que puede llevar a resultados incorrectos.

Lectura de resultados mediante el lector CalFast New (mostrado en la imagen)

1. Compruebe que el lector esté conectado al PC mediante el cable USB incluido.
2. Encienda el ordenador y haga doble click en el icono del programa del CalFast Reader. Introduzca su Password de usuario.
3. Compruebe que el lote introducido en el aparato coincide con el lote impreso en la envoltura externa del kit que vaya a ser usado. Si el lote no coincide, habrá que actualizarlo como se describe a continuación:
4. Sitúe el código de barras bi-dimensional incluido en el kit, en el lector de códigos de barras del aparato:
5. Compruebe que el código de barras esté correctamente colocado en el lector;
6. Haga click en el icono  para leer el código de barras. De esta manera, la información incluida en el código de barras se actualizará en el aparato CalFast Reader New.
7. Una vez actualizada la información de lote, hay que salvarla clickando en el icono ;
8. Salir clickando el icono ;
9. Este proceso se debe repetir cada vez que se use un nuevo lote. La información del último lote introducido se mantiene en el aparato hasta el momento en que se introduce uno nuevo.



Información de paciente

1. Se debe entrar uno de los datos detallados a continuación: Nombre, Apellidos, Fecha de nacimiento, Código del paciente.
2. Una vez completado el proceso anterior, se podrá ver la luz




LED de color verde, indicando que el cartucho de reacción ya puede ser introducido en la ranura correspondiente.

3. Coloque el cassette en la ranura y compruebe si la posición es correcta seleccionando la opción Check the strip (opcional).

Comprobación de la tira

1. Código del lote: indica el lote en uso
2. Nombre del kit: identificación del product en uso
3. Comprobar tira: para ser usado antes de realizar una prueba (opcional). Cuando se active, la imagen del cartucho se muestra y aparece una marca en la línea de control. Si la línea de control está presente y correctamente posicionada, se mostrará en pantalla "READABLE". Por el contrario, si la tira o el cartucho es incorrecto, se muestra "UNREADABLE".
4. Imagen de la tira de control: muestra el cartucho tal como está dentro del instrumento
5. Imagen analizado: imagen del cartucho actualmente usado para realizar la prueba

Realizar la prueba

1. Si el cartucho se puede leer, inicie el test pulsando el icono . Mientras se realiza la lectura, la luz amarilla se enciende y el icono  cambia a .
2. Se muestran dos imágenes diferentes: una imagen real del cartucho, mientras que la otra se usa para realizar los cálculos.
3. Imagen analizada: imagen usada para los calculus. Las líneas rojas y azules definen el rango para el cálculo. El valor de concentración (arriba a la derecha), se considera válido sólo si las dos líneas están correctamente delimitadas por las líneas azul y roja.
4. El lector CalFast New realiza la lectura e informa el resultado en mg/kg o en $\mu\text{g/g}$.
5. El valor de concentración se graba automáticamente y se asocia a la información del paciente.
6. **Aviso:** para cada lote de CalFast, hay que usar los datos de lote adecuados. Se cargan los datos mediante un lector 2D descrito en el paso 2. El uso de datos de lote diferente conllevará resultados incorrectos.

Para más información, consulte el manual del lector CalFast New

Validación de resultados

1. Para considerar una prueba válida, la línea de control (C) debe estar siempre presente. Esta línea es solo un control

funcional y no se ha de utilizar para la interpretación (T).

2. La cantidad de calprotectina en las heces (T) se calcula mediante el lector CalFast.
3. Si solo aparece la línea (T), la prueba no es válida y se ha de repetir con un nuevo cartucho
4. Si no se muestra ninguna línea (ni C ni T), el resultado no es válido y se ha de repetir la muestra en un Nuevo cartucho.
5. **NB:** El lector CalFast New es capaz de comprobar la lectura de la tira mediante la opción "Check the Strip".

Resultados obtenidos mediante el lector

CalFast se ha calibrado usando información clínica de pacientes y usando Calpreset (ELISA) como referencia. Este lector utiliza información específica de lote para la curva de calibración de cálculo de valores de calprotectina. Sin embargo, el rango detectable está entre 15 y 300 mg/kg, y se expresará según la tabla a continuación:

Valores calprotectina	Valores calprotectina en CalFast
0 - 50 mg/Kg	< 50 mg/Kg
51 - 300 mg/Kg	The real value will be shown
> 300 mg/Kg	> 300 mg/Kg

Ranfo de referencia e interpretación de resultados

Las GPLs sugieren que cada laboratorio debería calcular su propio rango de normalidad. Para este cálculo, es importante utilizar un número de muestras elevado antes de asignarle un valor clínico.

Un estudio interno ofrece los siguientes valores:

Negativo: < 70,0 mg/kg

Positivo: $\geq 70,0$ mg/kg

Las muestras con una concentración superior a 70 mg/kg se han de considerar positivas y han de someterse a un criterio clínico para conocer la razón del aumento de concentración.

En pacientes sanos, el valor medio de calprotectina es de 25 mg/kg. Este valor se informará como < 50 mg/kg. Mientras que en adulto y niños, los valores son parecidos, los niveles en recién nacidos son significativamente más altos.

Valores de referencia

Estudios clínicos (2-5, 10) obtuvieron los siguientes valores:

Pacientes sanos, mediana	< 50 mg/kg
Valores en cancer colorrectal, mediana	350 mg/kg
IBD (CD & UC), mediana	1722 mg/kg

Referencias

1. Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p.187-210
2. Røseth A.G. et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.
3. Røseth A.G. et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34:50-54.
4. Tibble J. et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000;47:506-513.
5. Bunn S.K. et al.: Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33:14-22.
6. Sohnle P.G. et al.: The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. Journal of Infectious Diseases 1991;164:137-142.
7. Steinbakk M. Et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-765.
8. Ton H. et al.: B. Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000;292:41-54.
9. Røseth A.G. et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion 1997;58:176-180.
10. John B. et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. Scand J Gastroenterol 2001;36:291-296.

Legend / Legenda / Legenda / Légend

CASSETTE	Cassette / Cartucho / Cassetta / Cassette
EXT DEV	Stool Collection and Extraction Device / Dispositivo de recogida y extracción de heces / Dispositivo raccolta ed estrazione feci / Dispositifs de collecte et extraction des selles
DIL	Diluent / Diluyente / Diluente / Diluant

CalFast

20 ensayos, código 9191



Fecha de preparación:

2013.11.11

Eurospital®



Eurospital SpA
Via Flavia 122, 34147 Trieste, Italia
Tel. +39 040 8997.1 Fax +39 040 280944
www.eurospital.com - info@eurospital.com