

VITASSAY

Calprotectin+Lactoferrin

Test rápido de detección cualitativa de calprotectina humana y lactoferrina humana en muestras de heces humanas.

IU-7455006 Ed00 Noviembre 2016



Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.

USO PREVISTO

Vitassay Calprotectin+Lactoferrin es un test rápido inmunocromatográfico, de un solo paso para la detección cualitativa de calprotectina y lactoferrina humana en muestras de heces humanas.

Ensayo sencillo, no invasivo y de alta sensibilidad para el detección de calprotectina y lactoferrina humanas en heces. Utilizado para detectar una posible actividad inflamatoria intestinal, como control de la respuesta a un tratamiento, para detectar posibles recaídas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias no clasificadas presentan condiciones inflamatorias crónicas que pueden aparecer incluso en niños. Para ambos tipos de pacientes, tanto niños como adultos, la base para el diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal es la endoscopia con biopsia. La endoscopia es además necesaria para detectar y cuantificar la inflamación intestinal durante el curso de la enfermedad. La valoración de la actividad inflamatoria mucosa intestinal es importante, ya que centrándose en la curación de la mucosa en los tratamientos de la enfermedad inflamatoria intestinal en vez de solamente controlar los síntomas, se considera una nueva terapia. Sin embargo, el procedimiento endoscópico es invasivo, requiere un operador informado y una preparación del intestino, resultando incómodo especialmente para los pacientes más jóvenes. De ahí la necesidad de marcadores que permitan sustituir el uso de endoscopias.

Los marcadores fecales siendo no invasivos, simples, a precio asequible, con alta sensibilidad, cumpliendo todos los criterios para detectar una inflamación intestinal. La calprotectina es una proteína ligada a calcio, representando hasta el 60% de las proteínas citosólicas en neutrófilos, su concentración es directamente proporcional a la concentración de neutrófilos en la mucosa del colon/recto. Es resistente a la degradación bacteriana en el intestino y es estable en heces hasta una semana a temperatura ambiente. La lactoferrina es una glicoproteína ligada a hierro y un gran componente de los gránulos secundarios de los neutrófilos polimorfonucleares. Durante la inflamación intestinal, los leucocitos invaden la mucosa, lo cual puede conducir a un aumento en la secreción de lactoferrina en heces. La lactoferrina puede ser medida usando técnicas simples y asequibles en heces de hasta 4 días.

PRINCIPIO

Vitassay Calprotectin+Lactoferrin es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de calprotectina humana y lactoferrina humana en muestras de heces humanas.

Tira A: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a calprotectina humana.

Tira B: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a lactoferrina humana.

Durante el proceso, la muestra reacciona con los anticuerpos anti-calprotectina y anti-lactoferrina, formando conjugados. La muestra se mueve hacia la parte de arriba de la membrana por acción capilar. Si la muestra es calprotectina humana positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo en la tira A, y si la muestra es lactoferrina positiva (concentración $\geq 200\mu\text{g/g}$), los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo 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-lactoferrina 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.

La presencia de estas líneas **verde** (en la zona de control (C)) indica que el volumen añadido es suficiente, que el flujo ha sido el adecuado y también sirve como control interno de los reactivos.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el test si el envase primario se encuentra dañado.
- Las muestras deben considerarse potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Para evitar errores de contaminación, un nuevo test deberá utilizarse para la evaluación de cada muestra. Dispositivos de un solo uso.
- Los tests tras su utilización 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 **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin**. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- 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.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El producto debe ser almacenado en el rango de temperatura comprendido entre 2 y 30°C (35.6 y 86°F) en su envase original sellado.

El test es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase primario.

No debe abrirse hasta el momento de su uso.

No congelar.

MATERIALES

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> • 25 tests/kit • Vitassay Calprotectin+Lactoferrin • Instrucciones de uso. • 25 viales con diluyente para dilución de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> • Recipiente para recogida de muestras. • Guantes desechables. • Cronómetro.

RECOGIDA DE MUESTRAS

La cantidad de heces tomada debe ser suficiente: 1-2g o mL si la muestra es líquida. Las muestras deben ser almacenadas en un envase limpio y seco.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas (2-8°C / 35.6-46.4°F) como máximo 7 días antes de su uso. Si queremos conservar la muestra por un periodo prolongado, máximo 6 meses, debe congelarse a -20°C (-4°F). La muestra debe ser totalmente descongelada alcanzando la temperatura ambiente antes de usarse.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Abrir el vial con diluyente para dilución de la muestra (figura 1).
2. Tomar la cantidad de muestra necesaria para la realización del test a partir de las heces recogidas, para ello, introducir el palo de toma de muestra una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (figura 2), el palo con la muestra tomada se introduce en el vial para dilución de muestra. Si la muestra es líquida, se

añade aproximadamente 15µL en el vial de dilución de muestra utilizando una micropipeta.

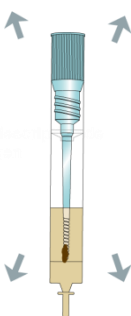
3. Cerrar el vial con la muestra y el diluyente. Agitar vigorosamente para facilitar la dispersión de la muestra (figura 3). El vial con la muestra diluida puede conservarse en el rango de temperaturas (2-8°C / 35.6-46.4°F) hasta 7 días antes de realizar el test.



Vial de dilución de muestra.



Toma de muestra en 4 zonas distintas.



Poner la muestra dentro del vial, cerrar el vial y agitar.

PROCEDIMIENTO

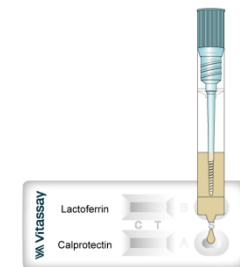
Antes de realizar la prueba los test, muestras y diluyente deben alcanzar temperatura ambiente (15-30°C / 59-86°F). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el vial con la muestra para asegurar una buena dilución de la muestra.
2. Sacar **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el vial con diluyente para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (figura 4) y dispensar 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra S para la tira A-Calprotectin 50 (figura 5) y otras 4 gotas, utilizando el mismo vial en la ventana circular marcada con la letra S para la tira B-Calprotectin 200 (figura 6).
4. Leer el resultado a los **10 minutos**. No leer resultados transcurridos más de 10 minutos.

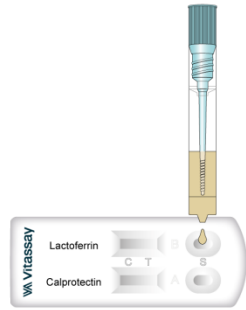
Si no se observa el avance de la cromatografía debido a la presencia de partículas sólidas, se debe agitar con el palito de muestra en la ventana. Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Cortar la punta del tapón.



Dispensar 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra S para la tira A - Calprotectin.



Dispersar 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra S para la tira B - Lactoferrin.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

RESULTADOS	Tira A Calprotectin	Tira B Lactoferrin	INTERPRETACIÓN
	Negativo	Negativo	No existe presencia de calprotectina humana y/o lactoferrina humana en la muestra, lo que puede significar que no hay inflamación gastrointestinal activa, ni riesgo de recidiva (de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).
	VERDE	VERDE	
	Positivo	Positivo	Existe presencia de calprotectina humana y lactoferrina humana, lo que podría significar que hay una inflamación gastrointestinal activa (causada por colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn's o algún tipo de carcinoma o enteropatía causada por Shigella, Salmonella, Campylobacter o Clostridium difficile) o un riesgo de recidiva en la recuperación.
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	

	Positivo	Negativo	Existe presencia de calprotectina humana, lo que podría significar que hay una inflamación gastrointestinal activa o un riesgo de recidiva en la recuperación.
	VERDE-ROJO	VERDE	
	Negativo	Positivo	Existe presencia de lactoferrina humana, lo que puede indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria intestinal.
	VERDE	VERDE-ROJO	
Cualquier otro resultado			Resultado inválido en A o en B, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test. Nota: procedimiento inadecuado, deterioro de reactivos, o volumen insuficiente de muestra podrían ser la causa del resultado inválido. Si los síntomas o las situación persisten, dejar de utilizar el kit y contactar con su distribuidor local.

Observaciones: La intensidad de la línea de color rojo en la zona de línea de test (T) variará dependiendo de la concentración de antígenos en la muestra.

CONTROL DE CALIDAD

Existe un control interno del procedimiento incluido en **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin**. La línea verde aparece como control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- No debe utilizarse **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** una vez abierto el envase primario y transcurridas 2 horas.
- Un exceso de muestra puede dar resultados erróneos (aparición de líneas de color pardo). Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea de test puede variar dependiendo de la concentración de calprotectina y/o lactoferrina humanas.

- No ha sido determinado el uso del test en muestras diferentes a las humanas.
- La calidad de **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** depende de la calidad de la muestra, por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras.
- Los resultados positivos determinan la presencia de calprotectina y/o lactoferrina humanas en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas (enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorectal y algunas enteropatías). Un resultado positivo debería ser contrastado el resultado con otras técnicas invasivas, la endoscopia y la biopsia para confirmar el diagnóstico y establecer el grado de inflamación.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de calprotectina y/o lactoferrina en la muestra de heces sea inferior al valor de cut-off. Si los síntomas o la situación persisten, 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 inflamación mononuclear.
- Pacientes que sigan un tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) podrían dar resultados positivos.
- En neonatos se han descrito niveles más elevados de calprotectina fecal comparando los valores normales en niños. Nivel medio 167 µg/g (en un rango entre 22-860µg/g).
- Pacientes que presentan enfermedad inflamatoria intestinal lleva normalmente asociada una inflamación neutrófila del intestino, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, dando sus muestras de heces resultados positivos para calprotectina fecal.
- Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** puede ser sensible para el diagnóstico en pacientes con diarrea crónica.

VALORES ESPERADOS

La incidencia anual en pediatría de las enfermedades inflamatorias del intestino aumenta, estando alrededor del 5 al 7/100000.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Valor de Cut-off

El valor de Cut-off para **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** es:

- Tira A: 500ng/mL (50µg hCp/g heces)
- Tira B: 100ng/mL (10µg hLf/g heces)

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por **Vitassay Calprotectin + Lactoferrin** y otros inmunoensayos comercializados (Calprest®, Eurospital y IBD EZ VUE®, TechLab®).

Los resultados se muestran a continuación:

		Calprest®		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Calprotectin + Lactoferrin	Positivo	34	2	36
	Negativo	2	26	28
	Total	36	28	64
Calprotectin				

Vitassay Calprotectin + Lactoferrin (Calprotectin) vs Calprest®			
Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
>94%	93%	>94%	93%

		IBD EZ VUE®		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Calprotectin + Lactoferrin	Positivo	20	0	20
	Negativo	0	44	44
	Total	20	44	64
Lactoferrin				

Vitassay Calprotectin + Lactoferrin (Lactoferrin) vs IBD EZ VUE®			
Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que **Vitassay Calprotectin+Lactoferrin** presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar calprotectina humana y lactoferrina humana.

Reacciones cruzadas

No se detectaron reacciones cruzadas con los siguientes marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces.

Calprotectina humana (Tira B)	Lactoferrina humana (Tira A)
Hemoglobina bovina y de cerdo	Trasferrina bovina y de cerdo
Hemoglobina humana	Transferina humana

BIBLIOGRAFÍA

1. KAIJA-LEENA KOLHO; TAINA SIPPONEN; ELSA VALTONEN; ERKKI SAVILAHTI. "Fecal calprotectin, MMP-9, and human beta-defensin-2 levels in pediatric inflammatory bowel disease". Int J Colorectal Dis (2014) 29:43-50.
2. TAKAYUKI YAMAMOTO; MANABU SHIRAKI; TAKUYA BAMBA; SATORU UMEGAE; KOICHI MATSUMOTO. "Fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis during maintenance therapy". Int J Colorectal Dis (2014) 29:485-491.

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar en lugar seco
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad		Fabricante
LOT	Número de lote		Contiene <n> test
DIL	Diluyente de muestra	REF	Número de referencia

