
CERTEST Calprotectin+ Lactoferrin

ONE STEP human calprotectin
and human lactoferrin COMBO
CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.





CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest Calprotectin+Lactoferrin one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay (cut-off qualitative test) for the simultaneous qualitative determination of human calprotectin (hCp) and human lactoferrin (hLf) in stool samples that may reflect gastrointestinal inflammation caused by several pathologies (inflammatory bowel disease, colorectal cancer and some enteropathies).

CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card test offers a simple, a highly sensitive and non-invasive screening assay to determine intestinal inflammatory activity, to monitor treatment response and to predict risk of relapse.

INTRODUCTION

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

Lactoferrin is a glycoprotein component of neutrophil secondary granules, a primary component of the acute inflammatory response and is released from faecal leukocytes. This protein is resistant to proteolysis in the faeces and may serve as a marker of inflammation in the intestine. The major cause of faecal neutrophils in patients with chronic diarrhoea is chronic inflammatory intestine disease of the colon (i.e., Crohn's Disease and Ulcerative Colitis). Lactoferrin has been also studied as a predictor of infection with invasive enteropathogens in children with diarrhoea. Bacterial inflammatory diarrhoea may be caused by *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Clostridium difficile*.

The hCp and hLf are non-invasive markers of intestinal inflammation (for example in Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD)).

Suspicion of gastrointestinal inflammatory disorders is raised in patients with persistent (≥ 4 weeks) or recurrent (≥ 2 episodes in six months) abdominal pain and diarrhoea. Additionally, rectal bleeding, weight loss or anemia increase the probability of the condition. Endoscopic evaluation with histopathological sampling is generally considered indispensable to diagnosis patients with gastrointestinal inflammation disorder suspicion.

TEST PRINCIPLE

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

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

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

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

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

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate



complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

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

PRECAUTIONS

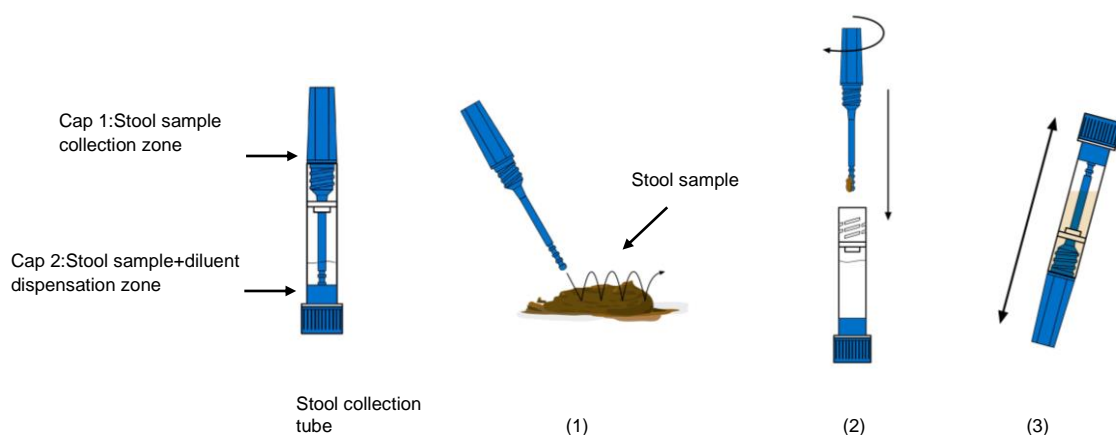
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest Calprotectin+Lactoferrin test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Specimen preparation (see illustration):

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



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

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

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

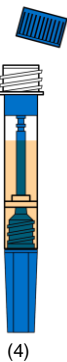
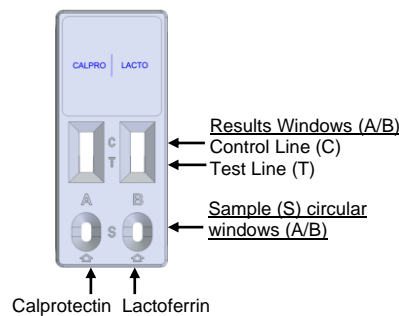
One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
 Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

TEST PROCEDURE

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

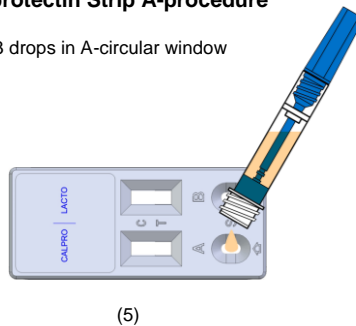
1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, open the cap 2 (4) and dispense 3 drops in the circular window marked with the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

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



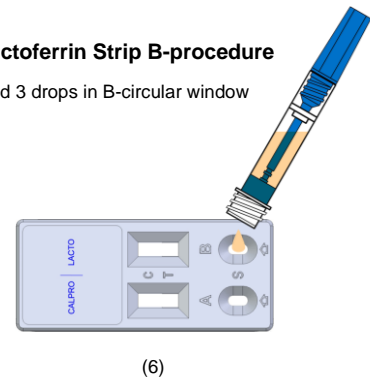
Calprotectin Strip A-procedure

Add 3 drops in A-circular window



Lactoferrin Strip B-procedure

Add 3 drops in B-circular window



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

1.

A: Green → Negative hCp
 B: Green → Negative hLf
2.

A: Green/Red → Positive hCp
 B: Green/Red → Positive hLf
3.

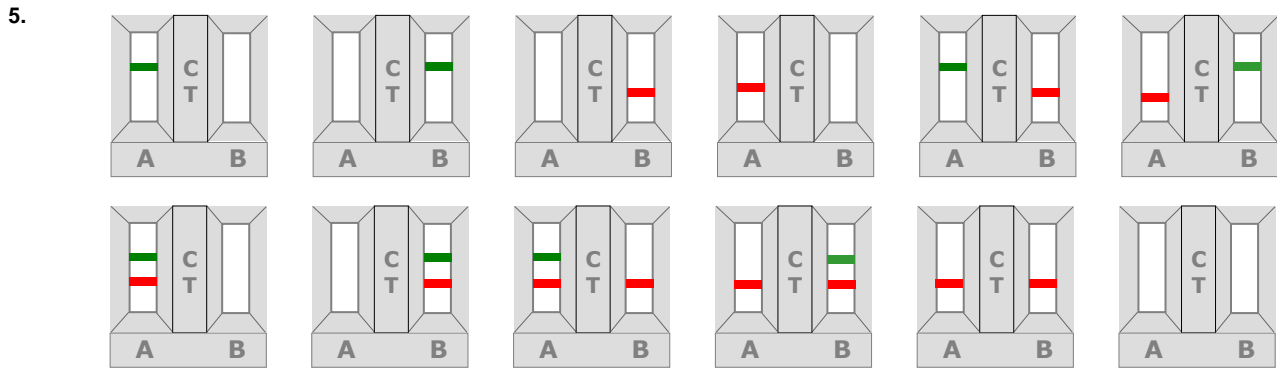
A: Green/Red → Positive hCp
 B: Green → Negative hLf
4.

A: Green → Negative hCp
 B: Green/Red → Positive hLf

CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

INVALID RESULTS



	A (Calprotectin (hCp))	B (Lactoferrin (hLf))	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There is no human calprotectin and/or human lactoferrin presence which might mean neither active gastrointestinal inflammation, nor risk of relapse (CD or UC relapse).
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is human calprotectin and human lactoferrin presence which might mean an inflammatory intestinal disease (caused by ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD), some type of carcinomas or an enteropathy caused by <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> or <i>Clostridium difficile</i>) or risk of relapse in clinical remission.
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is human calprotectin presence which might mean active gastrointestinal inflammation or risk of relapse in clinical remission.
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is human lactoferrin presence which might mean an inflammatory intestinal disease.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result, either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

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

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

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

QUALITY CONTROL

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

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of stool sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the buffer and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high human calprotectin/lactoferrin concentration to faint when the human calprotectin/lactoferrin concentration is close to cut-off value of the test.
4. CerTest Calprotectin+Lactoferrin should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of human calprotectin and/or human lactoferrin in faecal samples; nevertheless, it can be due to several causes (Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and some other enteropathies). A positive result should be followed up with additional diagnostic invasive procedures, a colonoscopy and a biopsy in order to confirm the diagnosis and to establish the inflammation extent.



CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

*One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette*

6. A negative result is not meaningful because of it is possible the human calprotectin and/or human lactoferrin concentration in the stool sample is lower than cut-off values. If symptoms or situation still persist, calprotectin and lactoferrin determination should be carried out invasive techniques Negative results do not exclude inflammation, some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps that involve mainly monocuclear inflammation.
7. Stool from patients with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) treatment could show positive calprotectin result.
8. Lactoferrin is a component of breast milk; the test will be positive in breast fed children and should not be used to evaluate neonates receiving breast milk.
9. Neonatal faecal calprotectin levels have been reported higher than normal children with a median of 167µg/g (range 22-860µg/g).
10. Stool from patients with active inflammatory bowel diseases that usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, would be positive for faecal calprotectin (the level of calprotectin in Crohn's Disease is higher than in Ulcerative Colitis) and would be positive for faecal lactoferrin. CerTest Calprotectin+Lactoferrin could be sensitive for this diagnosis in patients with chronic diarrhea.
11. Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
12. Mucous stool samples may cause non-specific reactions in the test. Every mucous stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.

EXPECTED VALUES

Some studies established equal or higher 50µg hCp/g faeces and 10µg hLf/g faeces as cut-off values to allow detect adult patients with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Cut-off values of CerTest Calprotectin+Lactoferrin are 500ng/mL (50µg hCp/g faeces) for human calprotectin and 100ng/mL (10µg hLf /g faeces) for human lactoferrin.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest Calprotectin+Lactoferrin, CerTest), other commercial immunoassays (Calprest®, Eurospital) for the Strip A and other commercial ELISA tests (Human Lactoferrin ELISA kit, ICL) for the Strip B. The results were as follows:

Data for cut-off value 50 µg hCp/g

IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Strip A: Calprotectin)	ELISA test: Calprest®			
		+	-	Total
	+	31	7	38
-	1	41	42	
Total	32	48	80	

CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Strip A: Calprotectin) vs Calprest®		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	96.9%	83.8 – 99.9%
Specificity	85.4%	72.2 – 93.9%
PPV	81.6%	65.7 - 92.3%
NPV	97.6%	87.4 –99.9%

Sensitivity for a cut-off value of 100 µg hCp/g: 100.0% (mean value); 85.2-100.0% (95% confidence interval).

Specificity for a cut-off value of 25 µg hCp/g: 94.9% (mean value); 82.7-99.4% (95% confidence interval).





CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

Data for cut-off value cut-off 10 µg hLf/g

IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Strip B: Lactoferrin)	ELISA test: Human Lactoferrin ELISA kit			
		+	-	Total
	+	27	13	40
-	3	47	50	
Total	30	60	90	

CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Strip B: Lactoferrin) vs Human Lactoferrin ELISA kit		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	90.0%	73.5 – 97.9%
Specificity	78.3%	65.8 – 87.9%
PPV	67.5%	50.9 - 81.4%
NPV	94.0%	83.5 –98.7%

Specificity for a cut-off value of 2.5 µg hLf/g: 100.0% (mean value); 83.9-100.0% (95% confidence interval).

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

Cross reactivity

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

For Strip A: Calprotectin

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

For Strip B: Lactoferrin

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

ESPAÑOL

USO PREVISTO

CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card test es una prueba inmunocromatográfica (test cualitativo de cut-off) de un solo paso para la determinación cualitativa simultánea de calprotectina humana (hCp) y lactoferrina humana (hLf) en muestras de heces como indicativo de inflamación gastrointestinal presente en diversas patologías (enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal y algunas enteropatías).

CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo, de alta sensibilidad y no invasivo para determinar actividad inflamatoria intestinal, para el seguimiento de un tratamiento y para predecir el riesgo de recaídas.

INTRODUCCIÓN

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

La lactoferrina es un componente glicoproteico de los gránulos neutrófilos secundarios, componente primario de la respuesta aguda inflamatoria y es liberada a partir de los leucocitos fecales. Esta proteína es resistente a la proteólisis en las heces y puede servir como marcador de inflamación en el intestino. La causa más frecuente de la presencia de neutrófilos en heces en pacientes con diarrea crónica es la enfermedad crónica inflamatoria intestinal localizada en el colon (como la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa).

Se ha estudiado la lactoferrina como marcador de infección por enteropatógenos invasivos en niños con diarrea. La diarrea inflamatoria bacteriana puede ser causada por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile*.

hCp y hLf son marcadores no invasivos que indican inflamación intestinal (por ejemplo en Colitis Ulcerosa (UC) y en la Enfermedad de Crohn (CD)).

Pacientes con dolor abdominal y diarrea persistente (≥ 4 semanas) o recurrente (≥ 2 episodios en 6 meses) son sospechosos de padecer estas enfermedades. Además de estos síntomas, el sangrado rectal, la pérdida de peso o la aparición de anemia aumentan la probabilidad de la presencia de estas enfermedades. En este caso, es indispensable una evaluación endoscópica tomando una muestra histopatológica para poder diagnosticar estos pacientes sospechosos.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest Calprotectin+Lactoferrin es una prueba cualitativa de cut-off inmunocromatográfica para la determinación de calprotectina humana y lactoferrina humana en muestras de heces.

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

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

Si la muestra es calprotectina humana positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-calprotectina humana-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es lactoferrina humana positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-lactoferrina-humana microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-calprotectina humana presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-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.

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

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

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

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

PRECAUCIONES

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

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

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

Preparación de la muestra (ver dibujo):

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



CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

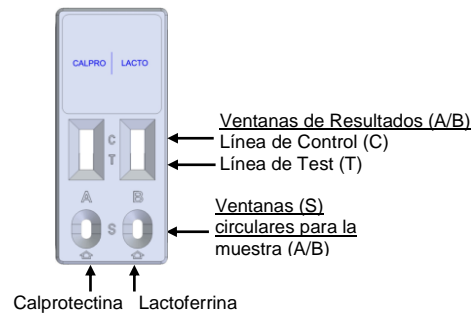
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

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

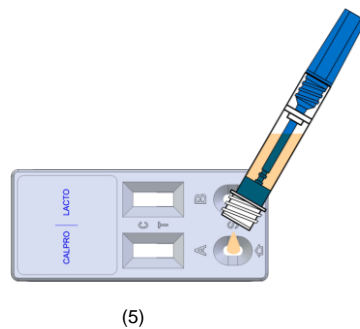
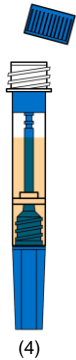
1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest Calprotectin+Lactoferrin de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo de dilución de muestra, abrir el tapón 2 (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5),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

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



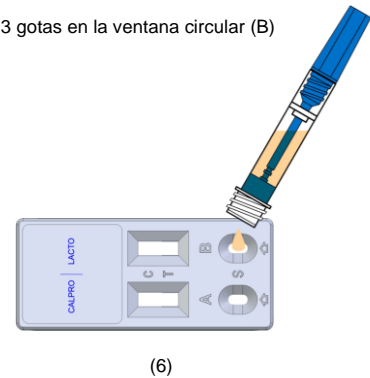
Procedimiento para la tira A de Calprotectina

Añadir 3 gotas en la ventana circular (A)

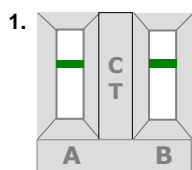


Procedimiento para la tira B de Lactoferrina

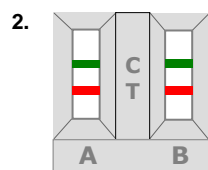
Añadir 3 gotas en la ventana circular (B)



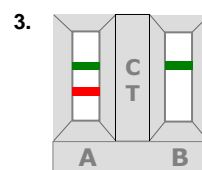
INTERPRETACION DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



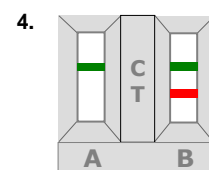
A: Verde → Negativo hCp
B: Verde → Negativo hLf



A: Verde/Rojo → Positivo hCp
B: Verde/Rojo → Positivo hLf



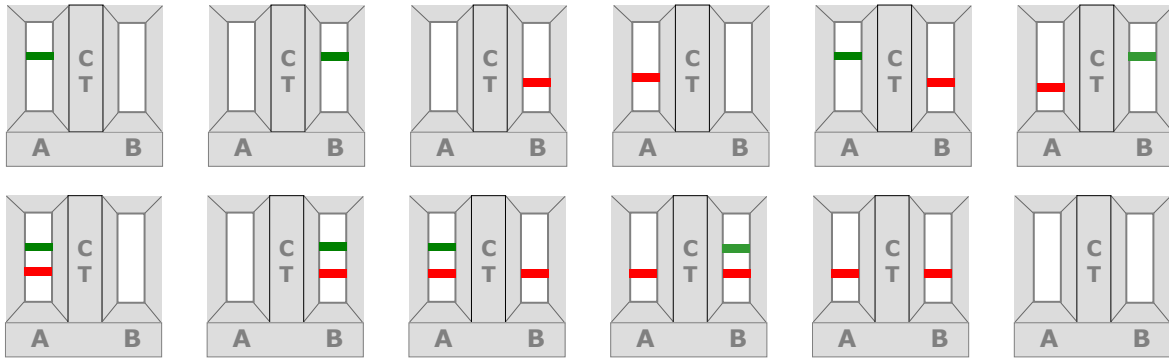
A: Verde/Rojo → Positivo hCp
B: Verde → Negativo hLf



A: Verde → Negativo hCp
B: Verde/Rojo → Positivo hLf

RESULTADOS INVÁLIDOS

5.



	A (Calprotectina (hCp))	B (Lactoferrina (hLf))	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No existe presencia de calprotectina humana y/o lactoferrina humana en la muestra puede significar que no hay inflamación gastrointestinal activa, ni riesgo de recidiva (de Cd o UC).
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	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 <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> o <i>Clostridium difficile</i>) o un riesgo de recidiva en la recuperación.
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Existe presencia de calprotectina humana, lo que podría significar que hay una inflamación gastrointestinal activa o un riesgo de recidiva en la recuperación.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Existe presencia de lactoferrina humana, lo que puede indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria intestinal.
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido, en A o en B, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

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

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de calprotectina y lactoferrina humanas presentes en la muestra.

CONTROL DE CALIDAD

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

LIMITACIONES

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

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

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

VALORES ESPERADOS

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de calprotectina humana sea de 50µg hCp/g en heces y de lactoferrina humana 10µg hLf/g en heces, para permitir detectar pacientes adultos con una patología inflamatoria gastrointestinal los cuales requerirán para su diagnóstico procedimientos adicionales invasivos.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica

Los valores de cut-off de CerTest Calprotectin+Lactoferrin son 500ng/mL (50µg/g heces) para calprotectina humana y 100ng/mL (10µg/g heces) para lactoferrina humana.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest Calprotectin+Lactoferrin, CerTest) y otro inmunoensayo comercializado (Calprest®, Eurospital) para la Tira A y un test comercial ELISA (Human Lactoferrin ELISA kit, ICL) para la Tira B. Los resultados se muestran a continuación:

Datos para el valor de cut-off 50 µg hCp/g

IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Tira A: Calprotectin)	ELISA test: Calprest®			
		+	-	Total
	+	31	7	38
-	1	41	42	
Total	32	48	80	

CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Tira A: Calprotectin) vs Calprest®		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	96.9%	83.8 – 99.9%
Especificidad	85.4%	72.2 – 93.9%
VPP	81.6%	65.7 - 92.3%
VPN	97.6%	87.4 –99.9%



CERTEST Calprotectin+Lactoferrin

One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

Sensibilidad para un valor de cut-off de 100 µg hCp/g: 100.0% (valor medio); 85.2-100.0% (95% intervalo de confianza).

Especificidad para un valor de cut-off de 25 µg hCp/g: 94.9% (valor medio); 82.7-99.4% (95% intervalo de confianza).

Datos para el valor de cut-off 10 µg hLf/g

IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Tira B: Lactoferrin)	ELISA test: Human Lactoferrin ELISA kit			Total
		+	-	
+	27	13	40	
-	3	47	50	
Total	30	60	90	

CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Tira B: Lactoferrin) vs Human Lactoferrin ELISA kit		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	90.0%	73.5 – 97.9%
Especificidad	78.3%	65.8 – 87.9%
VPP	67.5%	50.9 – 81.4%
VPN	94.0%	83.5 – 98.7%

Especificidad para un valor de cut-off de 2.5 µg hLf/g: 100.0% (valor medio); 83.9-100.0% (95% intervalo de confianza).

Los resultados mostraron que CerTest Calprotectin+Lactoferrin presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar calprotectina y lactoferrina humanas.

Reacciones cruzadas

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

Para la tira A: Calprotectin

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

Para la tira B: Lactoferrin

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





CERTEST Calprotectin+Lactoferrin















One step test to detect human calprotectin and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta* 381 Feb 2007, p. 63-68
2. Quail, M.A. et al. Fecal Calprotectin Complements Routine Laboratory Investigations in Diagnosing Childhood Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, Vol 15 No 5; May 2009, p. 756-759
3. Gaya D.R., et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *Q J Med* 2005, Vol 98, May 2005, p. 435-441.
4. Langhorst, M.D. et al. Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices. *Am. J. Gastroenterol.* 2008; Vol 103, p. 162-169.
5. Gisbert, J.P. et al. Role of Biological Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* May 2007, 30(3), p. 117-29.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

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





CerTest
BIOTEC S.L.

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



F-368 rev00